Produção de etanol a partir de Kappaphycus alvarezii - Biocombustível de terceira geração

Paulo Iiboshi Hargreaves



Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

Orientadores:

Nei Pereira Jr., *PhD* Antonio Carlos Augusto da Costa, *DSc*

Escola de Química Universidade Federal do Rio de Janeiro

Produção de etanol a partir de *Kappaphycus alvarezii* – Biocombustível de terceira geração

Paulo Iiboshi Hargreaves

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos E Bioquímicos para obtenção do grau de Doutor em Ciências (DSc)

Universidade Federal do Rio de Janeiro Produção de etanol a partir de *Kappaphycus alvarezii* – Biocombustível de terceira geração

Paulo Iiboshi Hargreaves

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Ciências (*DSc*).

Aprovada	por:
	Nei Pereira Jr., <i>PhD</i> (DEB/UFRJ) - Orientador/Presidente
	Antonio Carlos Augusto da Costa, DSc (IQ/UERJ) – Orientador
	Antonio Carios Augusto da Costa, D3t (1Q/ UERJ) – Orientador
	Alane Beatriz Vermelho, DSc (IM/UFRJ)
	Andrea Medeiros Salgado, <i>DSc</i> (DEB/UFRJ)
	Peter Rudolf Seidl, <i>PhD</i> (DPO/UFRJ)
	Raquel Silva Peixoto, <i>DSc</i> (IM/UFRJ)
	D. I. D. I.D. I. C. II. D.C. (IM/HEDD)
	Rosalie Reed Rodrigues Coelho, DSc (IM/UFRI)

Ficha Catalográfica

Hargreaves, Paulo Iiboshi.

Produção de etanol a partir de *Kappaphycus alvarezii*: Biocombustível de terceira geração / Paulo Iiboshi Hargreaves. – 2013.

Xv, 78 f. 29,7 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, ano.

Orientadores: Nei Pereira Junior, *PhD*.

Antonio Carlos Augusto da Costa, *DSc*.

- 1. macroalga. 2. fermentação. 3. hidrólise enzimática. 4. biocombustível.
- I. Pereira Jr., Nei.
- II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Escola de Química.
- III. Produção de etanol a partir de Kappaphycus alvarezii Biocombustível de terceira geração.

Produção de etanol a partir de *Kappaphycus alvarezii* – Biocombustível de terceira geração

Resumo da tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Brasil

Paulo Iiboshi Hargreaves

O aumento da demanda por biocombustíveis vem pressionando a expansão de áreas agrícolas e competição com os cultivos alimentares. Como alternativa para esse conflito, a exploração de novas matérias-primas, como biomassas residuais de composição lignocelulósica e aquáticas (macroalgas), podem se tornar em importantes estratégias para a produção de bioetanol de segunda e terceira gerações. O organismo avaliado neste projeto é a macroalga Kappaphycus alvarezii, classificada como uma alga vermelha, ou Rhodophycea, fonte de carragena. Considerando as vantagens do bioetanol produzido a partir de biomassa algal e a falta de estudos desse tipo de fermentação para a produção de combustíveis renováveis, o propósito desta pesquisa é avaliar as possibilidades do pré-tratamento ácido e de hidrólise enzimática simultânea à fermentação (SSF). O estudo do pré-tratamento com ácido diluído foi realizado nas faixas de 0,1 a 2,0% (v/v) de ácido sulfúrico e 10 a 60 minutos a 121 °C, tendo gerado uma fração líquida (rica em galactose) com concentração de até 81 g/L de galactose e um resíduo celulósico (RC) com 66% (m/m) de celulose. Para hidrólise enzimática, foi delineado um planejamento experimental central composto rotacional, tendo como fatores a carga enzimática (20-70 FPU/g de RC) e a concentração de RC (9-20% m/v) como variáveis independentes, obtendo até 100 g/L de glicose. A fermentação das frações foi realizada pela linhagem Saccharomyces cerevisiae CBS1782 em batelada simples para a fermentação das frações liquida e sólida e das frações combinadas (SSCF), obtendo 38 g/L de etanol da fermentação da fração líquida, 52 g/L de etanol da fração sólida e 65 g/L através do SSCF. Os resultados preliminares indicam boas perspectivas da utilização de K. alvarezii como uma potencial matéria-prima para produção de etanol de terceira geração.

Production of ethanol from Kappaphycus alvarezii - Third Generation Biofuel

Abstract of the doctoral thesis presented to the Post-graduation Course on Technology of Chemical and Biochemical Processes of the School of Chemistry of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

Paulo Iiboshi Hargreaves

The increase on demand for biofuel has been pressing agricultural sector to expand crop areas and competing with food crops. As an alternative way to circumvent these issues is the exploration of new frontiers for harvesting, among cellulignin biomasses, algal carbohydrates can became an important source of bioethanol. The organism evaluated in this report is photosynthetic macro-algae, or "seaweed". Kappaphycus alvazerii is classified as red seaweed, or Rhodophyceae, source of carrageenan. Considering the advantages of bioethanol production with algal biomass, and the lack of studies over algal fermentation for renewable fuel, the purpose of this investigation was to evaluate the possibilities of acid and enzymatic hydrolysis, simultaneous glucose and galactose fermentation, and simultaneous saccarification and fermentation (SSF). The study ranges for diluted acid hydrolysis concentration was 0,1 to 2,0% (v/v), and 10 to 60 minutes at 121 °C, which generated a liquid fraction (rich in galactose) with concentration up to 81 g/L of galactose, and the cellulose residue (CR) with 66% (m/m) of cellulose. For the enzymatic hydrolysis of CR, a central composite rotational design was carried out using enzyme loading (20-70 FPU/g CR) and CR concentration (9-18% w/v) as independent variables, achieving 100 g/L of glucose. The fermentation of the fractions was performed by strain of Saccharomyces cerevisiae CBS1782 in simple batch fermentation of liquid and solid fractions, and the fractions combined (SSCF), obtaining 38 g/L ethanol from liquid fraction fermentation, 52 g/L ethanol from solid fraction and 65 g/L by SSCF. These preliminaries results indicate good prospects as a potential feedstock for bioethanol production.

Lista de figuras

Figura 2.1. Ulva lactuca, conhecida também como alface-do-mar (algaebase.org)6			
Figura 2.2. Saccharina groenlandica, da família Laminariaceae (seaweedsofalaska.com)			
F igura 2.3. Índice de absorção (%) dos pigmentos no espectro de luz visível Purves et al, 1998)9			
Figura 2.4. Variações nas tonalidades de <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Agriculturasp).			
Figura 2.5. Kappaphycus alvarezii (Paulo I. Hargreaves)			
Figura 2.6. Sistemas de cultivos de macroalgas, bolsas flutuantes (a) e suportes fixos (b) (Trono, 1993)			
Figura 2.7. Imagem de um corte transversal de <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Lizette Quan Young)			
Figura 2.8. Estrutura básica de galactanas formadas por unidades repetidas de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose ligadas em α - $(1\rightarrow 3)$			
Figura 2.9. Representação das carragenas: kappa (a), iota (b) e lambda (c)15			
Figura 2.10. Importação de algas pelo Brasil. (Aliceweb, 2013)			
Figura 2.11. Esquema simplificado indicando as principais vias metabólicas da <i>S. cerevisiae</i> e as rotas com possíveis interações com HMF. Álcool HMF: Álcool 5-hidroximetil furfurílico, Ácido HMF: Ácido hidroximetil-2-furóico (Modig et al, 2002)			
Figura 2.12. Esquema da ação das celulases não complexadas, endos: endoglucanase, exosR: exoglucanase específica para terminal redutor, exosNE: exoglucanase específica para terminal não redutor, β-Gase: beta glucosidase (Zhang et al, 2006)			
Figura 2.13. Via de Leloir, contendo as enzimas responsáveis pelo transporte da galactose para dentro da célula e sua transformação em glucose-6-fosfato (Ostergaard et al, 2001)			
Figura 2.14. As diversas rotas de conversão e os produtos que podem ser obtidos de biomassa (King et al, 2010)23			
Figura 2.15. Representação das plataformas bioquímicas: SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation). SSF (Simultaneous Saccharification and			

CBP (Consolidated Bioprocessing)
Figura 5.1. Cromatograma típico do produto da fermentação (fase intermediária) da glicose e galactose por <i>S. cerevisiae</i>
Figura 6.1. Volume recuperado de cada filtração e suas respectivas concentrações de galactose e HMF
Figura 6.2. Ensaios de remoção de HMF, com uso de carvão ativado, incubado a 30 °C, 150 rpm por 1h
Figura 6.3. Cinética de hidrólise enzimática do ensaio DCCR(a) e respectivos rendimentos(b), para diferentes condições de ensaios
Figura 6.4. Gráfico resultante da sobreposição das superfícies de resposta da hidrólise enzimática (g/L)(máximo de 100 g/L) e rendimento de hidrólise (%)(máximo de 78%) para amostras coletadas após 24 horas de processo51
Figura 6.5. Perfil cinético da hidrólise enzimática do resíduo celulósico com várias concentrações de sólidos pela Multifect® (a) e respectivo rendimento (b)
Figura 6.6. Hidrólise enzimática realizada em reator contendo galactose. Mantido a 50 °C e 400 rpm
Figura 6.7. Microfotografia da <i>K. alvarezii</i> após lavagem, secagem e moagem em aumento de 1000x
Figura 6.8. Microfotografia da <i>K. alvarezii</i> após pré-tratamento químico, seca e moída (a) e após o processo de SSCF (sacarificação simultânea a cofermentação) (b) em aumento de 1000x
Figura 6.9. Crescimento da <i>S. cerevisiae</i> em meio sintético, com glicose e galactose, 150 rpm a 30 °C.
Figura 6.10. Ensaio preliminar de co-fermentação por <i>S. cerevisiae</i> (7 g/L), proveniente de meio pré-inóculo contendo apenas glicose
Figura 6.11. Ensaio preliminar de co-fermentação do hidrolisado da <i>K. alvarezii</i> por <i>S. cerevisiae</i> (7 g/L), proveniente de meio pré-inóculo contendo apenas galactose
Figura 6.12. Co-fermentação por <i>S. cerevisiae</i> a 30 °C em meio sintético com mistura de glicose e galactose em concentração de 70 g/L, para avaliação de tamanho de inóculo. (a) 10 g/L de inóculo e (b) 20 g/L de inóculo57
Figura 6.13. Fermentação do hidrolisado rico em galactose por S. cerevisiae a 58

Figura 6.14. Sacarificação simultânea a fermentação alcoólica do resíduo
celulósico de K. alvarezii (RC) por S. cerevisiae a 30 °C. PHE: pré-hidrólise (24 h
a 50 °C, concentração de RC 18% m/v, 45 FPU/g de RC) com inoculo de 7
g/L59
Figura 6.15. Sacarificação simultânea a co-fermentação de glicose e galactose provenientes da hidrólise de <i>K. alvarezii</i> por <i>S. cerevisiae</i> CBS 1782 (20 g/L)60
Figura 6.16. Diagrama de blocos indicando o potencial teórico máximo (a) e máximo atingível pelas metodologias empregadas no presente trabalho (b)63

Lista de tabelas

Tabela 2.1. Composição química aproximada das algas marinhas (Faccini,
2007)5 Tabela 2.2. Composição média de <i>Ulva</i> spp. em massa seca (Bruton et al, 2009)6
Tabela 2.3. Perfil bioquímico representativo de algas pardas (Bruton et al, 2009)
Tabela 2.4. Composição da <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Lechat et al, 1997)13
Tabela 2.5. Produção de etanol a partir de algas por fermentação25
Tabela 5.1. Composição do meio de manutenção GYMP32
Tabela 5.2. Composição do meio de ativação Sabourad modificado32
Tabela 5.3. Meio de cultura para propagação e produção do inóculo32
Tabela 5.4. Composição da solução de sais minerais e ácido cítrico. 32
Tabela 5.5. Condições operacionais do cromatógrafo33
Tabela 5.6. Planejamento Fatorial 2 ⁴ , tendo como fatores concentração de H ₂ SO ₄ (1-5%), relação sólido:líquido (5-20%), temperatura (111-121°C) e tempo de exposição (20-40 min)
Tabela 5.7. Planejamento Fatorial 2², tendo como fatores concentração de H_2SO_4 (1-2%) e tempo de exposição (20-60 min)36
Tabela 5.8. Planejamento experimental central composto rotacional, com variação da concentração de resíduo celulósico e carga enzimática37
Tabela 6.1. Composição da <i>Kappaphycus alvarezii</i> utilizada nos ensaios42
Tabela 6.2. Ensaios realizados para o planejamento fatorial 2 ⁴ 43 Tabela 6.3. Ensaios realizados para o planejamento fatorial 2 ² (1-1,5% v/v).
Tabela 6.4. Lista de efeito e contribuição dos fatores no planejamento, na faixa de concentração de ácido 1-1,5% (v/v)
Tabela 6.6. Lista de efeito e contribuição dos fatores no planejamento, na faixa de concentração de ácido 1,5-2,0% (v/v)45

Tabela 6.7. Respostas de concentração de glucose e rendimento de hidrólise
enzimática do resíduo celulósico após 24h do delineamento central composto
rotacional (DCCR)
Tabela 6.8. Balanço de massa das etapas para produção de etanol a partir de
K. alvarezii, pelo modelo de duas correntes (fermentação de galactose separada
do SSF de RC)63
Tabela 6.9. Comparação da sacarificação e rendimento em etanol de
diferentes algas. (Kumar el al, 2013)64
Tabela 6.10. Comparativo da produtividade das biomassas para produção de
bioetanol66

Sumário

1.	Apresentação	1
2.	Revisão bibliográfica	4
	2.1. Macroalgas	4
	2.2. Chlorophytas	5
	2.3. Phaeophytas	6
	2.4. Rhodophytas	8
	2.5. Kappaphycus alvarezii	9
	2.5.1. Parede celular de Kappaphycus alvarezii	13
	2.5.2. Carragena	14
	2.5.3. Mercado	15
	2.6. Extração e produção de carragena	16
	2.7. Pré-tratamento químico e seus produtos	17
	2.8. Hidrólise enzimática da fração celulósica	18
	2.9. Fermentação da galactose	20
	2.10. Biorrefinaria 3G	22
	2.11. Estratégias de fermentação dos hidrolisados da biomassa algal	26
	2.12. Considerações gerais	26
3.	Justificativa	28
4.	Objetivos	28
	4.1. Objetivo Geral	28
	4.2. Objetivos Específicos	29
5.	Materiais e Métodos	30

5.1. Matéria-prima	30
5.2. Caracterização da matéria-prima	30
5.3. Microrganismo	31
5.4. Meio de manutenção, ativação e propagação	31
5.5. Ensaios quantitativos	33
5.6. Diagrama esquemático do processamento de K. alvare	zii34
5.7. Pré-tratamento químico	35
5.8. Separação da fase líquida	36
5.9. Clarificação	37
5.10. Hidrólise enzimática	37
5.11. Microscopia Eletrônica de Varredura	38
5.12. Ensaios de fermentação	39
5.12.1 Ensaio para determinação do pré-inóculo	39
5.12.2 Ensaios de fermentação com hidrolisados	40
Resultados e Discussão	42
6.1. Caracterização	42
6.2. Pré-tratamento químico	43
6.3. Separação da fase líquida	46
6.4. Clarificação	47
6.5. Hidrólise enzimática	50
6.6. Microscopia eletrônica de varredura	54
6.7. Ensaios de determinação de pré-inóculo	55
6.8. Fermentação	57
6.8.1. Fermentação do hidrolisado	58

6.8.2. Sacarificação simultânea a fermentação do resíduo celulo		
	6.8.3. Sacarificação simultânea a co-fermentação de glicose e galactose.	60
(6.9. Potencial de Kappaphycus alvarezii para a produção de bioetanol	62
7.	Considerações Finais	66
8.	Conclusões	67
9.	Perspectivas futuras	68
10.	Bibliografia	70

Lista de abreviaturas

CBP: Consolidated Bioprocess, Bioprocesso Consoliado

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Centro de Biodiversidade de Fungos

CLAE: Cromatografia Liquida de Alta Eficiência

DNS: Ácido Dinitrosalicílico

GEE: Gases de Efeito Estufa

GOD: Glicose Oxidase

HMF: Hidroximetil Furfural

PHE: Pré-Hidrólise Enzimática

RC: Resíduo Celulósico proveniente da alga

SHF: Separate Hydrolysis and Fermentation, Hidrólise Separada da Fermentação

SSCF: Simultaneous Saccarification and Co-Fermentation, Co-Fermentanção Simultânea a Sacarificação

SSF: Simultaneous Saccarification and Fermentation, Fermentação Simultânea a Sacarificação

1. Apresentação

Biocombustíveis são fontes de energias derivadas de matérias-primas de origem biológica, renováveis, que incluem formas líquidas como o bioetanol ou o biodiesel e formas gasosas como biogás e hidrogênio (Goldemberg e Johansson, 2004). Devido à crise do petróleo nos anos de 1973 a 1975 foram criadas em vários países empresas produtoras de etanol. No Brasil, a produção de bioetanol trouxe uma série de vantagens para a sociedade, como a geração de renda, a redução de divisas com importação de petróleo, a minimização das emissões gasosas e a fixação do homem no campo diminuindo o problemático êxodo rural. Esta iniciativa brasileira colocou país como líder e pioneiro na produção de um biocombustível em larga escala (Lora e Andrade, 2009).

Os biocombustíveis atualmente são a chave para a redução da dependência do petróleo e para a redução da emissão de gases de efeito estufa (GEE), principalmente o CO₂ e o metano (Koh e Ghazoul, 2008). Estudos nos últimos 15 anos demonstram que o uso de biocombustíveis pode resultar numa redução das emissões de GEE de 31% para o bioetanol (1G, a partir de açúcares da cana-de-açúcar e do milho) e de 71% de bioetanol celulósico (2G, a partir de o resíduo lignocelulósico, principalmente, gerados pela produção do etanol 1G e também da indústria de papel e celulose) (Koh e Ghazoul, 2008).

Os biocombustíveis trazem as seguintes vantagens: são facilmente produzidos a partir de diversas fontes de biomassa; são biodegradáveis e contribuem para a sustentabilidade; permitem a mistura, em diversas proporções, com os combustíveis fósseis sem perda do desempenho automotivo; não há alterações profundas na logística de distribuição de combustíveis, uma vez que se podem aproveitar as existentes, sem custos adicionais ou muito reduzidos para os postos de abastecimento; a sua combustão é neutra em relação ao CO₂, pois o carbono emitido é

posteriormente capturado pela biomassa, em seu sofisticado processo de fotossíntese.

Dada à concorrência aos produtos alimentares, criada pela procura de matéria-prima para a obtenção de álcool, vislumbra-se atualmente a utilização de algas como fonte de açúcares para a produção de biocombustíveis (3G, a partir de biomassa marinha, macro e microalgas) e outras substâncias químicas, dentro do conceito de Biorrefinaria.¹

As algas marinhas são abundantes na biosfera, desenvolvem-se em água salgada e não apresentam concorrência com áreas agrícolas. Além disso, o cultivo de macroalgas não necessita de insumos, como fertilizantes e defensivos agrícolas e independe de irrigação. Registram-se também grandes desenvolvimentos com técnicas de cultivo, em particular em países do sudeste asiático.

Esses organismos são ricos em polissacarídeos e produzem uma grande quantidade de biomassa devido à alta eficiência na captação de energia luminosa e CO₂, possuindo um baixo custo de produção (Kumar et al, 2006). Outra vantagem intrínseca à sua estrutura, comparada à biomassa residual lignocelulósica, base da produção de biocombustíveis de segunda geração, é a ausência de lignina, que acrescenta custos ao pré-tratamento para sua remoção, pois esta macromolécula polifenólica constitui-se a principal barreira para hidrólise enzimática da celulose.

Dadas todas estas vantagens as macroalgas vêm sendo consideradas como potenciais matérias-primas para a produção de etanol em grande escala, assunto que foi incorporado ao conjunto de linhas de pesquisa dos

¹ Biorrefinaria é um conceito relativamente novo que se relaciona ao aproveitamento da biomassa para a produção de combustíveis e variadas substâncias químicas, incluindo a geração de energia, com as mínimas emissões.

Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos da Escola de Química, UFRJ, liderados pelo Prof. Nei Pereira Junior.

Tendo isso apresentado, esse trabalho expõe no capitulo 2 as principais características e aplicações das macroalgas, as principais formas de cultivo e formas de extração da carragena, principal produto da *Kappaphycus alvarezii*, matéria-prima foco dessa tese.

Nos capítulos 3 e 4 são apresentadas a justificativa e os objetivos desse trabalho.

No capítulo 5 estão descritas as metodologias e os materiais empregados no desenvolvimento da tese.

Por fim, apresentado no capitulo 6, estão os resultados obtidos experimentalmente, discutidos e comparados com dados recentes da literatura com a mesma temática, produção de etanol a partir de macroalgas.

A partir do desenvolvimento desse projeto foram produzidos os seguintes trabalhos e publicações:

Resumo:

Hargreaves, P. I.; Cruz, P. E. R.; Campos, C. M.; Loureiro, P. A. R.; Costa, A. C. A.; Pereira Jr., N. Bioethanol production from macroalgae: Third generation biofuel. 33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals May 2-5, 2011, Seattle – WA, EUA

Trabalho completo:

Hargreaves, P. I.; Cruz, P. E. R.; Campos, C. M.; Loureiro, P. A. R.; Costa, A. C. A; Pereira Jr, N. Produção De Etanol A Partir de *Kappaphycus alvarezii* - Biocombustível de Terceira Geração. In: Congresso Brasileiro De Oceanografia - CBO 2012, 2012, Rio De Janeiro. Congresso Brasileiro De Oceanografia - 2012, 2012. V. 0. P. 1703-1708.

Artigo Científico:

Hargreaves, P. I.; Barcelos, C. A.; Costa, A. C. A.; Pereira Jr., N. Production of Ethanol 3G from *Kappaphycus alvarezii*: Evaluation of Different Process Strategies. Bioresource Technology, V. 134, P. 257-263, 2013.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Macroalgas

A alga é uma formação vegetal existente nos mares e oceanos capaz de realizar a fotossíntese e servir de alimento e abrigo para muitas espécies de organismos aquáticos. Geralmente, é dito que a vida no planeta teve início no mar e, até cerca de 450 milhões de anos, todas as plantas eram marinhas (Vidoti & Rollemberg, 2004).

Estas biomassas compõem um grupo muito diverso de organismos, fotossintetizadores, não vasculares, providos de estruturas reprodutivas desprotegidas, produtoras de esporos e desprovidas de flores e sementes. São denominadas talófitas, ou plantas inferiores, por não apresentarem uma estrutura vegetal diferenciada em raiz, caule e folhas (Hoek et al, 1998).

Em termos bioquímicos e fisiológicos, as algas são semelhantes em muitos aspectos às outras plantas, tendo as mesmas vias bioquímicas básicas. Possuem clorofila A como pigmento fotossintético e carotenóides (β-caroteno e fucoxantina), ficocianina e ficoeritrina como pigmentos acessórios. Os polissacarídeos e as proteínas biossintetisados, presentes nas algas, são também comparáveis aos das plantas superiores (Hoek et al, 1998, South e Whittick, 1987).

Estes organismos são um importante elo da cadeia alimentar, pois possuem um papel fundamental na manutenção da vida marinha. As algas marinhas possuem importância tanto do ponto de vista econômico, como ambiental e social por diversas razões: são responsáveis pela elevada taxa de fotossíntese do bioma marinho; importantes produtoras de O₂ e matéria orgânica; proporcionam alimento e abrigo aos organismos do bioma, suportando a continuidade da fauna existente.

Devido às suas propriedades gelificantes, espessantes, estabilizantes e emulsionantes são usadas como matéria-prima nas indústrias cosmética,

farmacêutica e alimentar, dentre muitas outras, graças aos colóides extraídos de diversas espécies (agaranas, carragenas e alginatos).

A ciência que estuda as algas denomina-se Ficologia e os três principais grupos de macroalgas em que se dividem são: Phaeophyta (algas pardas, ou marrons), Chlorophyta (algas verdes) e Rhodophyta (algas vermelhas). Suas composições médias estão indicadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Composição química aproximada das algas marinhas (Faccini, 2007).

Componente	Algas pardas (%)	Algas vermelhas (%)	Algas verdes (%)
Água¹	75 - 90	70 - 80	70 - 85
Minerais ²	30 - 50	25 - 35	10 - 25
Carboidratos	$30 - 50^3$	30 - 60 ⁴	25 - 50 ⁵
Proteínas	7 - 15	7 – 15	10 - 15
Lípidios	2 - 5	1 – 5	1 – 5
Celulose	2 - 10	2 - 10	20 - 40

¹do peso fresco; ²do peso seco; ³principalmente alginato e fucose; ⁴poligalactanas sulfatadas e xilanas; ⁵celulose e amido principalmente.

Mundialmente, são cultivadas ou coletadas para uso comercial ou subsistência, 221 macroalgas marinhas sendo: 32 da divisão Chlorophyta, 125 da divisão Rhodophyta e 64 da divisão Phaeophyta (Zemke-White & Ohno, 1999). Parte desse cultivo são para alimentação, sendo os mais importantes, nori (Porphyra spp., vermelha), o kombu (Laminaria spp., parda) e o wakame (Undaria sp., verde)(Faccini, 2007). Já para produção de hidrocolóides de alga, as principais algas são Gracilaria e Gelidium, para extração de ágar, Laminaria japonica e Lessonia nigrescens, para alginato e Kappaphycus alvarezii e Eucheuma denticulatum, para carragenas (Bixler & Porse, 2011).

2.2. Chlorophytas

A Chlorophyta é a maior e mais diversa divisão das algas apresentadas e presume-se que deste grupo originaram-se as plantas terrestres. A divisão com predomínio de espécies marinhas é a *Ulvophyceae* (Raven et al 1996), a qual *Ulva lactuca* pertence (figura 2.1).



Figura 2.1. Ulva lactuca, conhecida também como alface-do-mar (algaebase.org).

Essas algas são ubíquas, encontradas em águas doce, marinha e também em ambientes terrestres, possuem clorofila do tipo a, b, pigmentos acessórios, β e γ -caroteno e outras xantofilas. Sua reserva energética é o amido, que fica armazenado dentro dos cloroplastos, diferindo das outras algas eucariontes (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Em ambiente natural, as algas verdes tem em sua composição (tabela 2.2), aproximadamente, 85% de água, e em massa seca, destacam-se a celulose e ulvana, que é constituída basicamente por uma cadeia de raminose sulfatada ligada a ácido urônico (Jaulneau et al, 2010).

Tabela 2.2. Composição média de *Ulva* spp. em massa seca (Bruton et al, 2009).

Componente	(% m/m)
Celulose	18
Ulvanas	20
Amido	2
Sulfatos	8
Proteínas	19
Lipídeos	2
Cinzas	24
Pigmentos	<1

2.3. Phaeophytas

As algas pardas são multicelulares, com características variando de finos filamentos ramificados a grandes e complexas estruturas, e apesar de serem predominantemente marinhas, principalmente em águas temperadas frias e

polares, mas podem ser encontradas em água doce e até ambientes terrestres (figura 2.2) (Barsanti & Gualtieri, 2006, Raven, 1996).



Figura 2.2. Saccharina groenlandica, da família Laminariaceae (seaweedsofalaska.com).

A coloração dessas algas se deve pela preponderância de carotenoides, principalmente a ficoxantina, sobre a clorofila, resultando na coloração parda, em vez do verde, comum em plantas. Os membros dessa divisão possuem clorofilas do tipo *a*, C1, C2 e C3, e pigmentos acessórios, β-caroteno, ficoxantina e xantofila (Barsanti & Gualtieri, 2006).

A composição das algas pardas varia de acordo com espécie, localização, temperatura e salinidade, e com média de umidade em torno de 85% e em massa seca, possui até 60% de açucares fermentáveis (tabela 2.3).

Tabela 2.3. Perfil bioquímico representativo de algas pardas (Bruton et al, 2009).

Componente	(% m/m)
Celulose	6
Lipídios	2
Proteínas	12
Alginatos	23
Laminarina	14
Manitol	12
Fucoidana	5

As paredes celulares das feofíceas são constituídas de celulose e uma matriz mucilaginosa de ácido algínico (alginato), que fornece flexibilidade e resistência, ajudando a reduzir a dessecação durante a exposição nos períodos de maré baixa. As principais reservas de energia polissacarídica das algas

pardas são a laminarina, uma glucana com ligações β-1-3 e o manitol (Raven et al, 1996).

2.4. Rhodophytas

As macroalgas desta divisão são principalmente marinhas e estão presas a rochas, paredes oceânicas, sobre conchas ou a outras algas (Raven et al, 1996, Hoek et al, 1998). São mais abundantemente encontradas em regiões quentes próximas ao equador, porém podem ser encontradas também em regiões de águas frias (Hoek et al, 1998, Lee, 1999). Caracterizam-se por possuírem como pigmentos a clorofila a e d, carotenóides e ficobilinas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina).

Dentre todas as macroalgas, as vermelhas representam o grupo com maior diversidade de espécies, incluindo aproximadamente 6.000, divididas por 500-600 gêneros. São muito comuns ao longo da costa brasileira.

A cor vermelha das algas é devida à maior quantidade de pigmentos vermelhos das ficobilinas em relação ao pigmento verde da clorofila.

Os pigmentos de cor vermelha têm a finalidade de permitir a fotossíntese da alga numa determinada parte do espectro da luz. Dentro das ficobilinas, os dois pigmentos com maior importância são a ficocianina e a ficoeritrina. A ficoeritrina absorve a cor verde, amarela e vermelha, enquanto a ficocianina absorve a luz azul, verde e amarela. Estas partes do espectro são o tipo de luz que mais penetra o fundo do mar. Assim, as algas vermelhas conseguem sobreviver em condições com baixa luminosidade onde as algas verdes não conseguiriam (Hoek et al, 1998). A maior diversidade dos pigmentos das macroalgas (figura 2.3) em comparação os vegetais superiores, as tornam mais eficientes na conversão de luz e CO₂ em biomassa, pois se beneficiam de um espectro mais amplo da energia luminosa.

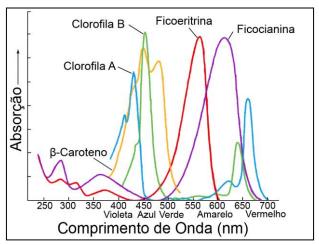


Figura 2.3. Índice de absorção (%) dos pigmentos no espectro de luz visível (Purves et al, 1998).

A intensidade luminosa tem um efeito sobre o pigmento vermelho que se reflete na cor das algas. Com elevados níveis de luz, o pigmento começa a decompor-se e as algas tornam-se rosas ou mesmo brancas, com baixos níveis de luminosidade, a produção de pigmentos é intensificada e assim as algas mantêm-se vermelhas (Hoek et al, 1998).

O material de reserva das algas vermelhas é o chamado "amido florídeo", um polímero constituído por α -D-glucose, com ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4) e pontos de ramificação no carbono-6 similar à amilopectina. Possui, porém, uma proporção maior de ramificações assemelhando-se ao glicogênio animal (Chapman et al, 1993).

A sua parede celular consiste numa rede de polissacarídeos como a celulose, coberta por mucilagens de galactose, as carragenas (Hoek et al, 1998).

2.5. Kappaphycus alvarezii

Apesar de pertencer ao grupo das algas vermelhas, a sua cor varia muito e são comuns cores como vermelho, castanho, amarelo ou diferentes tonalidades de verde (figura 2.4). Esta espécie pode atingir até 1 metro de comprimento com os ramos mais grossos, chegando a pesar mais de 1 kg

(peso úmido). O talo é bem ramificado, com ramos dispostos irregularmente em todos os planos (Hayashi, 2007).



Figura 2.4. Variações nas tonalidades de Kappaphycus alvarezii (Agriculturasp).

Os ramos afinam para o ápice, e em geral, terminam em ponta (figura 2.5). Esta espécie de alga tem uma elevada taxa de crescimento, é encontrada geralmente em áreas rasas e adapta-se bem a altos níveis de iluminação. Prefere águas claras e limpas, mas suporta águas turvas causadas por sedimentação em suspensão, quando não são constantes ou por períodos muito prolongados. Cresce numa temperatura entre 20°C e 32°C, concentrações de amônia e de nitrato de aproximadamente 1 a 2 µmol e de fósforo de 0,5 a 1 µmol são suficientes (Hayashi, 2010).



Figura 2.5. Kappaphycus alvarezii (Paulo I. Hargreaves).

Na alga *Kappaphycus alvarezii* predominam as carragenas do tipo *kappa* e *iota*, onde os géis formados pelo primeiro são duros e quebradiços, e os formados pelo segundo, macios e elásticos. A diferença entre ambos os tipos é a presença de um éster sulfato no C₂ das unidades 3,6-anidrogalactose em carragenas do tipo *iota*, ausente nas unidades do tipo *kappa* (Hayashi, 2001). Além disso, pode servir no controle de poluição por metais pesados (Pb e Cd) (Trono, 1993).

Cerca de 120.000 toneladas secas/ano de *Kappaphycus alvarezii* são colhidas nas Filipinas, Indonésia e Tanzânia, sendo este organismo responsável por 70% das algas transformadas mundialmente para matéria-prima na produção de carragenas (Areces, 1995; McHugh, 2003).

O cultivo desta macroalga carragenófita iniciou-se em 1969 (Lim & Porse, 1981) nas Filipinas, inspirando assim outros países para a criação de técnicas de cultivo para esta espécie. Atualmente, nas Filipinas 85-90% do mercado de cultivo de macro algas é dominado por espécies do gênero *Kappaphycus* (Hurtado et al, 2001).

Durante 10 anos foram realizados vários ensaios para determinar as características favoráveis das linhagens para o cultivo comercial no Brasil, e os resultados foram promissores, destacam-se: a adaptação da espécie na região, com altas taxas de crescimento (entre 4,5 a 8% por dia), bom teor de carragenas durante todo o ciclo anual (entre 20 e 40% de carragena semirefinada, e entre 12 e 28% de carragena refinada) e a regularidade das variações sazonais destes dois parâmetros, que pode ser usada para a previsão e controle da produção (Pinto, 2009).

A sazonalidade do crescimento foi relacionada principalmente com a temperatura, observando-se maiores taxas de crescimento em épocas mais próximas ao verão, maiores valores de temperatura e radiação solar (Hayashi, 2001; Paula et al, 2001; Paula & Pereira, 2003; Hayashi, et al, 2006).

A espécie *Kappaphycus alvarezii* foi inserida experimentalmente em 1995, para estudos acadêmicos para a obtenção do conhecimento sobre a biologia deste clone e verificação da possibilidade de cultivá-la neste local sem danos ambientais, com intuito da produção comercial e suprir a demanda de carragena, devido a produção insuficiente de *Hypnea musciformis*, uma alga nativa (Ubatuba, São Paulo) (Paula, 2001).

Recentemente, no estado do Rio de Janeiro, uma empresa (Sete Ondas Biomar) produtora de carragenas está desenvolvendo um método de cultivo desta alga, uma vez que o processo atualmente implementado é bastante rudimentar, tanto no cultivo como na coleta da alga. A empresa cultiva algas nas condições de 33% de salinidade e 25 °C (valores da média anual) e utiliza como sistemas de cultivo suportes flutuantes, que consistem em redes ou cordas presas a balsas flutuantes (figura 2.6a), sendo as redes de nylon com 30 cm de abertura de malha (Goes, 2009).

Outro sistema de cultivo possível é por suportes imóveis (figura 2.6b), em que as algas são presas a redes ou cordas que, por sua vez, são fixadas a postes cravados no fundo. A fixação direta no fundo, apesar de ser simples e barata, tem produtividade mais baixa devido às perdas por dispersão e consumo por animais marinhos, no entanto é a técnica de cultivo mais difundida.

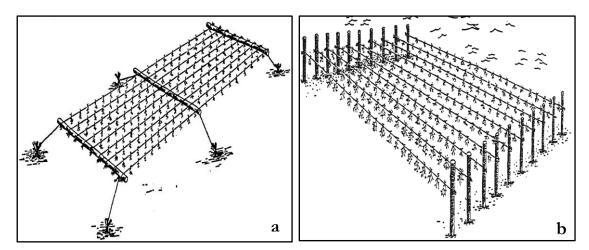


Figura 2.6. Sistemas de cultivos de macroalgas, bolsas flutuantes (a) e suportes fixos (b) (Trono, 1993).

2.5.1. Parede celular de Kappaphycus alvarezii

Na parede celular e na matriz intercelular de *Kappaphycus*, está localizada a carragena, na forma amorfa da matriz hidrossolúvel, e na matriz insolúvel é encontrada majoritariamente a celulose cristalina (53% massa seca) (Hoffmann et al, 1995) (figura 2.7).

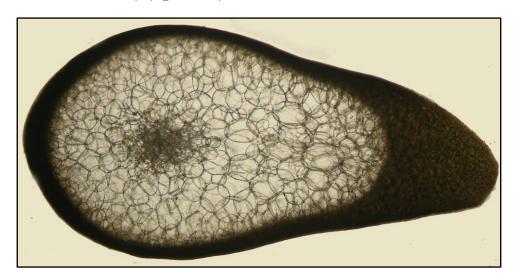


Figura 2.7. Imagem de um corte transversal de Kappaphycus alvarezii (Lizette Quan Young).

A parede celular também contêm manose (4,6% massa seca) e galactose (10,3% massa) que provêm essencialmente da carragena residual (Lahaye & Thibault, 1990; Phillips, 1996). A composição na tabela 2.4 representa a composição global para as frações de *K. alvarezii*.

Tabela 2.4. Composição da Kappaphyeus alvarezii (Lechat et al, 1997).

Composição massa seca (mol%)			
Extrato solúvel	78,7 – 81,7	Resíduo insolúvel	18,3 – 21,3
Galactose	30,0 - 33,2	Glicose	69,6 – 70,9
3,6 anidrogalactose	22,8 - 27,2	Galactose	9,4 – 9,6
6 -O- metil galactose	0,9 - 1,4	3,6 anidrogalactose	3,8-4,1
Glicose	1,8-2,6	Manose	3,6-4,1
Xilose	0,8 – 0,9	Xilose	1,2-1,5
Sulfato	35,8 – 42,0	Sulfato	10,2-11,3

2.5.2. Carragena

As carragenas são conhecidas desde o século XIX, quando eram extraídas da alga vermelha *Chondrus crispus* e utilizadas pela população da cidade irlandesa de "Carraggen", como agente emulsionante e gelificante em alimentos caseiros (Noseda, 1994).

Atualmente, o termo "carragena" descreve uma classe de galactanas sulfatadas, lineares e solúveis em água, que ocorrem como um constituinte da parede celular de diversas espécies de algas marinhas vermelhas (Tojo & Prado, 2003). Em outras palavras, carragena é um termo coletivo para polissacarídeos extraídos de algas vermelhas (Rhodophyta). Diferentes algas produzem diferentes carragenas. As galactanas apresentam uma estrutura básica constituída por unidades repetidas de D-galactose e resíduos de 3,6-anidro-D-galactose ligados em α-(1→3) (figura 2.7). Estas possuem uma estrutura regular, mas imprecisa, dependendo da fonte e das condições de extração. A maioria destes polissacarídeos é encontrada como polímeros aniônicos com variados níveis de sulfatação.

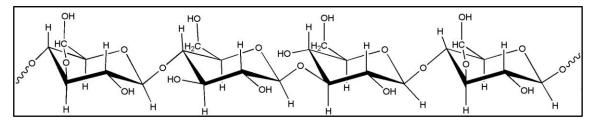


Figura 2.8. Estrutura básica de galactanas formadas por unidades repetidas de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose ligadas em α -(1 \rightarrow 3).

Existem três tipos de carragenas comerciais, *kappa, lambda* e *iota*, as quais podem ser distinguidas dependendo da quantidade de 3,6 anidro-D-galactose, e do grau de sulfatação (figuras 2.8a, 2.8b, 2.8c) (Dawes et al, 1974, Critchley, 1993).

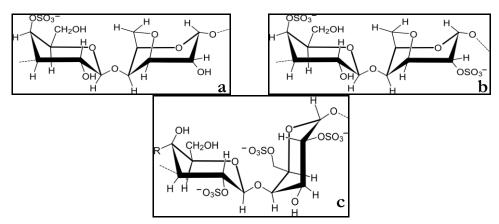


Figura 2.9. Representação das carragenas: kappa (a), iota (b) e lambda (c).

Dos três tipos de carragenas, o que apresenta maior demanda no mercado mundial é a carragena do tipo *kappa* (Critchley, 1993), sendo a alga *K. alvarezii* a principal fonte de produção. Atualmente, o Brasil importa mais de 90% de toda a carragena utilizada no país (Faccini, 2007).

2.5.3. Mercado

De acordo com a FAO (2013), a produção de *K. alvarezii* atingiu 1,85 toneladas em 2010, avaliadas em 265 milhões de dólares, e de acordo com Bixler & Porse (2011), nesse mesmo ano, a comercialização de carragena atingiu a marca de 500 milhões de dólares.

Os maiores produtores de *K, alvarezii*, são Indonésia e Filipinas, que produziram 85 mil e 60 mil toneladas de alga seca respectivamente no ano de 2009, só na Indonésia, a indústria de cultivo e processamento de carragena, pode atingir em vendas, cerca de 100 milhões de dólares (Bixler & Porse, 2011).

Essa carragena é usada como espessante, gelificante ou estabilizante na indústria alimentícia e cosmética, em doces, sorvetes, pastas, patês, embutidos, creme dental, pomadas e cremes. Devido à dependência na importação da carragena e outros produtos, indicada na figura 2.9, existe o aquecimento nacional no cultivo comercial dessas algas produtoras de ficocolóides.

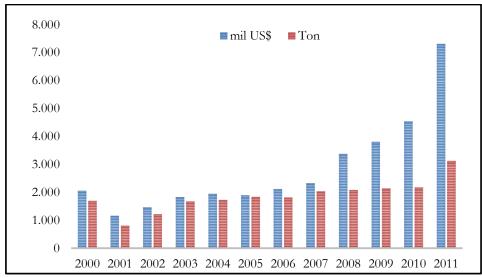


Figura 2.10. Importação de algas pelo Brasil. (Aliceweb, 2013)

2.6. Extração e produção de carragena

Segundo o guia da FAO (2003), para processamento industrial de algas, existem dois métodos para produção da carragena, a forma original, a única a ser utilizada até o início da década de 1980, onde a carragena é extraída para uma solução aquosa e todo o resíduo é filtrado, para que seja recuperada apenas a carragena.

No segundo método, a carragena não é efetivamente extraída do material algal, se baseia no princípio de que todo o material dispensável é dissolvido na solução alcalina, deixando a carragena e outros compostos insolúveis inalterados. Essa fração insolúvel consiste basicamente de carragena e celulose, que será lavada e secada ao sol, sendo vendida como carragena semi-refinada. Como a carragena não é purificada, torna o processo mais rápido e barato, comparada ao método original.

Independente da metodologia, a carragena comercializada não perde suas características mais importantes: gelificante, espessante, estabilizante, pois sua estrutura básica é mantida, mas para o uso na produção de biocombustível, ou como matéria-prima para outros bioprocessos, é preciso tornar os monossacarídeos que a compõe, disponíveis, para isso são empregados processos com maior grau de severidade.

2.7. Pré-tratamento químico e seus produtos

Os processos de pré-tratamento de biomassa residual vegetal tem como função prioritária a desorganização do complexo lignocelulósico. Para este estágio são empregadas condições brandas de grau de severidade, que é a combinação da temperatura, pressão, pH, tempo de exposição e relação sólido:líquido (Pereira et al, 2008).

No passado objetivava-se a hidrólise completa dos polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e o processo se dava de forma mais severa, já que a hidrólise da celulose requer condições mais drásticas do que para a hemicelulose. Além de desestruturar as fibras, era possível obter os açúcares na forma monomérica, mas devido ao rigor do processo, eram também formados diversos sub-produtos, em sua maioria inibidores de processos metabólicos, até mesmo tóxicos, sendo eles: hidroximetil-furfural (HMF) e seus subprodutos, ácido levulínico e ácido fórmico (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000).

Essa inibição foi ratificada por Modig et al (2002), confirmando que a inibição (competitiva) ocorre a nível enzimático. As enzimas como piruvato desidrogenase (PDH), aldeído desidrogenase (AIDH) e a álcool desidrogenase (ADH) são inibidas em presença de HMF e furfural (figura 2.10).

A formação de inibidores e tóxicos é minimizada no processo em condições brandas, chamado de pré-tratamento, já que não é direcionada para a hidrólise dos polímeros. Mesmo assim, ainda existe a formação desses compostos.

Para contornar os problemas de toxicidade do material pré-tratado, vários procedimentos têm sido utilizados, incluindo a precipitação de impurezas com a variação de pH (*overliming*), adsorção em carvão ativo, resinas de troca iônica, entre outros. Dentre estes procedimentos, destaca—se o uso de

carvão ativo, que vem sendo amplamente utilizado em processos de detoxificação (Carvalho et al, 2005).

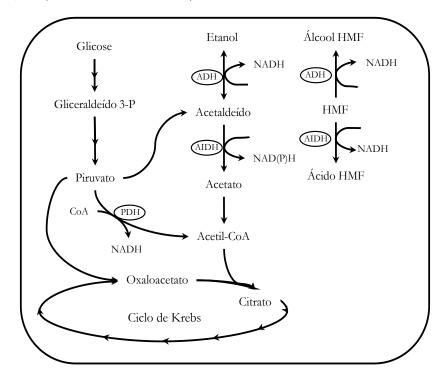


Figura 2.11. Esquema simplificado indicando as principais vias metabólicas da *S. cerevisiae* e as rotas com possíveis interações com HMF. Álcool HMF: Álcool 5-hidroximetil furfurílico, Ácido HMF: Ácido hidroximetil-2-furóico (Modig et al, 2002).

Os conhecimentos adquiridos com o aproveitamento de materiais de composição lignocelulósica, que envolve o fracionamento do complexo polissacarídico serão utilizados no processamento da biomassa algácea, levando-se em consideração as diferenças na suscetibilidade ao ataque hidrolítico, seja químico ou enzimático, sendo esperado como produto do pré-tratamento das algas, uma fração solida, menos suscetível às condições de processo, contendo principalmente a celulose e na fração liquida, susceptível à hidrólise ácida, produtos da degradação dos ficocolóides, no caso da carragena, a galactose, a 3,6-anidro-galactose e 6-O-metil galactose.

2.8. Hidrólise enzimática da fração celulósica

Na hidrólise enzimática, a catálise é mediada por um complexo enzimático. No caso das enzimas de fungos filamentosos, esse processo é

catalisado por três grupos principais de enzimas: endoglucanases, exoglucanases e β-glucosidase, que apresentam atividade em condições brandas de pressão e temperatura, tendo a grande vantagem de não serem gerados os conhecidos inibidores do processo fermentativo, como sinalizado anteriormente.

É aceito que para hidrólise enzimática da celulose (figura 2.11) ocorre a ação sinérgica das endoglucanases, exoglucanase ou celobiohidrolases e β-glucosidase (Lynd et al, 2002).

As endoglucanases hidrolisam as ligações β -1,4-glicosídicas das cadeias amorfas de celulose, não cristalinas, de forma aleatória, produzindo assim rupturas na fibra. Nas extremidades, tanto redutora como não redutoras da cadeia, as exoglucanases podem se ancorar e em seqüência liberar celobioses ou glicoses solúveis. Então, as β -glucosidases podem hidrolisar as moléculas de celobiose e assim eliminar a conhecida inibição das enzimas pelos produtos de hidrólise. Estas reações, esquematizadas na figura 2.11, ocorrem simultaneamente (Zhang & Lynd, 2004).

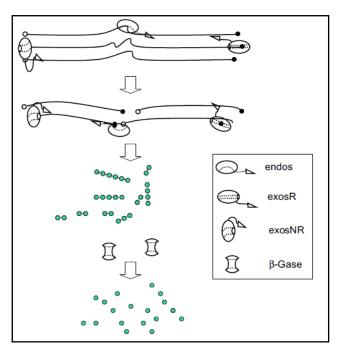


Figura 2.12. Esquema da ação das celulases não complexadas, endos: endoglucanase, exosR: exoglucanase específica para terminal redutor, exosNE: exoglucanase específica para terminal não redutor, β-Gase: beta glucosidase (Zhang et al, 2006).

As celulases são enzimas relativamente caras e a redução de seu custo faz-se necessária para o uso comercial em Biorrefinarias. Para que o emprego da hidrólise enzimática se torne economicamente viável, devem-se perseguir as seguintes metas: aumento da produtividade volumétrica, produção de enzimas (*in plant production*) com substratos baratos, produção de preparados enzimáticos com maior estabilidade e maior atividade específica sobre substratos sólidos (Moreira, 2005).

2.9. Fermentação da galactose

O metabolismo da galactose requer a síntese de numerosas enzimas, incluindo a galactose permease (*GAL2*), galactoquinase, hexose-1-fosfato uridiltransferase e UDP-glucose-4-epimerase (Lohr et al, 1995). A exceção da *GAL2*, que está envolvida no transporte de galactose através da parede celular e para o citoplasma, todas as outras enzimas são constituintes da via de Leloir (figura 2.12), que é uma via de transformação da galactose em glicose intracelularmente.

Galactose e glicose diferem molecularmente no carbono 4, onde o grupo hidroxila possui orientação oposta em cada um dos compostos (Lohr et al, 1995). Apesar dos sistemas de metabolismo de glicose e galactose serem parecidos (cerca de 60 % de similaridade de sequência), estes possuem algumas diferenças. A galactose usa um frágil transportador proteico e uma complexa sequência de fosforilação, transporte e epimerização, antes da glicólise.

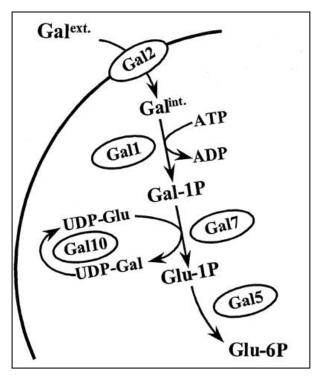


Figura 2.13. Via de Leloir, contendo as enzimas responsáveis pelo transporte da galactose para dentro da célula e sua transformação em glucose-6-fosfato (Ostergaard et al, 2001).

A utilização da galactose por Saccharomyces cerevisiae é mediada pela via de Leloir, após a internalização pela galactose permeasse (GAL2) onde o açúcar é fosforilado a galactose-1-fosfato pela galactoquinase (GAL1). Na sequência, a galactose-1-fosfato é então isomerizada a glicose-1-fosfato pela galactose-1-fosfato uridiltransferase (GAL7). A fosfoglucomutase e fosfomanomutase (GAL5/PGM2) convertem glicose-1-fosfato em glicose-6-fosfato, que então pode ser direcionada tanto para a via glicolítica ou para a via das pentoses-fosfato.

Os principais reguladores de transcrição dos genes *GAL* dessa via são a *GALA* e *GAL80*, que são fortemente reprimidas na presença de glicose, impedindo a produção de todos os genes relacionados à assimilação e transformação da galactose. A *GALA* é o ativador do gene, enquanto a *GAL80* é o regulador negativo, que na presença de glicose forma proteínas que se acoplam a porção da *GALA* (Lee et al, 2010).

Além desses reguladores citados anteriormente, GAL6 é conhecida também por regular negativamente os genes GAL (GAL1, GAL2 e GAL7),

afetando a degradação dos RNA mensageiros (mRNA) transcritos dos gene *GAL* (Ostergaard et al, 2001).

Alguns trabalhos indicam duas abordagens para melhorar a fermentação da galactose. Uma delas é retirar os genes de regulação negativa (os que inibem a produção de enzimas da via Leloir, *GAL6*, *GAL80* e *MIG1*) e superexpressando a *GALA*. Essas alterações indicaram um aumento de 19% na internalização da galactose e um aumento de 154% na produção de etanol, comparada com a linhagem parental (Ostergaard et al, 2000).

A outra forma é superexpressar a *PGM2*, que é o gene responsável pela codificação da fosfoglucomutase. Com essa alteração foi possível aumentar em 70 % a absorção da galactose, comparada com a linhagem parental (Bro et al, 2005).

Estes resultados sugerem que o fluxo metabólico para o uso da galactose pode ser aumentado tanto por alterações na rede de regulação (*GAL* 4 e *GAL80*), ou perturbação de uma única enzima metabólica (Lee et al, 2010).

Apesar da forte repressão causada pela presença de glicose na via de Leloir, algumas linhagens como a apresentada por Keating et al (2004), indicam uma preferência não convencional dos açucares, sendo a galactose assimilada em preferência a glicose, mas em seu trabalho não indica qual mecanismo está sendo utilizado, ou qual regulação negativa está oprimida ou apagada em seus genes.

2.10. Biorrefinaria 3G

O conceito de biorrefinaria é análogo ao conceito básico das refinarias de petróleo, produzir diversos combustíveis e outros produtos a partir de uma determinada matéria-prima. A competitividade econômica se dá pela produção de co-produtos de alto valor agregado em adição aos de baixo valor agregado, onde se encontram os biocombustíveis. Descrita de forma sucinta por de Jong et al (2009): "Processamento sustentável da biomassa em uma gama produtos e energia vendáveis". Alguns dos processos e produtos que podem ser obtidos de biomassa são apresentados na figura 2.13.

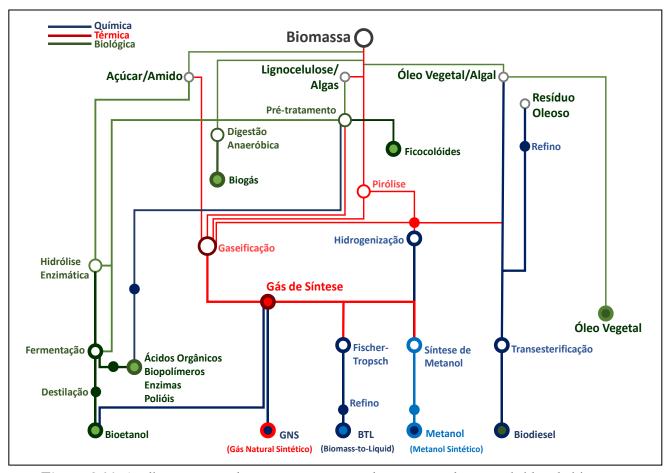


Figura 2.14. As diversas rotas de conversão e os produtos que podem ser obtidos de biomassa (King et al, 2010)

Com base na proposta sustentável da biorrefinaria, baseada na biomassa algal, é preciso separar os componentes de maior valor agregado, como os ficocolóides, que possuem direcionamento a produtos médicos, cosméticos e alimentos funcionais, variando seu grau de pureza.

Oriundo do processamento para obtenção dos produtos de maior valor agregado, há a geração de resíduos (celulose e monossacarídeos), que seguindo o conceito do aproveitamento integral da biomassa, será aproveitada para produção de outros produtos, com destaque aos biocombustíveis.

Destacando a produção do etanol, para complementação e até mesmo a substituição dos combustíveis fósseis, é considerada, há mais de 40 anos, como a mais viável devido à sua tecnologia de produção consolidada e madura. Essa tecnologia utilizada atualmente, denominada de 1G (primeira geração), é baseada principalmente no uso de cana-de-açúcar e milho e têm sofrido, em diversos países, críticas, em decorrência do conflito combustível versus produção de alimento, para seu cultivo.

O etanol 2G (segunda geração), apesar de contornar esse conflito, tendo como base o uso dos resíduos lignocelulósicos gerados pela agroindústria, principalmente os provenientes da produção 1G e da indústria de papel e celulose, tem como barreira a viabilidade econômica pelo custo de biodisponibilização dos açúcares dessas biomassas, que são naturalmente recalcitrantes, principalmente pela presença de lignina.

Sendo apresentadas algumas das dificuldades encontradas para expansão (1G) e também da implantação de novas tecnologias (2G), acreditase que o etanol produzido a partir de biomassa algal, através da fermentação possa ser uma suplementação, ou alternativas as tecnologias 1G e 2G.

Na tabela 2.5, são apresentadas algumas das macroalgas, as formas de pré-tratamento e sacarificação, agentes fermentadores e rendimento da biomassa em etanol, podendo notar claramente o interesse recente na produção do etanol 3G, além da diversidade de algas e variedade de processamento dessa biomassa, tecnologia com grande margem para desenvolvimento.

		Tempo e estratégia	etanol (g/g de alga)	
Kappaphycus alvarezii	0,9 N H ₂ SO ₄ a 120 °C por 60 min	Saccharomyces cerevisiae NCIM 3455, SHF, 96 h	15,40%	Khambhaty et al (2012)
Kappaphycus alvarezii	0,2% H ₂ SO ₄ a 130 °C por 15 min	Saccharomyces cerevisiae SHF, 24h	1,31%	Meinita et al (2012)
Gracilaria salicornia	2% H ₂ SO ₄ at 120 °C por 30 min e cellulase a 40 °C	Escherichia coli KO11, SHF, 48 h	7,90%	Wang et al (2011)
Gelidium elegans	Tratamento enzimático 50 °C por 120 h pH 5.5	Saccharomyces cerevisiae IAM 4178, SHF, 48h	36,70%	Yanagisawa et al (2011)
Sargassum sagamianum	Liquefação térmica a 200 °C e 15 MPa por 15 min.	Pichia stipitis CBS 7126, SHF, 48 h	10,00%	Yeon et al (2011)
Laminaria japonica	0,1 N HCl, 121 °C for 15 min e Celluclast 1,5 L, Viscozyme L, 50 °C e 150 rpm para sacarificação	Escherichia coli KO11, SSF, 72 h	16,10%	Kim et al (2011)
Laminaria hyperborea	Cominuição e lavagem em água pH 2 at 65 °C	Pichia angophorae, SHF, 48h	0,86%	Horn et al (2000)
Saccharina latissima	Moagem e tratamento enzimático para sacarificação	Saccharomyces cerevisiae Ethanol Red, SSF, 48 h	0,47%	Adams et al (2009)
Laminaria digitata	Moagem e tratamento enzimático para sacarificação	Pichia angophorae, SSF, 96 h	13,20%	Adams et al (2011)
Laminaria japonica	0,1 M H ₂ SO ₄ a 121 °C, 1 h e seguida de hidrólise enzimática	Saccharomyces cerevisiae, SHF, 36 h	11,30%	Ge et al (2011)
Laminaria japonica	Moagem e tratamento a 120 °C por 15 min	Pichia stipitis KCTC7228	2,90%	Lee e Lee (2012)

Tabela 2.5. Produção de etanol a partir de algas por fermentação.

SHF: Sacarificação separada da fermentação, SSF: Sacarificação simultânea a fermentação. (Daroch et al, 2012)

O crescente interesse pela biomassa algal se deve às características citadas em tópicos anteriores, como o rápido crescimento e vantagem sobre os cultivos terrestres por não competir com áreas agrícolas, não necessitar de insumos nem de irrigação, mas principalmente pela menor resistência à sacarificação.

Os produtos da sacarificação dependerão do tipo de alga; as algas pardas possuem como principal componente a laminarina, que é um polissacarídeo de glicose e também manitol, as algas verdes contém celulose e o amido como fonte de reserva energética e as algas vermelhas possuem a carragena ou ágar, ambos polímeros de galactose modificada, considerando também que todas as classes possuem celulose como parte da parede celular.

Considerando os carboidratos fermentáveis, principalmente glicose, galactose, manitol e xilose, além do alginato, os principais micro-organismos estudados para viabilização da produção de etanol 3G são Saccharomyces cerevisiae, Pichia stipitis e Pichia angophorae, destacando a primeira, capaz de

fermentar muito bem a glicose pela via fermentativa e galactose pela via acessório de Leloir, dependendo da linhagem avaliada e também a bactéria *Escherichia coli*, bastante utilizada por permitir diversos tipos de variações genéticas, para produção de enzimas específicas.

2.11. Estratégias de fermentação dos hidrolisados da biomassa algal

Baseado nos avanços tecnológicos apresentados nos itens 2.4 e 2.5, ambos descrevendo aplicações e suas adaptações das biomassas lignocelulósicas para biomassa algal, é possível também fazer uma relação com as estratégias de condução de bioprocessos para produção de etanol.

A figura 2.14 representa diversas escalas na evolução das estratégias na condução das fermentações na produção de bioetanol de segunda geração. Sendo o SSCF a possível estratégia a ser conduzida para biomassa algal, tendo em vista a capacidade da assimilação e fermentação da glicose (representado pela "Fermentação C6") e galactose (representado pela "Fermentação C5") pela *S. cerevisiae* selecionada para o desenvolvimento deste presente projeto e realizando a hidrólise enzimática no mesmo reator, simultânea a fermentação.

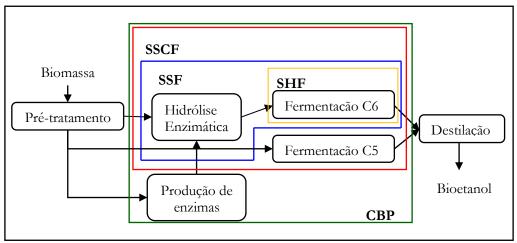


Figura 2.15. Representação das plataformas bioquímicas: SHF (Separate 2.12. Hydrolysis and Fermentation), SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation), SSCF (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation) e CBP (Consolidated Bioprocessing)

preço competitivo à gasolina. Para isso, o custo de cultivo e produção devem ser baixos, e, nesse sentido, a produção de etanol 3G tem grande potencial.

O cultivo da alga é simples, os custos de implantação não são elevados, assim como a sua manutenção; possuiu 5 ou mais coletas por ano e aliado ao potencial de 8.000 km da costa brasileira para essa atividade, a produção do etanol 3G está limitada à economicidade do processo de produção.

Em busca dessa viabilidade econômica diferentes processos estão sendo estudados, baseados principalmente nos avanços alcançados para o desenvolvimento do etanol 2G, seja nos pré-tratamentos físico-químicos, ou nas hidrólises enzimáticas. Considerando-se a maior diversidade de polissacarídeos encontrada nas algas, cada uma delas poderá possuir um processo diferente para seu aproveitamento, criando assim diversas oportunidades para pesquisa e desenvolvimento.

Os avanços já realizados com o uso de biomassa algal indicam que os processos são promissores, o mesmo acontece para o cultivo das algas, podendo ser desenvolvida a mecanização dos cultivos comerciais, além de outros avanços numa atividade que é atualmente manual e quase artesanal em todo o mundo.

Mesmo que os cultivos comerciais não sejam destinados inicialmente para a produção do etanol 3G, o mesmo certamente será um incentivo para a implementação e concretização da produção em grande escala de algas, para abastecer o mercado nacional de produtos oriundos do processamento dessa biomassa marinha.

Além do potencial para produção de etanol, o cultivo de algas pode ter um forte impacto socioeconômico em regiões onde tem ocorrido um declínio da pesca comercial, trazendo fonte de renda a pescadores e suas famílias.

3. Justificativa

Além da notada demanda de etanol no Brasil, considerando que 72% dos veículos (carros leves a caminhões) produzidos são bicombustíveis (ANFAVEA 2010), existe pressão para redução dos preços tanto do etanol, quanto da gasolina, que recebe 25% de etanol para mistura comercializada.

Nesse contexto, o aumento de produção e rendimento de etanol a preços reduzidos, durante todo o ano, sem grande variação, existente na produção a partir de cana, exercida pela sazonalidade das safras, é a meta para todos os modelos de produção desse biocombustível, por esse motivo as macroalgas se encaixam nesse perfil.

Pela importância comercial da macroalga *Kappaphycus alvarezii* e pelos estudos de cultivo no litoral brasileiro, se torna uma candidata para o cultivo em larga escala, passo importante a ser tomado para implantação de um processo industrial, seja da extração e refino da carragena, mas principalmente para uma possível implantação de uma biorrefinaria com base na biomassa algal.

Considerando as vantagens da biomassa algal como o rápido crescimento, não requerer o uso de insumos agrícolas, tampouco de irrigação; não ocupar áreas agriculturáveis, e dada à escassez de estudos sobre esse assunto para produção de etanol, que é de grande interesse comercial mundialmente, este projeto se apresenta como portador de futuro e urge por geração de conhecimento novo a fim de se viabilizar esta tecnologia, apontando as vantagens de alguns modelos, indicando algumas barreiras e formas de transpô-las.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

O objetivo deste projeto é desenvolver uma tecnologia para a produção de bioetanol a partir da macroalga vermelha, *Kappaphycus alvarezii*.

4.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver um processo de pré-tratamento da biomassa algal;
- Definir condições da hidrólise enzimática da fração celulósica da macroalga;
- Desenvolver um processo fermentativo para produção de etanol, a partir dos açúcares gerados no pré-tratamento e na hidrólise enzimática, empregando uma linhagem de levedura Saccharomyces cerevisiae;
- Avaliar as diferentes formas de condução do bioprocesso e aperfeiçoar as condições de cultivo, incluindo os meios de propagação, produção;
- Realizar uma análise técnica (balanços de massa) com os resultados obtidos em bancada.

5. Materiais e Métodos

5.1. Matéria-prima

A macroalga estudada neste trabalho foi a espécie *Kappaphycus alvarezii* Doty (Doty) ex P.C. Silva, pertencente à Divisão Rhodophyta, Classe Rhodophyceae, Ordem Gigartinales e Família Solieriaceae, cedida pela empresa Ondas Biomar, cultivada em Parati, coletada em junho de 2010.

O material, disponibilizado pela empresa Ondas Biomar tem umidade aproximada de 25%, ainda com grande resíduo de sal marinho. Esse material foi lavado para remoção do sal e detritos, sendo então levado à estufa a 65 °C, com circulação de ar por 12 horas. Em seguida, o material foi cominuido em moinho de facas (Tecnal TE-680, peneira ø 5 mm).

5.2. Caracterização da matéria-prima

A caracterização da alga foi baseada na técnica descrita por Hoebler et al (1989). As amostras de alga e de seu resíduo celulósico foram cominuídas em moinho de facas com peneira de 0,25 mm de diâmetro (Tecnal TE-680), para obtenção da concentração de açúcares fermentáveis na alga lavada, seca e moída e no resíduo celulósico, produto do pré-tratamento ácido diluído.

Em cada frasco de rosca foram transferidas 100 mg de amostra (duplicata) e para controle das perdas de açúcar do ensaio, foram usados frascos com 50 mg de glicose e um segundo conjunto com 25 mg de galactose e 25 mg de glicose. Adicionou-se 1,25 mL de solução 72% de ácido sulfúrico (m/m) resfriado em cada tubo.

Os frascos foram incubados por 1h à uma temperatura de 30 °C, homogeneizando periodicamente; após esse período foram adicionados 13,5 mL de água destilada e os frascos foram mantidos em banho fervente por duas horas. Após resfriar, foram adicionados 3,1 mL de solução 32% (m/v) de hidróxido de sódio.

As soluções foram centrifugadas e o sobrenadante foi analisado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo o material residual da caracterização pesado.

Após quantificação dos açúcares, a concentração dos carboidratos foi relacionada a massa total, sendo obtida a relação m/m de açucares por massa seca algal, esse valor foi corrigido com a porcentagem de perda de açúcares, calculada pelo controle do procedimento.

5.3. Microrganismo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782, selecionada por ser agente fermentador de hidrolisado algal, foi cedida pelo Laboratório de Coleção de Culturas de Leveduras do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A concentração celular foi quantificada por determinação da turbidez que correlaciona densidade ótica (D.O.) com massa seca, sob a equação: y = 1,8996x + 0,0287, R² = 0,9946.

Para elaboração desta curva, foram preparadas várias diluições a partir de uma dada suspensão de células e as absorvâncias (densidade ótica) foram lidas em espectrofotômetro (Spectrumlab 22PC spectrophotometer) a 600 nm. A massa seca foi determinada a partir da mesma suspensão usada para leitura das absorvâncias. Esta suspensão foi filtrada a vácuo com uma membrana de 0,22 µm, seguida pela secagem dos filtros.

5.4. Meio de manutenção, ativação e propagação

As culturas de leveduras foram preservadas em meio GYMP inclinado (tabela 5.1), cobertos com óleo mineral e mantidas sob refrigeração. Para o cultivo de ativação, as leveduras foram inoculadas em meio Sabouraud (tabela 5.2) modificado, mais rico que o GYMP, onde as colônias ficam mais densas.

Para produção do inóculo, as colônias das placas são inoculadas para o meio de propagação/ativação (tabela 5.3, tabela 5.4), com o volume de 250

mL em frascos cônicos de 500 mL, por 24 horas, com agitação de 150 rpm e 30 °C.

Após o período determinado para propagação, as células se encontram próximo ao fim do estágio exponencial de crescimento (ponto de concentração máxima de células, próximo a 3 g/L peso seco de células), nesse momento é feita a passagem de 25 mL do cultivo em novo frasco, este para o inóculo das fermentações, incubadas por 12 horas, nas mesmas condições do cultivo de propagação, 150 rpm e 30 °C.

Tabela 5.1. Composição do meio de manutenção GYMP

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	20
Extrato de levedura	5
Extrato de malte	10
NaHPO ₄	2
Ágar	20

Tabela 5.2. Composição do meio de ativação Sabouraud modificado.

Componente	Concentração (g/L)
Galactose	20
Extrato de levedura	5
Peptona	10
Ágar	20

Tabela 5.3. Meio de cultura para propagação e produção do inóculo.

Componente	Concentração
Galactose	20,0 g/L
Extrato de levedura	$2,0 \mathrm{g/L}$
Uréia	1,25 g/L
$KH_{2}PO_{4}$	1,1 g/L
Solução de sais e ácido cítrico	$40,0~\mathrm{mL/L}$

Fonte: Pereira Jr. (1991)

Tabela 5.4. Composição da solução de sais minerais e ácido cítrico.

Componente	Concentração (g/L)
MgSO ₄ .7H ₂ O	12,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,90
MnSO ₄	0,19

CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,30
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,035
H ₃ BO ₃	0,050
KI	0,009
$A1_2(SO_4)_3$	0,0125
Ácido Cítrico	12,5

Fonte: Pereira Jr. (1991)

5.5. Ensaios quantitativos

As determinações quantitativas dos açúcares foram realizadas por meio do método da glicose oxidase (GOD), DNS e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas condições indicadas na tabela 5.6. A quantificação do HMF foi também realizada por CLAE (coluna C-18, detector UV, 210 nm).

Tabela 5.5. Condições operacionais do cromatógrafo.

abela 5:5: Condições	operacionais do cromatografo
Fase móvel:	Água MilliQ desgaseificada
Vazão de fase móvel:	0,6 mL/min
Pressão máxima:	2000 psi
Volume de amostra:	5 μL (amostra)
T _{externa} :	85 °C (forno)
T _{interna} :	40 °C (detector)
Coluna	HPX-87P (Biorad®)

Um cromatograma típico de uma amostra de fermentação é apresentado na figura 5.1 que se segue, evidenciando a presença de celobiose, glicose, galactose e etanol.

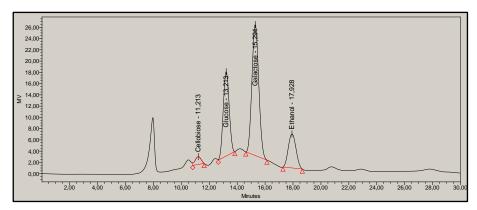


Figura 5.1. Cromatograma típico do produto da fermentação (fase intermediária) da glicose e galactose por *S. cerevisiae*

Para a quantificação de glicose pelo método de glicose oxidase (kit Glicose – PP, ANALISA Diagnóstica), Trinder, 1969) foi misturado a cada 10 μL de amostra na devida diluição, 1 mL de solução de reativo de glicose oxidase, sendo estas misturas incubadas a 37 °C durante 15 minutos. Após este passo, deu-se o arrefecimento das amostras e adição de 1,0 mL de água destilada, sendo posteriormente medida a sua absorvância por espectrofotometria a 505 nm.

As medições dos açúcares redutores pelo método de DNS (Miller, 1959), após a realização da curva de calibração, delineada pela equação: y = 0,8705x - 0,0516, R² = 0,9985, foram realizadas com a adição de 300 μL de DNS a 100 μL de amostra, sendo esta mistura colocada durante 5 minutos em um banho a uma temperatura de 100 °C. Após este período de tempo, as amostras foram resfriadas e adicionados 1,5 mL de água destilada, sendo posteriormente medida a absorvância da amostra em espectrofotômetro (Spectrumlab 22 Pc) (540 nm de comprimento de onda).

5.6. Diagrama esquemático do processamento de K. alvarezii

Abaixo estão representadas as principais etapas do processamento de *K. alvarezii* para produção de etanol (figura 5.2). A alga, cedida pela empresa Ondas Biomar, encontrava-se com muita sujeira e incrustações e levemente úmida, apesar de passar um período de secagem ao sol.

Como descrito, a alga é lavada, para remoção de areia, incrustações e outros resíduos, deixada por um período de 12 h em estufa 65 °C, ou até estar completamente seca, para então ser moída, processo descrito no item 5.1.

Após esse processamento primário, as etapas que se sucedem, indicadas na figura 5.2, são descritas detalhadamente no decorrer desse capítulo.

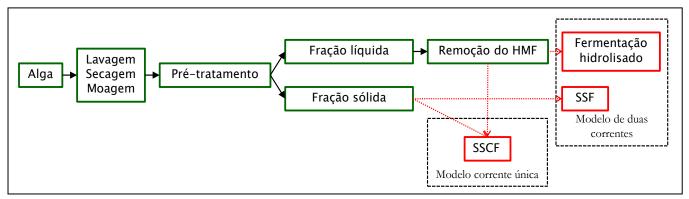


Figura 5.2. Diagrama esquemático do processamento da *Kappaphycus alvarezii* para os modelos de corrente única e de duas correntes.

5.7. Pré-tratamento químico

Para uma avaliação inicial do comportamento da biomassa perante o pré-tratamento, foram utilizadas as seguintes variáveis, concentração de ácido sulfúrico (1-5%), relação sólido:líquido (5-20%), temperatura (111-121 °C) e tempo de exposição (20-40 min), totalizando 16 ensaios distintos, realizados em duplicata (tabela 5.7).

Tabela 5.6. Planejamento Fatorial 2^4 , tendo como fatores concentração de H_2SO_4 (1-5%), relação sólido:líquido (5-20%), temperatura (111-121°C) e tempo de exposição (20-40 min).

Ensaio	H ₂ SO ₄	S:L	Temperatura	Tempo
	$(^{0}/_{0})$	$(^{0}/_{0})$	(°C)	(min)
1	1	5	111	20
2	5	5	111	20
3	1	20	111	20
4	5	20	111	20
5	1	5	121	20
6	5	5	121	20
7	1	20	121	20
8	5	20	121	20
9	1	5	111	40
10	5	5	111	40
11	1	20	111	40
12	5	20	111	40
13	1	5	121	40
14	5	5	121	40
15	1	20	121	40
16	5	20	121	40

Tempo

A partir dos dados obtidos no planejamento anterior, foi delineado um novo planejamento variando-se a concentração de ácido sulfúrico (% v/v), tempo de exposição, mantendo constante a relação sólido:líquido (100 g de alga e 200 mL de solução ácida) e temperatura de 121 °C, em frascos cônicos de 250 mL. Os ensaios foram realizados nas condições apresentadas na tabela 5.8, com o intuito de abranger uma maior faixa de estudo.

Cada ensaio teve o material filtrado, ajuste de pH a 5,0 com uso de Ca(OH)₂ e as amostras foram analisadas em CLAE, já que não foi possível analisar por DNS, devido à interferência de outros produtos do tratamento.

Os cálculos de efeito e contribuição dos parâmetros foram calculados utilizando o programa Design-Expert, versão 7.1 de teste (Stat-ease).

Tabela 5.7. Planejamento Fatorial 2², tendo como fatores concentração de H₂SO₄ (1-2%) e tempo de exposição (20-60 min).

Ensaio H₂SO₄ (%) H₂SO₄ (%) Tempo Ensaio (min) 1 1 60 7

(min) 1,5 60 2 1,5 60 8 1,5 20 3 9 20 20 4 1,5 20 10 2 60 1,25 40 1,75 40 5 (c) 11 (c) 1,75 6(c)1,25 40 12 (c) 40

5.8. Separação da fase líquida

Após a filtração (com uso de filtro prensa), separou-se a fase líquida (rica em galactose) da fase sólida (rica em celulose, resíduo celulósico). A fase líquida teve seu pH ajustado para 5,0 com hidróxido de cálcio, tendo seu precipitado filtrado. Em relação à fase sólida foram feitas lavagens sucessivas, para remoção da solução ácida para, então, ter o pH ajustado para 5,0.

Após a primeira filtração a fração sólida foi refiltrada para avaliar a concentração de galactose retida no sólido. Com esse objetivo, o sólido obtido da primeira prensagem foi lavado com volume de água na relação 1:1 massa úmida, para então ser filtrado novamente. O líquido permeado também teve quantificada a concentração de galactose e HMF, assim como o produto da primeira filtração, por CLAE.

5.9. Clarificação

Para remoção do HMF, etapa denominada destoxificação, foi realizado um tratamento com carvão ativado em pó com diferentes concentrações (5, 10, 15, 20, 25%), sendo retiradas amostram em intervalos regulares de 10, 20, 30, 60 minutos. Os ensaios preliminares foram realizados em frascos cônicos de 50 mL, contendo 20 mL da fração líquida oriunda do pré-tratamento, a qual foi adicionada a quantidade pré-estabelecida de carvão ativado, mantendo-se a temperatura a 30 °C por até 1h para, então, ser filtrado.

As amostras retiradas foram analisadas em CLAE, para verificar a redução da concentração do inibidor metabólico, HMF, e do outro produto do pré-tratamento, substrato para a produção do bioetanol, a galactose.

5.10. Hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática da fração sólida proveniente do prétratamento químico foram realizados tendo como ferramenta o planejamento experimental central composto rotacional (DCCR), adotando-se a concentração de resíduo celulósico (RC) e carga enzimática como variáveis independentes (tabela 5.9).

Tabela 5.8. Planejamento experimental central composto rotacional, com variação da concentração de resíduo celulósico e carga enzimática.

Ensaio	Concentração	Carga Enzimática
	de RC (%)	(FPU/g de RC)
1	9	20
2	16	20
3	9	70
4	16	70
5	7	45
6	18	45
7	13	9,6
8	13	80,3
9 (c)	13	45
10(c)	13	45

RC: resíduo celulósico

Para avaliação da hidrólise enzimática, foram definidas como resposta a concentração de glicose e a eficiência da hidrólise, levando-se em consideração a porcentagem de celulose encontrada no resíduo celulósico (66%).

Após o planejamento experimental, foram também avaliadas concentrações de RC acima de 18%, sendo elas 19 e 20%, mantendo a carga enzimática em 45 FPU/g de RC.

Os ensaios do planejamento foram realizados em frascos cônicos de 50 mL, utilizando-se como fase líquida 25 mL de água destilada. Não foi utilizado meio tamponado, pois foi observado que a eficiência do processo era similar, sem perdas. Para os ensaios de avaliação da inibição da hidrólise enzimática pela galactose, substitui-se a água pela fração líquida do pré-tratamento químico (rico em galactose), com pH pré-ajustado em 5,0. Os ensaios de hidrólise enzimática do resíduo celulósico foram submetidos a agitação de 150 rpm e 50 °C, com o preparado enzimático comercial Multifect ®(Genencor, Co.).

Com o propósito de verificar a reprodutibilidade em biorreator, as condições definidas pelos ensaios anteriores foram mantidas, apenas alterando a velocidade de agitação para 400 rpm.

Para o planejamento experimental DCCR, foram retiradas amostras até 48 h de hidrólise, que foram analisadas por GOD, assim como o ensaio para avaliação do aumento de concentração do RC.

Os cálculos de efeito e contribuição dos parâmetros e os gráficos de superfície de resposta foram calculados utilizando o programa Design-Expert, versão 7.1 de teste (Stat-ease).

5.11. Microscopia Eletrônica de Varredura

Com intuito de se observar o aspecto da biomassa antes e após etapas de processamento, foram coletadas amostras da alga após lavagem, secagem e moagem, após o pré-tratamento ácido e após a sacarificação simultânea a cofermentação.

Todas as amostras foram deixadas em estufa 65 °C, até peso constante, pois o processo de metalização requer material a ser analisado estejam nessas condições, sem umidade.

Como os materiais a serem analisados não são condutores, uma ultrafina camada de ouro (300 Å) foi depositada por evaporação a alto vácuo, em um metalizador de amostras JEOL Quick Auto Coater, modelo JFC-1500. Após a estabilização do vácuo, as amostras permaneceram por 5 min no metalizador. Isto foi feito para prevenir a acumulação de campos elétricos estáticos no material devido à irradiação elétrica durante a produção da imagem e para o aumento do contraste.

O equipamento utilizado para microscopia eletrônica de varredura foi o Quanta 200, da FEI.

5.12. Ensaios de fermentação

5.12.1 Ensaio para determinação do pré-inóculo

Para elucidar o comportamento da levedura nos processos de crescimentos e de fermentação, proveniente de meio de pré-inóculo contendo diferentes açúcares foram avaliados inóculos preparados tanto com glicose, quanto galactose, ambos em meios sintéticos, descritos na tabela 5.

Para os ensaios de crescimento, a levedura foi inoculada em dois meios, um com 10 g/L de glicose e outro com 10 g/L de galactose. Após crescimento de levedura, foi feito um inóculo de 10% v/v (aproximadamente 0,3 g, massa seca) em meio contendo mistura de 5 g/L de glicose e de galactose, totalizando 10 g/L de açúcares, em duplicata, para inóculo proveniente de cada um dos açúcares. O crescimento foi avaliado por espectrofotometria e o consumo dos açúcares por DNS e GOD.

Baseado no ensaio de crescimento descrito anteriormente e usando uma mesma concentração inicial de celulas, proveniente da glicose e galactose, os frascos para os ensaios de avaliação do tamanho do inóculo continham 20 g/L de glicose e de galactose. O consumo dos açúcares foi acompanhado por DNS e CLAE.

Além dos ensaios para avaliação do melhor meio para propagação do inóculo, foi avaliado também o impacto do seu tamanho na assimilação e fermentação dos açúcares. Para isso, foi elaborado um meio contendo 60 g/L de glicose e galactose, com inóculos de 10 e 20 g/L (massa seca) da levedura crescida em meio contendo apenas galactose como fonte de carbono.

5.12.2 Ensaios de fermentação com hidrolisados

Para se avaliar a fermentabilidade dos hidrolisados, foram realizados três ensaios (suplementado com componentes da tabela 5), sendo o primeiro com o pré-tratado rico em galactose e o segundo com hidrolisado enzimático (SSF). No terceiro ensaio, avaliou-se a aplicação da sacarificação do RC e cofermentação simultâneos (SSCF).

Os inóculos dos ensaios foram preparados com meio indicado na tabela 5, contendo galactose como única fonte de carbono. Após inóculado a levedura foi mantida no cultivo por 12 h, a 30 °C em frascos agitados de 500 mL, com rotação de 150 rpm contendo 250 mL de meio. Os ensaios de fermentação em frascos foram inoculados com 5 g/L de levedura (massa seca). Para a fermentação da fração líquida (rica em galactose), as condições foram as mesmas da incubação do inóculo e para o SSF, um período de 24 h para a pré-hidrólise. Os frascos foram mantidos a 50 °C, temperatura ideal para atividade enzimática.

Para o SSCF o inóculo foi de 20 g/L e o processo foi operado a 150 rpm e 35 °C, após 24 h de pré-hidrólise com temperatura de 50 °C.

Todas as fermentações foram acompanhadas com retiradas de amostras para construção dos perfis cinéticos de hidrólise enzimática e após a verificação da redução de atividade metabólica da levedura (formação de bolhas de CO₂) foram realizados ensaios de DNS e GOD.

6. Resultados e Discussão

6.1. Caracterização

Com a composição química da alga é possível avaliar o rendimento dos diferentes processos de transformação da matéria-prima, sendo este passo um dos mais importantes do estudo da produção de etanol a partir de biomassas.

Os valores obtidos para porcentagem de cada uma das cadeias polissacarídeas (tabela 6.1) estão dentro das faixas observadas na literatura (tabela 2.4).

O resíduo celulósico é formado pela concentração da fração insolúvel da biomassa, gerado no pré-tratamento. A partir de 1 kg de alga seca, obtêmse cerca de 150 g de resíduo celulósico.

O sólido residual é constituído por cinzas e sedimentos que não foram removidos pela lavagem.

Tabela 6.1. Composição da Kappaphyeus alvarezii utilizada nos ensaios.

	Glicose %	Galactose %	Sólido residual %
Alga Seca	9,49	31%	10,75
Resíduo celulósico	67,24		23,30

Deve-se levar em conta que a concentração desses polissacarídeos tem variação de acordo com a época de cultivo, pois a temperatura, salinidade e maré são fatores de grande impacto no crescimento e composição das algas, influenciando principalmente na quantidade e concentração dos diferentes tipos de carragena (*kappa*, *iota*, *lambda*). Este polissacarídeo confere resistência à pressão osmótica e ao movimento da mar (Goes, 2009). Sendo assim, dependendo das condições de cultivo da macroalga, diferentes condições de pré-tratamento químico podem ser requeridas.

Esses ensaios indicam que o grupamento sulfato da carragena foi removido no pré-tratamento ácido, já que se notou a presença majoritária de galactose pela cromatografia líquida. Sendo assim, quantificada a galactose (D-galactose e 3,6-D-anidrogalactose transformada), foi possível determinar a quantidade similar ao indicado pela literatura (Lechat et al, 1997), da carragena na composição de *Kappaphycus alvarezii*. Adicionalmente, a perda do poder gelificante do material foi outro indicativo de que os radicais sulfato tinham sido removidos, já que o simples tratamento com água quente não resulta na redução do poder gelificante da carragena algácea.

6.2. Pré-tratamento químico

Para o processo de desorganização da biomassa algal, foi realizado um planejamento amplo, para avaliação da importância das variáveis na obtenção de galactose. Deste primeiro conjunto de ensaios, foram obtidos os resultados indicados na tabela 6.2 e nesta primeira série de experimentos não foi quantificada a concentração de HMF.

Tabela 6.2. Ensaios realizados para o planejamento fatorial 2⁴.

Ensaio	H ₂ SO ₄	S:L	Temperatura	Tempo	Galactose
	(%)	(%)	(°C)	(min)	(g/L)
1	1	5	111	20	3,82
2	5	5	111	20	8,63
3	1	20	111	20	12,52
4	5	20	111	20	28,64
5	1	5	121	20	7,39
6	5	5	121	20	7,31
7	1	20	121	20	21,16
8	5	20	121	20	28,83
9	1	5	111	40	7,64
10	5	5	111	40	7,4
11	1	20	111	40	17,43
12	5	20	111	40	21,6
13	1	5	121	40	13,83
14	5	5	121	40	9,33
15	1	20	121	40	20,97
16	5	20	121	40	27,07
Contribuição (%)	6,71	73,76	4,61	0,28	-

Com os dados obtidos neste ensaio, foi possível notar a grande influência da relação sólido:líquido nesse processo e dado prosseguimento a avaliação da desorganização da biomassa e obtenção de galactose, realizando os ensaios indicados nas tabelas 6.3 e 6.5, através de dois planejamentos, um

na faixa de 1-1,5% v/v (tabela 6.3) e outro de 1,5-2,0% v/v (tabela 6.5), mantendo o tempo de exposição entre 20 e 60 minutos, faixa ampliada para avaliar melhor sua contribuição na obtenção de galactose, mesmo tendo apresentado baixa influência (0,28%).

Foram fixadas os valores de relação sólido:líquido para a maior concentração de sólido possível (quantidade mínima de solução de ácido para umedecer completamente a alga moída), uma parte de sólido para duas de líquido, a fim de maximizar a concentração final de galactose. Como indicado no planejamento da tabela 6.2, este é o principal fator para produção de galactose (73,76% de contribuição). Concentrações maiores do que a fixada, tornava o processo de mistura entre a solução de ácido e a alga triturada incompleto, pois parte do sólido não entrava em contato com o líquido.

A temperatura também foi fixada, pois além da limitação do equipamento, sua influência, nas faixas estudadas, é muito baixa comparada a concentração de ácido.

As tabelas 6.4 e 6.6 mostram os efeitos e a contribuição da concentração de ácido e tempo de exposição para geração de galactose em cada uma das condições investigadas.

Tabela 6.3. Ensaios realizados para o planejamento fatorial 2º (1-1,5% v/v).

Experimento	H ₂ SO ₄ (%)	Tempo (min)	Galactose (g/L)	HMF (g/L)
1	1	60	81,62	20,70
2	1,5	60	76,49	18,62
3	1	20	31,34	16,72
4	1,5	20	61,17	17,93
5 (c)	1,25	40	61,54	20,52
6 (c)	1,25	40	65,00	19,41

Tabela 6.4. Lista de efeito e contribuição dos fatores no planejamento, na faixa de concentração de ácido 1-1,5% (v/v).

Fator	Efeito	% Contribuição
A- H ₂ SO ₄ (% v/v)	12,35	9,90
B-Tempo (min)	32,8	69,84
AB	-17,48	19,83

Pode-se observar que na faixa de concentração de ácido 1-1,5%, o tempo de exposição foi o fator mais importante, pois independente da concentração de ácido, a maior concentração de galactose foi fortemente influenciada pelo tempo, evidenciado pela contribuição de 69,85%, resultado semelhante observado na faixa 1,5-2% (tabela 6.6). Isto denota que, isolando apenas duas variáveis, concentração de ácido e o tempo, podemos observar a influência do tempo no pré-tratamento, também por ter sido fixado a relação sólido:líquido, o principal fator, já indicado no planejamento anterior (tabela 6.4).

Tabela 6.5. Ensaios realizados para o planejamento fatorial 2º (1,5-2,0% v/v).

Experimento	H ₂ SO ₄ (%)	Tempo (min)	Galactose (g/L)	HMF (g/L)
7	1,5	60	76,49	18,62
8	1,5	20	61,17	17,93
9	2	20	47,53	17,68
10	2	60	73,21	17,47
11 (c)	1,75	40	79,22	18,57
12 (c)	1,75	40	68,58	18,65

Tabela 6.6. Lista de efeito e contribuição dos fatores no planejamento, na faixa de concentração de ácido 1.5-2.0% (v/v).

Contentração de acido 1,5-2,070 (V/V).				
Fator	Efeito	% Contribuição		
$A-H_2SO_4$ (%v/v)	-8,46	10,36		
B-Tempo (min)	20,5	60,85		
AB	5,18	3,89		

Como indicado nas tabelas 6.3 e 6.5, mesmo submetendo a alga a concentrações maiores de ácido, foram atingidos valores de concentração de galactose próximos aos obtidos com 1% (v/v) e com tempo de exposição de 60 minutos. Visando reduzir o custo material, foi selecionada as condições do experimento 1 (tempo de exposição 60 min, solução ácida a 1%v/v), pois além de se usar apenas 1% de ácido sulfúrico, o consumo de hidróxido de cálcio utilizado para ajuste de pH também se reduz.

Com a continuidade do processo pré-tratamento para a produção de hidrolisado de carragena em maiores volumes na condição selecionada (experimento 1), observou-se que a faixa de concentração de galactose variava

de 80 a 100 g/L de galactose, sendo a concentração de HMF sempre constante na faixa de 17 a 21 g/L (valores de galactose e HMF provenientes da primeira filtração). Este aspecto relacionado à geração de HMF, produto da desidratação de hexoses catalisada por ácidos, conduz também a formação de outros subprodutos, da degradação do HMF, ácido levulínico e ácido fórmico, que não são quantificados devido a precipitação com o hidróxido de cálcio.

Somando-se a esse revés do pré-tratamento é apresentado na literatura o fato da energia de ativação para hidrolise é em geral mais alta do que para a degradação dos açúcares, ou seja, devido ao grau de severidade do processo (relação temperatura/pressão x pH x tempo) a tendência é a desidratação da galactose logo após a obtenção dessa forma monomérica (Almeida, 2009).

Nessa etapa é possível confirmar a maior suscetibilidade da carragena a essas condições de hidrólise ácida, comparada a celulose, sendo esse o principal motivo da formação de HMF, já que a galactose apresenta menor reatividade à desidratação, comparada a glicose (Binder et al, 2010).

Assim como descrito na revisão bibliográfica, o pré-tratamento teve como objetivo desarranjar a estrutura física da biomassa, mas de forma semelhante ao processo realizado com biomassa lignocelulósica, no qual é gerado xilose, arabinose entre outros açúcares da fração hemicelulósica, foi possível obter a galactose, da carragena, restando a porção celulósica da alga. Esta estratégia de processo foi confirmada também por Ge et al(2011), que observaram a redução da eficiência da hidrólise enzimática quando a biomassa não passava por uma etapa de pré-tratamento.

6.3. Separação da fase líquida

Com o objetivo de separar a fração líquida da sólida e dar prosseguimento aos seus respectivos tratamentos (clarificação e ajuste de pH), o material pré-tratado foi filtrado com auxílio de um filtro-prensa.

Da primeira prensagem foi recuperado cerca de 70% do volume adicionado (1 litro de solução ácida, 700 mL recuperado), e o material sólido apresentou massa úmida de cerca 350 gramas. Na sequência, adicionou-se 350 mL de água destilada para segunda filtração, sendo recuperados 350 mL de lavado, contendo aproximadamente a metade das concentrações de galactose e HMF da primeira prensagem. Uma terceira lavagem com 350 mL de água destilada resultou na recuperação de metade das concentrações da segunda filtração (figura 6.1). Seguindo esse padrão, as frações líquidas provenientes da segunda e terceira filtração, podem ser utilizadas, após tratamento de remoção de HMF, no preparo de meios para propagação do inóculo.

A utilização da fração liquida foi mais observada em algas vermelhas, já que a partir das galactanas, carragena e ágar, se obtêm a galactose, no entanto, em algas pardas, outras substâncias podem ser extraídas e servirem de substratos para fermentação, como manitol, alginato e glucanas (laminaria, ou celulose, polímeros de glicose) e como indicado anteriormente, o prétratamento físico-químico da biomassa algal sempre antecede a hidrólise enzimática, para tornar a celulose mais acessível às enzimas.

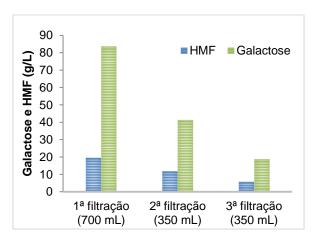


Figura 6.1. Volume recuperado de cada filtração e suas respectivas concentrações de galactose e HMF.

6.4. Clarificação

Com o objetivo de remover o HMF da fração líquida para se evitar a inibição da fermentação, fato evidenciado claramente por (Wikandari et al,

2010) após o pré-tratamento químico, foram realizados ensaios com concentrações mais baixas de carvão ativado (1 a 5%), onde foi notada uma pequena redução na concentração de HMF e a concentração de galactose manteve-se inalterada (figura 6.2).

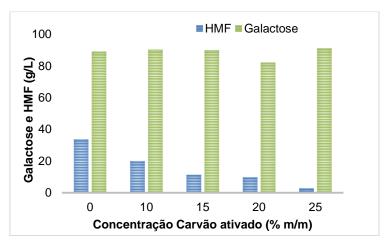


Figura 6.2. Ensaios de remoção de HMF, com uso de carvão ativado, incubado a 30 °C, 150 rpm por 1h.

Comparado com outros trabalhos (Mussato e Roberto, 2004; Carvalho et al, 2005) nos quais se buscava o tratamento de hidrolisados, as concentrações de HMF eram bem mais baixas (0,2-1 g/L), portanto os tratamentos com carvão ativado nessas concentrações foram suficientes, não sendo o caso da concentração inicial de HMF no presente estudo, que era da ordem de 30 g/L. Não foram observados tratamentos para concentrações tão elevadas de HMF, por isso foram avaliados processos com maiores teores de carvão ativado (10 a 25%).

Os resultados indicaram que é possível remover o HMF em sua grande totalidade, sem comprometer a concentração de galactose, mas deve se levar em conta o tipo de carvão ativado em pó utilizado (Vetec), pois a mesma proposta foi adotada por Meinita et al (2012b), que resultou em perdas de 43% de galactose. O processo mostrou-se importante, com reduções maiores de HMF quanto mais elevada era a concentração de carvão ativado. Para cada 10 g de carvão, foi removido 1 g de HMF. Ensaios posteriores indicaram que o processo de adsorção é rápido. Com retirada de amostra após 20 minutos,

observou-se que a concentração de HMF era a mesma que após 60 minutos. Pode-se concluir que a etapa de clarificação do material líquido pré-tratado mostrou-se eficiente na remoção do inibidor.

Para destacar a importância da remoção do HMF, é preciso citar algumas das formas como essa molécula age sobre a levedura, a presença desse inibidor compromete tanto a energia intracelular disponível, devido a conversão em produtos menos tóxicos, assim como provoca danos oxidativos a célula, consequentemente a redução ou interrupção tanto da fermentação, quanto da taxa especifica de crescimento celular, seguido de uma fase *lag* extendida (Gorsich et al. 2006, Almeida et al, 2007).

Essas reduções das atividades metabólicas são reflexo da inibição das enzimas álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase, piruvato desidrogenase e importantes enzimas da via glicolítica, hexoquinase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Banerjee et al, 1981, Modrig et al, 2002, Almeida et al, 2009).

Devido ao menor rendimento em ATP na fermentação alcoólica, o processo de inibição desse composto furânico torna-se mais severo, podendo levar a morte celular. Por outro lado, no metabolismo aeróbico, a levedura dispõe de maior aporte energético para neutralizar a toxicidade causada por esse composto, minimizando o seu efeito inibitório sobre a célula viva. Neste contexto, optou-se por destoxificar o hidrolisado ácido da carragena com carvão ativo.

Apesar da grande quantidade de carvão ativado empregado, esse material pode ser regenerado, através de tratamento térmico do material, em temperaturas na faixa de 500 a 900 °C, em atmosfera inerte (Bagreev et al, 2001).

Os processos de pré-tratamento destacados para geração de duas correntes, uma líquida rica em galactose proveniente da carragena e a outra sólida constituída majoritariamente de celulose, podem sofrer algumas alterações em algumas condições, variando o grau de severidade, para uso de

diferentes algas, como a *Hypnea musciformis*, nativa da costa brasileira, a qual poderá ser cultivada sem uma fiscalização severa ou até mesmo proibição pelos órgãos ambientais, restrições que são feitas ao cultivo comercial de *K. alvarezii*, relacionadas as suas áreas de cultivo.

6.5. Hidrólise enzimática

Com o objetivo de alcançar um bom rendimento de hidrólise da fração celulósica, com baixas cargas enzimáticas, foram realizados ensaios para avaliar a resposta da enzima comercial sobre o resíduo celulósico da alga (tabela 6.7).

Com esse intuito, foi desenvolvido um planejamento experimental com uma faixa de estudo ampliada, para se observarem pontos de mínimo e máximo e a curvatura da superfície de resposta.

Tabela 6.7. Respostas de concentração de glucose e rendimento de hidrólise enzimática do resíduo celulósico após 24h do delineamento central composto rotacional (DCCR).

Ensaio	Resíduo	Carga enzimática	Concentração de	Rendimento da
	celulósico (m/v)	(FPU/ g de RC)	glicose após 24h	hidrólise enzimática (%)
-1		20.00	(g/L)	` ,
I	9,00	20,00	39,6	68,1
2	16,00	20,00	43,4	39,4
3	9,00	70,00	45	74,9
4	16,00	70,00	83,3	75,6
5	7,00	45, 00	40,7	84,1
6	18,00	45, 00	92,3	77,3
7	13,00	9,64	34,4	39,9
8	13,00	80,36	70,9	82,3
9 (c)	13,00	45, 00	68,2	79,2
10 (c)	13,00	45, 00	65,2	75,7

RC: resíduo celulósico

A partir de cada ensaio, foram coletadas amostras para construção da cinética de hidrólise enzimática do RC (figura 6.3a) e o rendimento respectivo (figura 6.3b).

Avaliando-se a carga enzimática (20-70 FPU/g) e concentração de resíduo celulósico (9-18% m/v) no planejamento experimental central composto rotacional (DCCR), foi possível plotar o gráfico de hidrólise

enzimática (concentração de glicose) e de rendimento da hidrólise, mantendo o sistema reacional a 50 °C e 150 rpm (figura 6.4).

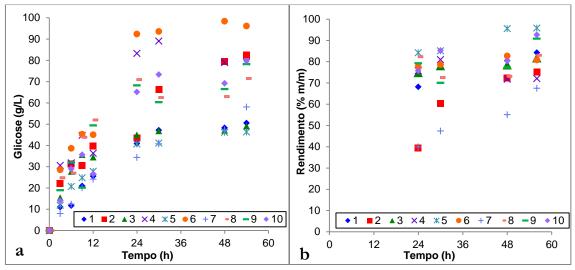


Figura 6.3. Cinética de hidrólise enzimática do ensaio DCCR(a) e respectivos rendimentos(b), para diferentes condições de ensaios.

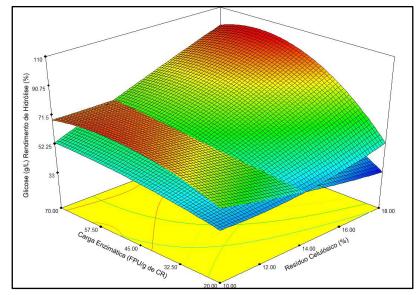


Figura 6.4. Gráfico resultante da sobreposição das superfícies de resposta da hidrólise enzimática (g/L)(máximo de 100 g/L) e rendimento de hidrólise (%)(máximo de 78%) para amostras coletadas após 24 horas de processo.

Avaliando-se o gráfico, pode-se notar claramente que altos valores de rendimento encontram-se distantes das altas concentrações de glicose, pois a concentração final de açúcar depende da concentração de substrato e o rendimento depende da carga enzimática conjuntamente com menor concentração de substrato. Portanto, com menor concentração de substrato e

maior carga enzimática a hidrólise se torna mais eficiente, pois alcança as concentrações máximas de glicose em menor tempo. Mas como o objetivo do processo é uma maior concentração de etanol, é primordial que esta seja a mais alta possível para uma destilação com menor gasto energético. Por esse motivo, foi adotada a carga enzimática de 45 FPU/g, mesmo do ensaio 6, o qual atinge-se a maior concentração de glicose, igual ao estipulado por Ge et al, 2011, que reportaram a concentração máxima de glicose de 34 g/L após 48 h.

Para se observar o ponto máximo da curvatura da concentração de glicose, foi realizado um ensaio uni-variável, alterando somente a concentração de RC. Tendo a concentração de 18% de RC como referência (não indicado na plotagem (figura 6.4), por se tratar de um ponto axial), foram avaliadas as concentrações de 19 e 20% (figura 6.5).

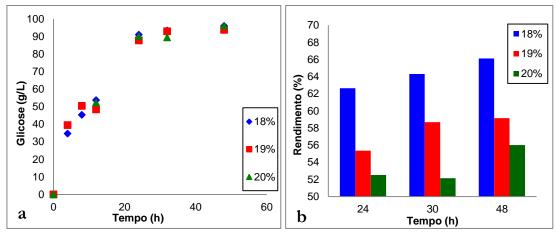


Figura 6.5. Perfil cinético da hidrólise enzimática do resíduo celulósico com várias concentrações de sólidos pela Multifect® (a) e respectivo rendimento (b).

Como é possível observar na figura 21a, independente do aumento da concentração de RC, a concentração de glicose formada não sofre grande alteração. Por esse motivo, o rendimento de hidrólise é reduzido (figura 6.5b). Esse fenômeno se deve aos problemas relacionados a transferência de massa em sistema com elevada carga de sólido, reduzindo a possibilidade de maior rendimento de glicose, diretamente relacionada a maior concentração de substrato. Foi, portanto, estabelecido o uso de 45 FPU/g e concentração de

18% do resíduo celulósico para a fermentação. Essas condições de reação enzimática foram levadas ao biorreator com volume de trabalho de 500 mL, 50 °C e rotação de 400 rpm (figura 6.6).

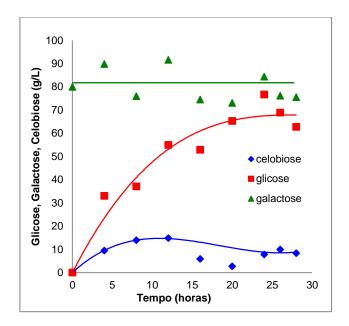


Figura 6.6. Hidrólise enzimática realizada em reator contendo galactose. Mantido a 50 °C e 400 rpm.

Observa-se que, em 24h, o rendimento da hidrólise (53%) não se repete como nos ensaios de planejamento (69%). Isto provavelmente foi devido à presença da galactose no meio, com potencial efeito inibidor sobre as celulases, como relatado por Xiao et al (2004), demonstrando que a galactose, em concentração de 100 g/L, reduz em 32% a taxa de hidrólise.

Um ponto interessante a ser observado, que em nenhum dos resultados apresentados utilizou-se meio tamponado, comumente utilizado em hidrólise enzimática (Ge et al, 2011, Maeda et al, 2011), apenas ajuste do pH do resíduo celulósico e da fração líquida, sem perda no rendimento, tornando-se uma vantagem, sob o ponto de vista de economicidade do processo.

Mesmo apresentando essa vantagem, a carga enzimática estabelecida é alta, comparada aos processos de hidrólise enzimática de lignocelulósicos, entre 12,5 e 25 FPU/g de biomassa (Maeda et al, 2011), demonstrando que

existe margem para redução no uso de celulase, cujo custo, ainda é uma das principais barreiras para a produção comercial do etanol 2G (Sainz, 2011).

6.6. Microscopia eletrônica de varredura

Com o uso da microscopia eletrônica foi possível observar a importância do pré-tratamento da biomassa, como ocorre com o material lignocelulósico, que tem como objetivo permitir o acesso das enzimas aos sítios catalíticos.

Na figura 6.7 são visíveis os canais que conectam diferentes partes da alga e que apesar da aparente acessibilidade, toda a estrutura é coberta por uma barreira de carragena, impossibilitando o acesso das celulases, por essa razão o processo de pré-tratamento com ácido diluído é realizado, para que a acessibilidade da celulase seja aumentada (figura 6.8a) e tem como efeito complementar, hidrolisar a carragena, gerando galactose.

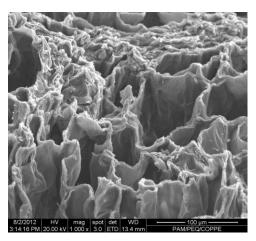


Figura 6.7. Microfotografia da *K. alvarezii* após lavagem, secagem e moagem em aumento de 1000x.

Comparando as microfotografias 6.7 e 6.8a com a 6.8b, é possível notar a desorganização provocada pelo pré-tratamento e na figura 6.8b aumentada também pela atividade celulolítica. Esta observação também foi reportada por Ge et al (2011), após pré-tratamento do resíduo de extração de alginato de *L. japonica*.

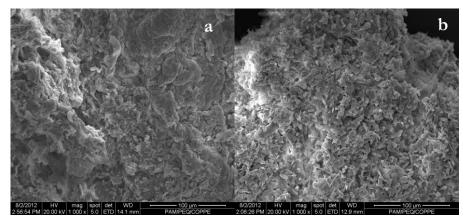


Figura 6.8. Microfotografia da *K. alvarezii* após pré-tratamento químico, seca e moída (a) e após o processo de SSCF (sacarificação simultânea a co-fermentação) (b) em aumento de 1000x.

6.7. Ensaios de determinação de pré-inóculo

Nos ensaios para avaliação do meio de pré-inoculo para crescimento, foi observado padrão similar ao indicado na figura 6.9, independente do açúcar utilizado no crescimento do inóculo, uma forte repressão do metabolismo da galactose pela glicose é notada e apenas após o esgotamento da segunda, a levedura inicia a metabolismo da galactose.

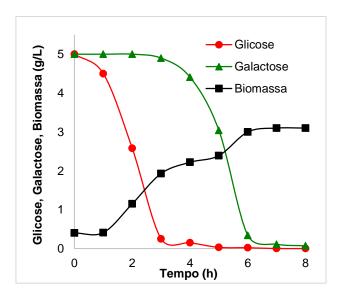


Figura 6.9. Crescimento da *S. cerevisiae* em meio sintético, com glicose e galactose, 150 rpm a 30 °C.

Já nos ensaios fermentativos (figura 6.10), quando o inóculo é proveniente da glicose, a repressão do consumo de galactose pela presença de glicose é muito mais severa, leva-se muito mais tempo para que a levedura

passe a metabolizar a galactose, no entanto, quando o inóculo é originário do meio contendo galactose (figura 6.11), observa-se um abrandamento dessa repressão.

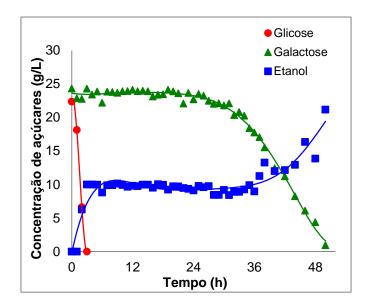


Figura 6.10. Ensaio preliminar de co-fermentação por *S. cerevisiae* (7 g/L), proveniente de meio pré-inóculo contendo apenas glicose.

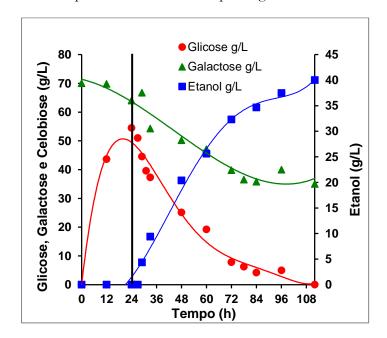


Figura 6.11. Ensaio preliminar de co-fermentação do hidrolisado da *K. alvarezii* por *S. cerevisiae* (7 g/L), proveniente de meio pré-inóculo contendo apenas galactose.

Esse comportamento sugere que apesar da repressão causada pela glicose na via de Leloir, as células oriundas do meio contento galactose possuíam transportadores para internalizar a galactose. Para confirmar esse comportamento, da assimilação da galactose por células competentes, foi avaliado o tamanho do inóculo, com 10 e 20 g/L de massa seca da levedura, crescidas em galactose (figura 6.12).

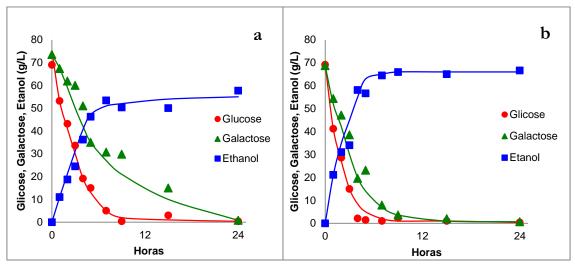


Figura 6.12. Co-fermentação por *S. cerevisiae* a 30 °C em meio sintético com mistura de glicose e galactose em concentração de 70 g/L, para avaliação de tamanho de inóculo.

(a) 10 g/L de inóculo e (b) 20 g/L de inóculo.

Sendo realizado o ensaio de avaliação do tamanho de inóculo, foi possível confirmar a hipótese da co-assimilação da glicose e galactose por células competentes, e assim como sua metabolização, indicando também que as enzimas responsáveis pela via de Leloir estavam ativas, mesmo na presença de glicose, sendo que no inóculo menor, a taxa de assimilação de ambos os açúcares foi menor, tendo ocorrido uma leve repressão, fato que foi contornado com o maior tamanho de inóculo. Este ensaio confirma também a importância no preparo do inoculo em meio de cultura contendo apenas galactose.

6.8. Fermentação

Com base nos resultados obtidos nas etapas anteriores, foi possível selecionar as condições em que se obtiveram as maiores concentrações de

galactose, glicose e a maior remoção de HMF para realização da fermentação dos açúcares obtidos de *Kappaphycus alvarezii*.

6.8.1. Fermentação do hidrolisado

Após destoxificação com carvão ativado, o hidrolisado da carragena com concentração de 81 g/L foi fermentado pela linhagem da levedura *S. cerevisiae* (figura 6.13), que foi anteriormente cultivada em meio sintético com galactose. A concentração de etanol atingida foi de 37 g/L, após 12 h, resultando em uma produtividade volumétrica de 3,1 g/L.h e rendimento de 0,457 g/g de substrato consumido, o que corresponde a uma eficiência de fermentação de 90,6%.

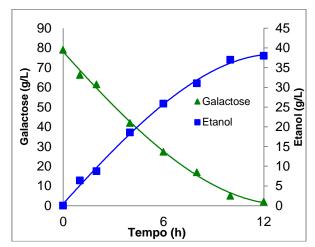


Figura 6.13. Fermentação do hidrolisado rico em galactose por *S. cerevisiae* a 30 °C com inoculo de 7 g/L.

Comparado com dois trabalhos recentes sobre produção de bioetanol a partir de hidrolisados de *K. alvarezii*, Khambhaty et al (2012) e Meinita et al (2012a) obtiveram 15,7 g/L (0,32 g/L.h produtividade volumétrica) e 1,7 g/L (0,063 g/L.h produtividade volumétrica) de etanol, respectivamente. Os valores aqui obtidos demonstram uma melhor eficiência do processo apresentado, que se deve, tanto ao tamanho de inóculo e a etapa de destoxificação mais eficiente, assim como a maior concentração de substrato no hidrolisado.

6.8.2. Sacarificação simultânea a fermentação do resíduo celulósico

Após a avaliação da hidrólise enzimática do resíduo celulósico, foi realizado o processo SSF da fração sólida gerada do pré-tratamento da biomassa algal (figura 6.14) com objetivo de se demonstrar a viabilidade da fermentação desse material. A concentração de glucose atingiu 80,8 g/L, após 24 h de pré-hidrólise enzimática, em que a concentração de etanol após 46 h foi de 52,0 g/L, com o preparado celulolítico agindo continuamente sobre o resíduo de celulose. Este resultado corresponde a uma produtividade volumétrica de 1,13 g/L.h e eficiência de fermentação de 78,5%.

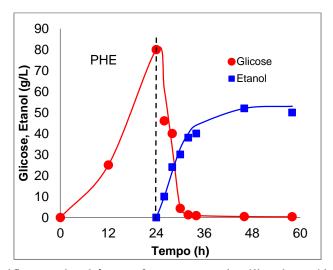


Figura 6.14. Sacarificação simultânea a fermentação alcoólica do resíduo celulósico de *K. alvarezii* (RC) por *S. cerevisiae* a 30 °C. PHE: pré-hidrólise (24 h a 50 °C, concentração de RC 18% m/v, 45 FPU/g de RC) com inoculo de 7 g/L.

O processo SSF do resíduo celulósico com uma composição de 66% de celulose (m/m) resultou num rendimento total de 70,3% (eficiência de hidrólise e eficiência de fermentação). Ge et al (2011) relataram um valor mais alto para a hidrólise de *Laminaria japonica* (80,8%). No entanto, o hidrolisado foi concentrado por evaporação rotativa para se obter uma concentração de glicose de 53,5 g/L, que foi fermentado separadamente (SHF), o que resultou em uma concentração de etanol de 23,3 g/L, após 48 h de fermentação, concentração baixa que compromete a separação. Este resultado corresponde

a uma produtividade volumétrica de 0,49 g/L.h, que é muito menor do que o valor obtido no presente trabalho.

Como citado anteriormente, o custo da celulase é uma das barreiras para produção de etanol a partir de biomassas celulósicas, por essa razão, além de diminuir a carga enzimática, é possível avaliar a alimentação por pulso no SSF, aumentando a produtividade de etanol por grama de enzima empregada, porque apesar da diminuição da temperatura, de 50 °C, para 37 °C, as enzimas mantêm atividade, como realizado por Maeda et al (2011).

6.8.3. Sacarificação simultânea a co-fermentação de glicose e galactose

Após a confirmação da possibilidade de se usar um inóculo maciço para superar a inibição da via de Leloir, na presença de glicose, a mesma estratégia foi adotada para o processo SSCF. O resíduo celulósico foi adicionado à fração líquida rica em galactose em uma concentração de 18% (m/v), seguido da pré-hidrólise enzimática por 24 h. Na sequência, a levedura foi inoculada ao meio para o desenvolvimento da fermentação alcoólica (figura 6.15).

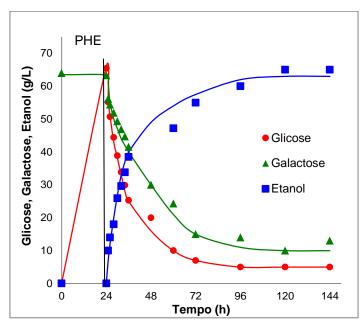


Figura 6.15. Sacarificação simultânea a co-fermentação de glicose e galactose provenientes da hidrólise de *K. alvarezii* por *S. cerevisiae* CBS 1782 (20 g/L).

Os resultados indicam uma clara melhoria na assimilação e fermentação de galactose em conjunto com glicose, tendo sido obtido 65 g/L de etanol

após 120 h, conforme mostrado no ensaio com o meio sintético da cofermentação de açúcares (figura 6.12). Fato justificado pela aclimatação do inóculo, na formação de células em que os genes responsáveis pela transcrição de proteínas e enzimas ligadas ao transporte e conversão da galactose (via de Leloir) estivessem sempre ativos. Portanto, estas células, mesmo entrando em contato com a glicose, já possuíam as enzimas responsáveis da via de Leloir em quantidades suficientes para internalização e transformação em glicose-6-fosfato.

Em outros estudos, utilizando algas pardas, Kim et al (2011), utilizando Escherichia coli KO11 recombinante como agente de fermentação, obtiveram uma concentração de etanol de 23-29 g/L, após 44 h. Em um outro estudo realizado Lee e Lee (2012), utilizando S. cerevisiae (KCCM50550) como o agente de fermentação, uma concentração de etanol de apenas 2,7 g/L foi obtida, e com a espécie Debaryomyces occidentalis (KCTC7196) a concentração deste biocombustível foi de 10,9 g/L, após 7 dias de fermentação.

As concentrações atingidas reportadas em outros trabalhos são muito baixas para possível aplicação industrial, tornando o processo de separação mais oneroso, fato que não ocorre nas fermentações conduzidas com *S. cerevisiae* CBS 1782 neste trabalho.

Mesmo que a linhagem tenha habilidade de consumir galactose, observa-se a partir do ponto de 72 horas, interrupção no seu consumo, mesmo com o consumo maior da glicose, que é o principal inibidor dos genes da Via de Leloir. É descrito na literatura (Gancedo, 1998) os diversos efeitos da glicose nos níveis de controle das vias dos outros açúcares, como redução das concentrações dos mRNAs, redução das taxas de transdução, ou até mesmo nas taxas de degradação das enzimas. Assim como foi descrito na revisão bibliográfica, o produto do gene *GAL6* é responsável pela inativação dos mRNA transcritos dos genes *GAL1*, *GAL2* e *GAL7*. Esses fatores podem estar relacionados à redução e estagnação da assimilação da galactose.

Contudo, mesmo com a obtenção de alta concentração de etanol (65 g/L), ao final da fermentação, quantidades residuais de glicose e galactose permaneceram no meio, o que pode ser devido à tolerância ao etanol pela levedura.

Mesmo com o uso de elevada concentração de inóculo com o intuito de se consumir/assimilar toda a galactose antes da perda da atividade das proteínas *GAL*, usando esta linhagem estudada, outra alternativa seria o uso de linhagens indicadas em outros trabalhos (Keating et al, 2004), naturalmente ocorrentes. Esta linhagem aparentemente não sofre inibição da assimilação de galactose na presença de glicose, ou com modificações genéticas para se evitar a inibição do gene *GAL* na presença de glicose, como descritos na revisão bibliográfica. Outra opção seria um inóculo sequencial, uma primeira linhagem que não assimilasse galactose, fermentaria toda a glicose e após consumo total da glicose, a linhagem CBS 1782 seria inoculada e fermentaria a galactose sem qualquer inibição pela glicose, desde que se fosse tolerante ao etanol.

6.9. Potencial de Kappaphycus alvarezii para a produção de bioetanol

O potencial do processo de produção de bioetanol a partir de biomassa algal foi estimado a partir da conversão das frações de celulose e galactana contidas na biomassa. Uma avaliação do potencial de produção de etanol a partir dos valores obtidos nos ensaios de pré-tratamento e hidrólise enzimática, levandose em conta as perdas no processo de filtração, também foi estimado. Os diagramas de blocos demonstram o potencial teórico máximo para produção de etanol (figura 6.16a) e o máximo atingível pelas metodologias empregadas no presente trabalho (figura 6.16b), além da eficiência em cada uma das etapas, demonstradas na tabela 6.8.

Um estudo mais aprofundado sobre as propriedades da carragena, que é o principal constituinte da *K. alvarezii*, e das condições de pré-tratamento deve ser feito, para se avaliar se é realmente possível atingir alta eficiência, já

que no momento, para a fração líquida, foi convertida apenas 38% da galactose disponível. Tendo ocorrido perda também na filtração do prétratamento, no ajuste de pH e clarificação.

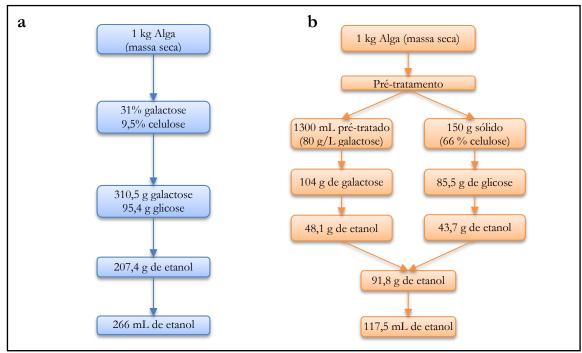


Figura 6.16. Diagrama de blocos indicando o potencial teórico máximo (a) e máximo atingível pelas metodologias empregadas no presente trabalho (b).

Tabela 6.8. Balanço de massa das etapas para produção de etanol a partir de *K. alvarezii*, pelo modelo de duas correntes (fermentação de galactose separada do SSF de RC)

Etapa	Entrada	Saída	Eficiência
Pré-tratamento	1000 g Alga seca +	1,4 L (80g GAL/L + 20g	38%
	2 L 1% v/v H2SO4	HMF/L) + 150 g CR^*	
Destoxificação	1,4 L (80 g GAL/L + 20	1,3 L (80 g GAL/L + <1 g	95%
	HMF g/L) + 370 g AC	HMF/L)*	
Fermentação	1,3 L (80 g GAL/L + <1 g	48,1 g EtOH#	90,6%
da galactose	HMF/L)		
SSF	833 mL + 150 g RC	43,7 g EtOH #	78,5%

GAL: galactose, HMF: hidroximetil furfural, AC: carvão ativado, RC: resíduo celulósico, SSF: sacarificação e fermentação simultâneas; EtOH: etanol; *após filtração; *análise CLAE.

Na tabela comparativa de rendimento de açúcares (tabela 6.9), podemos observar também como esse processo químico ainda é severo, causando perda de galactose e na formação de HMF e seus subprodutos, atingindo 0,189 g/g de biomassa (máximo teórico de 0,405). Comparando esse rendimento com trabalho como de Jang et al (2012), no qual foi atingido 0,456 g/g de açucares

por grama de alga, a principal diferença se encontra no processo de disponibilização dos açúcares, que ocorreu em condições mais brandas de severidade e menor concentração de sólidos, gerando um hidrolisado com menor concentração de açúcar, o que compromete o emprego dessa técnica para a separação do etanol por destilação.

Tabela 6.9. Comparação da sacarificação e rendimento em etanol de diferentes algas. (Kumar el al, 2013)

	Rendimento			
	em açúcares	Etanol	Rendimento de etanol	
Macroalga	(g/g biomassa)	(g/L)	(g/g açúcar)	Referencia
Sargassum sagamianum	ND	1–2	0,386	Hyeon et al(2011)
Saccharina japonica	0,456	7,7	0,169	Jang et al(2012)
Kappaphycus alvarezii	0,306	20,6	0,39	Khambhaty et al(2012)
Gelidium amansii	0,566	ND	ND	Kim et al(2011)
Laminaria japonica	0,376	23–29	0,41	Kim et a.(2011)
Sargassum fulvellum	0,096	ND	ND	Kim et al(2011)
Ulva lactuca	0,194	ND	ND	Kim et al(2011)
Kappaphycus alvarezii	ND	6,8	0,369	Meinita et al(2012)
Gelidium amansii	0,422	27,6	0,38	Park et al(2012)
Gracilaria salicornia	16,6	ND	0,079	Wang et al(2011)
Saccharina japonica	0,281	37,8	0,41	Wargacki et al(2012)
Sargassum sagamianum	ND	4-7	0,133-0,233	Yeon et al(2010)
Laminaria digitata	ND	5,61	NA	Adams et al(2011)
Kappaphycus alvarezii	0,189	37,0 e 52,0	0,46 e 0,5	Este trabalho (SSF)
Kappaphycus alvarezii	0,167	65,0	0,42	Este trabalho (SSCF)

SSF: Processo em duas correntes; SSCF: Processo em corrente única; Etanol: concentração final no meio.

Em contrapartida, as maiores concentrações de açúcares obtidas neste trabalho, consequentemente, geraram maiores concentrações de etanol, favorecidas pela alta eficiência na fermentação; essa maior concentração beneficia um importante processo para o escalonamento desse processo, a destilação.

Apesar de ser encontrado em menor proporção, foi possível obter grande eficiência na obtenção de glicose do resíduo celulósico comparado com o máximo teórico (91,2%). Sendo assim, é razoável planejar o seu uso quando for realizada a extração de carragena e o resíduo for disponibilizado para produção do etanol.

Tendo uma visão geral do processo, é possível avaliar que o modelo de duas correntes se mostrou mais vantajoso, pois não ocorreu a redução da eficiência da hidrólise enzimática na presença de galactose, não sendo necessário tampouco o emprego de inóculo maciço nas fermentações. Adicionalmente, é possível recuperar as células usadas na fermentação da galactose para reciclo (os processos SSF e SSCF são impactados com grande aporte sólido) e devido a menor concentração de açúcares disponibilizados, a fermentação alcoólica não atingirá níveis inibitórios de etanol.

Além do uso de enzimas comerciais, tanto para SHF, ou SSF, é observado no trabalho de Wargacki et al (2012), o uso de microrganismo geneticamente modificado, para torná-lo uma plataforma de transformação de etanol também foi investigado. A bactéria recombinante recebeu as enzimas responsáveis pelo transporte e metabolismo do alginato, tornando esse microrganismo competente para o CBP, o bioprocesso consolidado, com rendimento de até 80%.

Como é observado na tabela 6.9, *K. alvarezii* é apenas um dos exemplos de macroalga vermelha como uma biomassa potencial para produção de etanol, apesar de ser uma alga exótica, seu cultivo é permitido em algumas regiões do Brasil, mas por todo o litoral existem algas como a *Hypnea musciformis* e *Gracilaria birdiae*, com importância econômica e com também potencial para produção de etanol.

Tendo sido apresentado esses pontos, podemos comparar a produtividade da alga (tabela 6.10) com a principal cultura para produção de biocombustível brasileira, a cana-de-açúcar, que tem como média 90 toneladas/ha/ano, podendo atingir até 130 ton/ha/ano, e com o milho, matéria-prima para produção de etanol norte americano, cerca de 5 toneladas de grão/ha/ano, enquanto em alguns cultivos comerciais e experimentais de macroalgas atingem 1133 a 3078 ton/ha/ano (Cruz et al, 2007, Santos, 2007).

Tabela 6.10. Comparativo da produtividade das biomassas para produção de bioetanol.

Biomassa	Produtividade (ha/ano)	Açúcares fermentáveis (% m/m)	Etanol (L/ha/ano)
Macroalgas	1133-3078	32-60	11978-25199
Cana-de-açúcar	90-130	15	6200-10400
Grãos de milho	4,4-7	62-71	3400-5000

Cruz et al, (2007); UDOP, (2009); BNDES, (2003); Santos, (2007); Daroch et al(2012)

Levando-se em conta a composição e concentração de açúcares fermentáveis dessas culturas (tabela 6.10), da cana-de-açúcar é possível se obter até 10400 L/ha/ano com média de 6200 L/ha/ano, já os grãos de milho, em torno de 5000 L/ha/ano e das algas 25199 L/ha/ano em valores teóricos máximos com algas vermelhas e 11978 L/ha/ano com base em rendimentos experimentais (Daroch et al, 2012, EPOBIO, 2007).

Dada a grande diversidade de algas tanto no litoral brasileiro, quanto em outras regiões do mundo, sejam em águas quentes ou frias, inúmeras rotas tecnológicas de aproveitamento estão sendo desenvolvidas, mas independente da tecnológica a ser empregada, a biomassa algal tem sem dúvida um grande potencial, que está sendo demonstrado nos diferentes trabalhas enumerados nas tabelas 5 e 22, com o mesmo otimismo, levando em conta as vantagens das macroalgas sobre outras biomassas.

7. Considerações Finais

A produção de etanol a partir de *Kappaphycus alvarezii* se mostrou factível e portadora de potencial, tanto no uso integral, seguindo o modelo de correntes separadas, ou apenas do resíduo celulósico.

A linhagem utilizada nesse trabalho tem potencial para o processo de fermentação da mistura de galactose e glicose, mesmo parecendo ter o gene *GAL* inibido na presença de glicose, o que pode ser contornado por passagens periódicas do inoculo em meios contendo apenas galactose (podendo ser utilizado as frações líquidas da segunda filtração do prétratamento).

É preciso melhorar o processo de filtração no pré-tratamento, para maior recuperação da fração líquida. Assim, como na etapa de filtração na clarificação, onde se notou perda de galactose, pois parte do líquido ficou retido na massa de sulfato de cálcio e carvão ativado, mas principalmente o pré-tratamento em si, onde foi obtido o menor rendimento de todo o processo. No entanto, os resultados com planejamento experimental e outros trabalhos indicam que o processo enzimático pode atingir os melhores rendimentos.

8. Conclusões

- ❖ O processo de caracterização de *K. alvarezii* resultou na determinação de 31% (m/m) de galactose e 9,5% (m/m) de glicose. O resíduo celulósico, produto sólido da separação da fração líquida após pré-tratamento, continha 67,2% (m/m) de glicose em sua composição.
- ❖ O pré-tratamento da macroalga com ácido sulfúrico diluído resultou em um hidrolisado com 81,6 g/L de galactose, sendo a maior concentração desta hexose reportada na literatura. As condições que conduziram a esta concentração de galactose foram: relação sólido:líquido de 1g:2mL de solução ácida com 1% v/v de H₂SO₄, mantidos a 121 °C por 60 minutos. No entanto, hidroximetil furfural (HMF), um produto da desidratação de hexoses e inibidor do metabolismo microbiano, foi detectado nos hidrolisados em concentrações que variaram de 16,7 a 20,7 g/L.
- ❖ Visando contornar o efeito tóxico do HMF, a estratégia de destoxificação com carvão ativo foi adotada. Diferentes concentrações deste agente de destoxificação foram empregadas, sendo a relação de 10g de carvão ativado para cada grama de HMF a que resultou em maior remoção deste composto furânico (menores que 2 g/L).

- Após destoxificação, a fase líquida rica em galactose, uma das duas correntes gerada no pré-tratamento, foi fermentada por *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782, obtendo-se 48,1 g de etanol, com eficiência de fermentação de 90,6%.
- ❖ A fração sólida, segunda fração oriunda do pré-tratamento, denominada de resíduo celulósico (RC), foi fermentada através da concepção de sacarificação e fermentação simultâneas (processo de SSF) com carga enzimática de 45 FPU/g de RC, atingindo-se uma eficiência de 78,5%, tendo gerado um meio de fermentação com concentração de etanol de 53,5 g/L.
- ❖ O processo de sacarificação e co-fermentação simultâneas, modelo de corrente única (processo SSCF) apresentou desempenho inferior (76 gramas de etanol por kg alga seca) quando comparado ao processo de sacarificação e fermentação simultâneas (processo SSF), modelo de duas correntes (91,8 gramas de etanol por kg alga seca); no entanto, o processo SSCF resultou em uma concentração de etanol de 65,5 g/L.
- ❖ Diante das concentrações finais de etanol obtidas pela fermentação isoladamente da fração líquida (37 g/L), pelo processo SSF (52 g/L) e pelo processo SSCF (65 g/L), é possível registrar como as maiores concentrações reportadas na literatura.
- ❖ A linhagem de levedura utilizada no presente trabalho, *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1782, consumiu e fermentou eficientemente, tanto a glicose, quanto a galactose, sendo assim uma candidata potencial para a produção de etanol a partir de algas vermelhas.

9. Perspectivas futuras

Considerando as perdas com o pré-tratamento ácido diluído da macroalga, considera-se de grande importância avaliar a hidrólise enzimática

da carragena, para geração de galactose. Caso esse processo tenha sucesso, devem-se iniciar estudos para produção de carragenases e sua aplicação na produção de etanol 3G.

Sendo conhecido o grande potencial de bactérias carragenolíticas, propõe-se estudar os genes responsáveis pela produção de carragenases para a adoção de microrganismos geneticamente modificados para CBP 3G, estudando também a remoção de qualquer gene responsável pela inibição no transporte e transformação da galactose (via de Leloir) pela presença de glicose.

Como foi identificada uma possível inibição do metabolismo fermentativo pela concentração de etanol, deve se ter atenção para seleção de levedura, ou bactéria, com maior tolerância a concentração de etanol.

Sugere-se estudos de ampliação de escala, com dimensionamento de uma unidade piloto a fim de se explorar o potencial desses destacados organismos aquáticos.

Partindo do estudo modelo de K. alvarezii, iniciar novos estudos com algas nativas da costa brasileira e incentivar o cultivo de algas no Brasil.

10. Bibliografia

AliceWeb, http://aliceweb2.mdic.gov.br/, acesso fevereiro 2013.

Almeida J. R., Modig T., Petersson A., Hahn-Hägerdal B., Lidén G., Gorwa-Grauslund M.F., **Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by** *Saccharomyces cerevisiae*. J Chem Technol Biotechnol 82:340–349, 2007.

Almeida, J. R. M., Bertilsson, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Gorsich, S., Liden, G., Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. Appl Microbiol Biotechnol 82(4):625–638, 2009.

Anfavea, Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores Assessoria de Planejamento Econômico e Estatístico Indústria Automobilística Brasileira - Empresas Associadas Tabela 10 - **Produção de Autoveículos por Tipo e Combustível - 2010**, acesso Março, 2013.

Areces, A. J., Cultivo comercial de carragenófitas del género *Kappaphycus* Doty. In: Alveal K, Ferrario ME, Oliveira EC, Sar E (eds) Manual de Métodos Ficológicos. Universidad de Concepción, Concepción, Chile, pp 529–549, 1995.

Barsanti, L., Gualtieri, P., Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, 2006.

Bagreev, A., Rhaman, H., Bandosz, T. J., **Thermal regeneration of a spent activated carbon adsorbent previously used as hydrogen sulfide adsorbent**. Carbon 39 (9): 1319–1326, 2001.

Banerjee, N., Bhatnagar, R., Viswanathan, L., **Inhibition of glycolysis by furfural in** *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 11:226–228, 1981.

Binder, J. B., Cefali, A. V., Blank, J. J., Raines, R. T., **Mechanistic insights** on the conversion of sugars into 5-hydroxymethylfurfural, Energy Environ. Sci. 3, 765–771, 2010.

Bixler, H.J., Porse, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. J Appl Phycol 23: 321-335, 2011.

- BNDES Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. Ampliação da Produção de Etanol e Co-geração de Energia Elétrica. Disponível em: www.bndes.gov.br/conhecimento/seminario/alcool_discussao.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2009, 2003.
- Bro, C., Knudsen, S., Regenberg, B., Olsson, L., Nielsen, J., **Improvement of galactose uptake in** *Saccharomyces cerevisiae* **through overexpression of phosphoglucomutase: Example of transcript analysis as a tool in inverse metabolic engineering**. Applied Environmental Microbiology 71(11), 6465–6472, 2005.
- Bruton, T., Lyons, H., Lerat, Y., Stanley, M., Rasmussen, M. B., A Review of the Potential of Marine Algae as a Source of Biofuel in Ireland. Sustainable Energy Ireland, 2009.
- Carvalho, G. B. M., Ginoris, Y. P., Silva, C. C., Cândido, E. J., Almeida e Silva, J. B., **Avaliação preliminar do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto para fins biotecnológicos**, Revista Analytica, Junho/Julho N°17, 2005.
- Chapman, A. R. O., Brown, M. T., Lahaye, M., A new chemical tool for the characterization and partial depolymerization of red algal galactans. Hydrobiologia 260/261, 641-645, 1993.
- Critchley, A. T. Introduction: Seaweed resources. In: OHNO, M.; Critchley, C., **Seaweed cultivation and marine ranching**, p. 1-6, 1993.
- Cruz, J. C., Pereira Filho, I. A., Pereira, F. T. F., Alvarenga, R. C., Konzenl, E. A., **Produção Orgânica de Grãos e Silagem de Milho**. Rev. Bras. Agroecologia, v.2, n.1, fev. 2007.
- Daroch, M., Geng, S., Wang, G., **Recent advances in liquid fuel production from algal feedstock**. Appl. Energy. http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.031>, 2012.
- Dawes, C. J., Stanley N. F., Stancioff D. J., Seasonal and reproductive aspects of plant chemistry and iota Carrageenan from Floridian *Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales) Bot. Mar. 20, 137–147, 1977.

EPOBIO, Micro- and macro-algae: utility for industrial applications, Outputs from the EPOBIO project September, 2007.

Faccini, A., Importância econômica e cultivo de algas marinhas, X Simpósio de Biologia Marinha da Unisanta, 2007.

FAO, Global Aquaculture Production 1950-2010, http://www.fao.org/figis/servlet/TabSelector>, acessado em março 2013.

FAO, **A guide to the seaweed industry**, FAO Fisheries Technical Paper No. 441, 2003.

Gancedo, J., M., Yeast carbon catabolite repression, Microbiology and Molecular Biology Reviews 62, no. 2, 334-361, 1998.

Ge, L., Wang, P., Mou, H., Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol, Renewable Energy 36 84 – 89, 2011.

Goes, H., G., Monitoramento da produção e do rendimento de carragena da macroalga exótica *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva e avaliação de técnicas de produção, em cultivo comercial na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009.

Goldemberg, J., Johansson, T., **World Energy Assessment Overview**, United Nations Development Programme, Nova York, EUA, 2004.

Gorsich, S. W., Slininger, P. J., McCaffery, J. M., **The fermentation inhibitor furfural causes cellular damage to** *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology for Fuels And Chemicals Symposium Proceedings Paper No. 4–17, 2006.

Hayashi, L., Paula, E. J., Chow, F., Growth rates and carrageenan analysis of four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters, 2006.

Hayashi, L. Análise do cultivo experimental de *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiaceae) em Florianópolis, Santa Catarina, Relatório técnico, 2010.

Hayashi, L., Contribuição à maricultura da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) para produção de carragena. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2007.

Hayashi, L., Extração, teor e propriedades de carragena de *Kappaphycus alvarezii*, em cultivo experimental em Ubatuba, SP-Brasil, 2001.

Hoebler, C., Barry, J. L., David, A., Delort-Laval, J. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gasliquid chromatography. J. agric. Food Chem. 37: 360–367, 1989.

Hoek, C. Van Den, Mann, D.G., Jahns, H.M., Algae: An introduction to phycology, Cambridge University Press, United Kingdom, 1998.

Hoffmann, R.A., Gidley, M.J., Cooke, D., Frith, W., Effect of isolation procedures on the molecular composition and physical properties of *Eucheuma cottonii* carrageenan. Food Hydrocolloids 9, 281–289, 1995.

Hurtado, A. Q., Agbayani, R.F., Sanares, R. and Castro-Mallare, M.T.R., **The seasonality and economic feasibility of cultivating** *Kappaphycus alvarezii* in **Panagatan Cays, Caluya, Antique, Philippines**. Aquaculture 199, 295–310, 2001.

Jaulneau, V., Lafitte, C., Jacquet, C., Fournier, S., Salamagne, S., Briand, X., Esquerrè-Tugayé, M-T., Dumas, B., **Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway.** Journal of Biomedicine and Biotechnology, doi:10.1155/2010/525291, 2010.

de Jong, E., van Ree, R., Kwant, I. K., **Biorefineries: Adding Value to the Sustainable Utilisation of Biomass**. IEA Bioenergy, September. http://www.ieabioenergy.com/LibItem.aspx?id=6420>, 2009.

Khambhaty, Y., Mody, K., Gandhi, M.R., Thampy, S., Maiti, P., Brahmbhatt, H., Eswaran, K., Ghosh, P.K., *Kappaphycus alvarezii* as a source of bioethanol. Bioresourse Technology. 103, 180–185, 2012.

Kim, N.-J., Li, H., Jung, K., Chang, H.N., Lee, P.C., **Ethanol production** from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11, Bioresourse Technology. 102, 7466–7469, 2011.

- King, D., Hagan, A., Löffler, K., Gillman, N., Weihe, U., Oertel, S., **The Future of Industrial Biorefineries**, World Economic Forum, 2010.
- Keating, J. D., Robinson, J., Cotta M. A., Saddler, J. N., Mansfield, S. D., An ethanologenic yeast exhibiting unusual metabolism in the fermentation of lignocellulosic hexose sugars. Journal Industrial Microbiology Biotechnology, 31, 235–244, 2004.
- Koh, L., Ghazoul, J., Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities, Biological conservation, 141, 2450-2460, 2008.
- Kumar, K., Ganesan, K., Rao, P., Phycoremediation of heavy metals by the three-color forms of *Kappaphycus alvarezii*, Journal of Hazardous Materials, 143, 590-592, 2006.
- Kumar, S., Gupta, R., Kumar, G., Sahoo, D., Kuhad, R. C., **Bioethanol** production from *Gracilaria verrucosa*, a red alga, in a biorefinery approach,

 Sioresourse

 Sioresourse

 Http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.120>, 2013
- Lahaye, M., Thibault, J.F., Chemical and physicochemical properties of fibres from algal extraction byproducts. In Waldron K, Johnson IT, Fenwick GR.(eds) Dietary Fibre: Chemical and Biological Aspects, Royal Society of Chemistry, DAT Southgate, 83, 68–72, 1990.
- Lechat, H., Amat, M., Mazoyer, J., Gallant, D. J., Buleon, A., Lahaye, M., Cell wall composition of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) partitioned by wet sieving, Journal of Applied Phycology 9, 565–572, 1997.
- Lee S.-M., Lee J.-H. Ethanol fermentation for main sugar components of brown algae using various yeasts. J Ind Eng Chem (Amsterdam, Neth) 18:16–8, 2012
- Lee, K.-S., Hong, M.-E., Jung, S.-C., Ha, S.-J., Yu, B. J., Koo, H. M., Park, S. M., Seo, J. -H., Kweon, D.-H., Park, J. C., Jin, Y.-S. **Improved Galactose Fermentation of** *Saccharomyces cerevisiae* **Through Inverse Metabolic**. Engineering, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 108, No. 3, 2011.
- Lee, R., Phycology, Cambridge University Press, Cambridge, 1999.

- Lim, J.R., Porse, H., Breakthrough in the commercial culture of *Eucheuma spinosum* in northern Bohol, Philippines. *In:* Levring, T (ed.), Proceedings of the 10th International Seaweed Symposium. Walter de Gruyter, Berlim, 1981.
- Lohr, D., Venkov, P., Zlatanova, J., **Transcriptional regulation in the yeast** *GAL* gene family: a complex genetic network, FASEB, 9, 777-87, 1995.
- Lora, E.S.; Andrade, R.V. **Biomass as energy source in Brazil**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.13, p.777-788, 2009.
- Lynd, L. R., Weimer, P.J., van Zyl, W. H., Pretorius, I. S., **Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology**. Microbiology Molecular Biology, 66, p. 506-577, 2002.
- McHugh, D. J., A guide to the seaweed industry. FAO Fish Tech Pap 441, 105, 2003.
- Maeda, R. N., Serpa, V. I., Rocha, V. A., Mesquita, R. A., Santa Anna, L. M., Castro, A. M., Driemeird, C. E., Pereira Jr., N., Polikarpov, I., Enzymatic hydrolysis of preteated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Thricoderma harzianum*. Process Biochem. 46, 1196–1201, 2011.
- Meinita, M.D.N., Kang, J.-Y., Jeong, G.-T., Koo, H., Park, S., Hong, Y.-K., Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenanophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). J. Appl. Phycol., 1–6, 2012a.
- Meinita, M.D.N., Hong, Y.-K., Jeong, G.-T., **Detoxification of acidic catalyzed hydrolysate of** *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). Bioprocess Biosystem Engineering. 35, 93–98, 2012b.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagente for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry, v.31, n. 3, p.426-428, 1959.
- Moreira, N., Growing expectations: new technology could turn fuel into a bump crop. Scientific News online, 168 (14), 209-224, 2005.
- Noseda, M.D., **Polissacarideos sulfatados da fase tetrasporofítica** de *Gigartina skottsbergii* (Rhodophyta, Gigartinales), Tese, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 1994.

- Ostergaard, S, Olsson, L, Johnston, M, Nielsen, J., Increasing galactose consumption by *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic engineering of the *GAL* gene regulatory network. National Biotechnology 18(12), 1283–1286, 2000.
- Ostergaard, S, Walloe, K. O., Gomes, S. G., Olsson, L., Nielsen, J., **The impact of** *GAL6***,** *GAL80***, and** *MIG1* **on glucose control of the** *GAL* **system in** *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, FEMS Yeast Res 1(1), 47–55, 2001.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition, Bioresource Technology 74 25-33, 2000.
- Paula, E. J., Pereira, R. T. L., Factors affecting growth rates of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex. P. Silva (Rhodophyta, Solieriaceae) in subtropical waters of São Paulo State, Brazil. In: Chapman A.R.O., Anderson R.J., Vreedland V.J. & Davison I.R. (eds) Proceedings of the 17th International Seaweed Symposium, Cape Town. Oxford. Oxford University Press. pp 381- 388, 2003.
- Paula, E.J., Marinomia da alga exótica, *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta), para produção de carragenas no Brasil. Tese de Livre-Docência. Universidade de São Paulo, São Paulo. 39pp, 2001.
- Pereira Jr., N., Investigation of D-xylose Fermenting Yeast. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry. The University of Manchester, UK, 1991.
- Pereira Jr., N; Couto, M. A. P.; Santa Anna, L. M. M., Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production withn the context of biorefinery. Series on Biotechnology, Ed. 1, v. 2, 2008.
- Phillips, G. O., The chemical identification of PNGcarrageenan. In Phillips GO, Williams PA, Wedlock DJ (eds) Gums and Stabilizers for the Food Industry 8. IRL Press 403–421, 1996.
- Pinto, M. V., Giacaglia, G., Assis, M. R., Aquacultura sustentável Produção de alga marinha da espécie *Kappaphycus alvarezii* em Ubatuba, litoral norte do Estado de São Paulo; V Congresso Nacional de Excelência em Gestão; Rio de Janeiro, 2009.

- Purves, W.K., Orians, G.H., Heller, H.C., Sadava, D., Life: The Science of Biology, 4th Edition Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 1998.
- Qureshi, N., Manderson, G., Bioconversion of renewable resources into ethanol: an economic evaluation of selected hydrolysis, fermentation and membrane technologies, Energy sources 17: 241-265, 1995.
- Raven, P., Evert, R., Eichhom, S., **Biology of Plants**, 5^a edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 1996.
- Sainz, M. B., Commercial cellulosic ethanol: the role of plant-expressed enzymes. Biofuels, 237-264, 2011.
- Santos, F. G. Simpósio Estadual de Agroenergia EMBRAPA. Out. 2007. EMBRAPA Pelotas RS, 2007.
- South, G. R.; Whittick, A., **Introduction to Phycology**. Oxford: Blackwell Scientific, 1987. 341 p.
- Tojo, E., Prado, J., A simple ¹H RMN method for the quantification of carrageenans in blends, Carbohydrate Polymers, 53, pp. 1–5, 2003.
- Trinder, P., Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen, J Clin Pathol. March; v 22(2): 158–161, 1969.
- Trono, G. C. Jr., *Eucheuma* and *Kappaphycus*: taxonomy and cultivation. *In*: Ohno, M & Critchley, A.T. (Eds.) Seaweed cultivation and marine ranching. Kanagawa, Japan, 1993.
- UDOP União dos Produtores de Bioenergia. (2009). Disponível em: < http://www.udop.com.br/download/estatistica/outros_dados_producao_brasil/historico_prod_cana_acucar_alcool_bra.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2011.
- Vidotti, E. C., Rollemberg, M. do C. E., **Algas: Da Economia Nos Ambientes Aquáticos À Biorremediação E À Química Analítica.** Química Nova, Vol. 27, No. 1, 139-145, 2004.
- Wargacki, A.J., Leonard, E., Win, M.N., Regitsky, D.D., Santos, C.N.S., Kim, P.B., Cooper, S.R., Raisner, R.M., Herman, A., Sivitz, A.B., Lakshmanaswamy, A., Kashiyama, Y., Baker, D., Yoshikuni, Y. **An engineered microbial**

platform for direct biofuel production from brown macroalgae. Science 235, 308–313, 2012.

Wikandari, R., Millati, R., Syamsiyah, S., Muriana, R., Ayuningsih, Y., Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on indigenous microbial isolate for bioethanol production. Agric J 2, 105–109, 2010.

Yanagisawa M, Nakamura K, Ariga O, Nakasaki K. **Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides**. Process Biochem 2011; 46:2111–6.

Zemke-White, W.L., Ohno, M., World seaweed utilization: An end-of-century summary. Journal Applied Phycology 11, 369–376, 1999.

Zhang, Y.-H. P., Himmel, M. E., Mielenz, J. R., **Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies**. Biotechnology Advances, 24, p. 452-481, 2006.

Zhang, Y.-H. P., Lynd, L. R., **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non complexed cellulase systems**. Biotechnology Bioengineering, 88, p. 797-824, 2004.



FISEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioresource Technology

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



Production of ethanol 3G from *Kappaphycus alvarezii*: Evaluation of different process strategies



Paulo Iiboshi Hargreaves ^a, Carolina Araújo Barcelos ^a, Antonio Carlos Augusto da Costa ^b, Nei Pereira Jr. ^{a,*}

- ^a Laboratórios de Desenvolvimento de Bioprocessos, Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av., Horácio Macedo 2030, Bloco E, Rio de Janeiro 21949-900, Brazil
- b Laboratório de Bioprocessos, Departamento de Tecnologia de Processos Bioquímicos, Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, R.S. Francisco Xavier 524, Sala 427, Rio de Janeiro 20550-013, Brazil

HIGHLIGHTS

- ▶ Evaluation of different process strategies for producing ethanol from red algae.
- ▶ Activated charcoal powder was efficient in removing HMF in the hydrolysate.
- ▶ Increasing inoculum size to reduce the inhibition of galactose uptake.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 November 2012
Received in revised form 31 January 2013
Accepted 2 February 2013
Available online 9 February 2013

Keywords: Macroalgae Fermentation Enzymatic hydrolysis Biofuel

ABSTRACT

This study evaluated the potential of *Kappaphycus alvarezii* as feedstock for ethanol production, i.e. ethanol 3G. First, aquatic biomass was subjected to a diluted acid pretreatment. This acid pretreatment generated two streams – a galactose-containing liquid fraction and a cellulose-containing solid fraction, which were investigated to determine their fermentability with the following strategies: a single-stream process (simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of both fractions altogether), which achieved $64.3~{\rm g~L^{-1}}$ of ethanol, and a two-stream process (fractions were fermented separately), which resulted in $38~{\rm g~L^{-1}}$ of ethanol from the liquid fraction and $53.0~{\rm g~L^{-1}}$ from the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of the solid fraction. Based on the average fermentable carbohydrate concentration, it was possible to obtain $105~{\rm L~of}$ ethanol per ton of dry seaweed. These preliminaries results indicate that the use of the macro-algae *K. alvarezii* has a good potential feedstock for bioethanol production.

© 2013 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

The advantages of marine biomass as feedstock for third generation biofuel production over previous generations have been discussed in several papers. Among them, it has been highlighted that seaweed does not compete with terrestrial crops and no fresh water is required for their cultivation. Additionally, seaweed has a lower recalcitrance (being more amenable for hydrolysis procedures), consumes huge amounts of CO₂, and has the peculiar feature of not leaving behind a CO₂ footprint because it does not require chemical inputs for their cultivation (da Costa et al., 2010; Kim et al., 2012; Daroch et al., 2012).

Among biofuels, bioethanol is the leading product studied because it is one of the most viable complements to or even a substitute of gasoline. The production of ethanol from fermentation of

the carbohydrate-containing three main groups of macroalgae (green, red and brown) has been investigated, both on naturally occurring or genetically modified yeasts and bacteria (Ge et al., 2011; Meinita et al., 2012a; Khambhaty et al., 2012; Lee and Lee, 2012; Daroch et al., 2012).

The most common polysaccharide in red seaweeds is galactan (carrageenanan and agar), which forms a network with cellulose to constitute the cell wall (Hoek et al., 1998). Currently, the term "carrageenanan" describes a class of sulfated galactans, linear and soluble in water, which occur as a constituent of the cell wall of several species of red seaweeds. The galactans have a basic structure consisting of repeating units of D-galactose residues and 3,6-anhydro-D-galactose linked in α -(1 \rightarrow 3). Galactans have a regular structure, though varies depending on the source and extraction conditions.

In recent years in Rio de Janeiro (Brazil), a carrageenanan-producing company (Ondas Biomar) has been developing a method for the cultivation and harvesting of Kappaphycus alvarezii. This

^{*} Corresponding author. Tel.: +55 21 25627644; fax: +55 21 25627567. *E-mail address*: nei@eq.ufrj.br (N. Pereira Jr.).

macroalgae has displayed a great potential source of feedstock for the production of either high value-added (fine chemicals) or low value-added products (biofuels) because of its high contents of polysaccharides and thin cellulose-containing cell walls. Furthermore, this macroalgae presents a high growth yield per ha compared with that of terrestrial biomass.

In this context, this study investigates the potential use of a red seaweed as feedstock for the production of ethanol through a series of steps involving a physical–chemical pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of the generated hydrolysates by a selected strain of *Saccharomyces cerevisiae* that is capable of uptaking glucose and galactose.

2. Methods

2.1. Seaweed and microorganisms

Red seaweed used in the present work, *Kappaphycus alvarezii*, was kindly supplied by Sete Ondas Biomar Cultivos de Algas Ltda (Itaguaí, Rio de Janeiro, Brazil) and was primarily selected for its high carbohydrate content. The seaweed was first washed, dried at 65 °C and milled through a 5 mm mesh.

The strain of *Saccharomyces cerevisiae* CBS1782 was initially screened for its ability to ferment galactose. The strain belongs to the collection of yeast cultures from the Institute of Microbiology of the Federal University of Rio de Janeiro – Brazil, and it was maintained in a GYMP medium, whose composition is as follows in g L^{-1} : glucose, 20; yeast extract, 5; malt extract, 20; sodium phosphate, 2; and agar, 20.

In preparation of the inoculum, the yeast strain was inoculated from the maintenance medium to the activation media, 500 mL conical flasks containing 250 mL, which had the same composition of the pre-inoculum medium (galactose $20\,\mathrm{g\,L^{-1}}$; yeast extract $2\,\mathrm{g\,L^{-1}}$; urea $1.25\,\mathrm{g\,L^{-1}}$; KH₂PO₄, $1.1\,\mathrm{g\,L^{-1}}$), and incubated at $30\,^\circ\text{C}$ at $200\,\mathrm{rpm}$ for $12\,\mathrm{h}$. The pre-inoculum medium was inoculated with $10\%\,\mathrm{v/v}$ from the activation medium. The fermentation media have the same composition as the synthetic media, except for the carbohydrate (galactose and glucose) concentrations. Each fermentation was inoculated with cells grown in the pre-inoculum medium for $12\,\mathrm{h}$, after which they were centrifuged at $3000\,\mathrm{rpm}$ for $10\,\mathrm{min}$ for a given initial cell concentration (7, $10\,\mathrm{and}$ $20\,\mathrm{g\,dw\,L^{-1}}$). Cell growth was determined by optical density measurements according to a standard curve correlating cell dry weight and absorbance.

2.2. Physical-chemical pretreatment

The best conditions for the algae pretreatment were determined by a factorial experimental design. The following were the factors: exposure time (20, 40 and 60 min) and sulfuric acid concentration (1.0%, 1.5% and 2.0%, v/v). The temperature (121 °C) and the solid concentration (33.3% w/w) were kept constant.

After the pretreatment, the liquid and solid fractions were separated by press filtration with a cotton mesh. The pH of the liquid phase was adjusted to 5.0 with calcium hydroxide, producing calcium sulfate, which was further separated by filtration. Assays were performed in duplicates, and the average results were reported.

The pretreatment efficiency assessment was based on the *K. alvarezii* composition by Lechat et al. (1997).

2.3. Activated charcoal hydrolysate pretreatment

After the hydroxymethyl furfural (HMF) content analysis, the hydrolysate was treated with different concentrations of activated

charcoal powder (5%, 10%, 15%, 20% and 20% w/w) to remove most of the HMF. This procedure was performed to remove HMF because this compound is known to inhibit fermentation (Klinke et al., 2004). Additionally, activated charcoal was used due to its low cost. Initially, the activated charcoal was added to 50 mL flasks with 25 mL of galactose-containing hydrolysate volume and maintained at 30 °C at 200 rpm in an orbital shake for 1 h after which, the samples were withdrawn. For the experiments in the bioreactor, the best ratio of the mass of charcoal: the volume of hydrolysate was used.

2.4. Enzymatic hydrolysis

The enzymatic hydrolysis of the solid phase obtained from the best physical–chemical pretreatment conditions was performed after the pH was adjusted to 5.0 with 2 M NaOH overnight and then washed and dried at 65 °C to obtain the cellulose residue (CR). To ascertain the most favorable conditions for the higher glucose concentrations, the enzyme load and CR concentration were evaluated in a Central Composite Rotational Design (CCRD) experiment. The enzymatic hydrolysis was performed at 50 °C at an agitation speed of 150 rpm using a commercial cellulase preparation (Multifect), which was supplied by Genencor International.

2.5. Carrageenan hydrolysate fermentation and simultaneous saccharification and fermentation of the algal cellulose residue (two-stream model)

The CR enzymatic hydrolysate was fermented in 500 mL conical flasks containing 400 mL of the medium with 18% dry CR (w/v). The SSF process began with enzymatic pre-hydrolysis at 50 °C at 150 rpm for 24 h. Thereafter, the system was inoculated with 7 g L^{-1} dry weight cell, and the process was controlled at 30 °C at 150 rpm. The carrageenan hydrolysate fermentation following the pH adjustment and HMF removal was also performed in 500 mL conical flasks, which contained 400 mL of the medium inoculated with a 7 g L^{-1} dry weight cell. The temperature and agitation speed was maintained at the same values of the SSF process. Samples were withdrawn at regular intervals for sugar and ethanol determination.

2.6. Inoculum size effect on co-fermentation

Assays were performed to confirm the inhibition of the uptake of galactose *S. cerevisiae* in a medium containing 5 g L $^{-1}$ of galactose and glucose. To circumvent this problem, an experiment was performed to evaluate the effect of the inoculum size on the co-fermentation process. The yeast strain was pre-cultured in a synthetic medium containing urea (1.25 g L $^{-1}$), yeast extract (2 g L $^{-1}$), KH $_2$ -PO $_4$ (1.1 g L $^{-1}$) and galactose (20 g L $^{-1}$). An assay was performed in a syntetic sugar mixture of galactose and glucose containing similar amounts of both (approximately 60 g L $^{-1}$). After cell growth, the media were inoculated in duplicates with two initial cell concentrations (10 and 20 g L $^{-1}$ dry weight).

2.7. Simultaneous saccharification and co-fermentation (integrated model)

The SSCF fermentation medium was prepared with a galactose-containing hydrolysate ($80 \, \mathrm{g \, L^{-1}}$), which had previously been detoxified with activated charcoal to remove HMF. The algal CR was suspended in the galactose-containing medium in a concentration of 18% (w/v), and an enzyme load of $45 \, \mathrm{FPU/g}$ CR was added to the system (conditions established after the experimental design). After $24 \, \mathrm{h}$ of pre-hydrolysis at $50 \, ^{\circ}\mathrm{C}$, the temperature was

adjusted to 30 °C, and the system was then inoculated with 20 g $\rm L^{-1}$ of cells.

2.8. Chemical determination

The cellulose content of the CR was determined as described by Ververis et al. (2007).

Samples were analyzed for their galactose, glucose and ethanol contents by High Performance Liquid Chromatography (HPLC, with an HPX-87P column (Biorad®) using water as the mobile phase at 0.6 mL/min and a refractive index detector Waters 2414. The HMF content was also analyzed by the HPLC with the C18 DrMasch GmbH column and a Waters 2428 UV detector.

3. Results and discussion

3.1. Acid pretreatment of algal biomass

The purpose of the acid pretreatment was to disorganize the polysaccharide complexes, making algal cellulose more amenable to enzymatic hydrolysis, similar to the lignocellulose matrix used for terrestrial biomass. Two sequential 2^2 factorial design were performed with sulfuric acid (v/v %) and exposure time (min) as the factors, where the glucose and HMF concentrations were used as the main responses (Table 1).

A hydrolysate was obtained with a maximum galactose concentration of 81.62 g L $^{-1}$, which corresponds to pretreatment efficiency of 51% based on the p-galactose content in this seaweed. Similar concentrations were obtained by other authors using an acid pretreatment of *K. alvarezii*. Khambhaty et al. (2012) achieved a concentration of approximately 70 g L $^{-1}$ of the reducing sugar, which was higher than that obtained by Meinita et al. (2012b), who reported a galactose concentration of 22.4 g L $^{-1}$. Nonetheless, both authors used different physical chemical conditions. The former author used 100 °C/1 h, and the latter used 130 °C/15 min; however, the sulfuric acid concentrations used by them were approximately equal (2–2.5% v/v).

Even if there is a considerable amount of galactose released, the presence of HMF in the solution may hinder the fermentation of the carrageenan hydrolysate. Assays were performed in order to minimize the production of HMF, but the factors for galactose release are directly related to HMF formation.

The presence of this furanic compound is ascribed to the synergy of the main factors of the process, i.e., temperature, time of exposition, acid concentration, and the solid:liquid ratio, which resulted in a severe condition that dehydrates the galactose into HMF. Despite the drawback of the dilute-acid pretreatment and its association with the generation of HMF, this pretreatment is lower in cost than the enzymatic hydrolysis of carrageenanan, and is reported to be an important stage of biomass fractioning because it disorganizes the polysaccharide chains (Betancur and

Table 1 Matrix of sequential 2^2 factorial design for diluted acid pretreatment of dried seaweed and concentrations of galactose and HMF.

Experiment	H ₂ SO ₄ (v/v%)	Time (min)	Galactose (g L ⁻¹)	$HMF(gL^{-1})$
1	1	60	81.62	20.70
2	1.5	60	76.49	18.62
3	1	20	31.34	16.72
4	1.5	20	61.17	17.93
5	1.25	40	61.54	20.52
6	1.25	40	65.00	19.41
7	2	20	47.53	17.68
8	2	60	73.21	17.47
9	1.75	40	79.22	18.57
10	1.75	40	68.58	18.65

Pereira Jr., 2010) and makes cellulose more amenable to the enzymatic hydrolysis (Maeda et al., 2011). Additionally, the acid pretreatment hydrolyses carrageenanan producing galactose (Estevez et al., 2004; Campo et al., 2009) that can be used as a substrate/carbon source for fermentative processes. Based on these results, a detoxification step of the carrageenanan hydrolysate was performed to cause the fermentation by the galactose-consuming yeast strain to occur more rapidly.

3.2. Activated charcoal treatment

It is widely reported in literature that HMF is a potent metabolic inhibitor of microorganisms (Klinke et al., 2004). The removal of this furanic compound was evaluated using activated carbon powder with concentrations indicated in Fig. 1, which shows the gradual removal of this inhibitor by its adsorption by activated charcoal powder. The HMF concentration decreased from 35 to 1.5 g L⁻¹ when the activated charcoal concentration increased from 0% to 25% (w/v). As indicated, there was not a significant variation in the concentration of galactose; similar results were obtained by other authors that detoxified other acid pretreated hydrolysates of sugarcane bagasse, rice straw and wood chips (Tamanini and Hauly, 2004; Villarreal et al., 2006; Mussatto and Roberto, 2004; Martin et al., 2006). In contrast, treating acid hydrolysate of K. alvarezii, Meinita et al. (2012b) succeeded in reducing the concentration of HMF with a loss of galactose of approximately 43.1% when 5% (w/v) of activated charcoal was used.

3.3. Enzymatic hydrolysis

The glucose released and hydrolysis efficiency (based on 66% of CR cellulose content) during the enzymatic pretreatment for 24 h, where the commercial preparation Multifect© was used, is shown in Table 2. The highest glucose concentration was obtained under the conditions of experiment 6 (18.07% CR concentration and enzyme load of 45 FPU/g CR), and the highest enzymatic hydrolysis efficiency was attained in experiment 5 (7.32% CR concentration and 45 FPU/g CR). Furthermore, higher concentrations of CR were investigated (Table 3); however, no gain whatsoever was observed in glucose yield, whereas there was a decrease of 14% in the hydrolysis efficiency by increasing the solid concentration from 18% to 20% w/v.

Fig. 2 shows that the regions with a high glucose yield are distinct from those of high enzymatic efficiencies, which is primarily due to diffusional resistance related to mass transfer and intensified by high solid concentrations (substrate adsorption, bulk and pore diffusion, etc., Zhang and Lynd, 2004), which hindered the

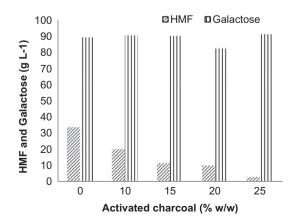


Fig. 1. Effect of activated charcoal powder concentration on HMF removal.

Table 2Matrix of the Central Composite Rotational Design (CCRD) for cellulose residue, enzymatic load and the corresponding glucose yield and hydrolysis efficiency at 24 h of enzymatic hydrolysis.

Experiment	CR (% w/v)	Enzymatic load (FPU g^{-1})	Glucose (g L ⁻¹)	Hydrolysis efficiency (%)
1	9	20	39.6	68.1
2	16	20	43.4	39.4
3	9	70	45.0	74.9
4	16	70	83.3	75.6
5	7	45	40.7	84.1
6	18	45	92.3	77.3
7	13	9.6	34.4	39.9
8	13	80.3	70.9	82.3
9 (c)	13	45	68.2	79.2
10 (c)	13	45	65.2	75.7

CR: cellulosic residue; (c): central point.

Table 3 Enzymatic hydrolysis of algal cellulose residue at higher concentrations with the enzymatic load fixed at 45 FPU/g CR.

CR (% w/v)	Glucose (g L ⁻¹)	Hydrolysis efficiency (%)
18	90.9	76.4
19	87.7	68.6
20	90.9	66.1

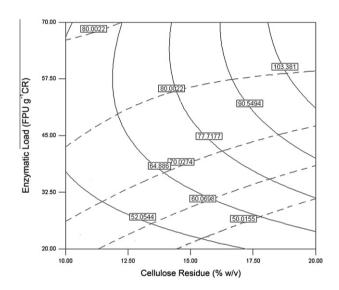


Fig. 2. Overlapped curves of glucose yield (g L^{-1} , solid line) and hydrolysis efficiency (%, dashed line) generated in the factorial experimental design by the contour surface from the CCRD.

action of the cellulolytic enzymes. Therefore, if the objective is to maximize the enzymatic hydrolysis efficiency, a lower solid concentration should be used. However, if the objective is to obtain a high glucose yield, a higher solid concentration should be used. However, in the simultaneous saccharification and fermentation technology conception, the enzymatic efficiency tends to increase up to the end of the process as biomass continues to be hydrolyzed throughout the process. Thus, an enzyme load of 45 FPU/g CR and a CR concentration of 18% (w/v) were fixed for the continuation of the work.

3.4. Fermentation of carrageenan hydrolysate

After the activated charcoal pretreatment for HMF removal, the carrageenan hydrolysate with a galactose concentration of 81 g L^{-1} was fermented by a galactose-using strain of S. cerevisiae (Fig. 3), which had been grown previously in a galactose synthetic medium. A maximum ethanol concentration of 37 g L^{-1} was achieved after

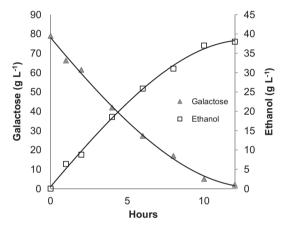


Fig. 3. Fermentation of galactose-containing algae hydrolysate by *S. cerevisiae* at $30 \, ^{\circ}\text{C}$ with an inoculum size of 7 g dw L^{-1} .

12 h of fermentation, corresponding to a volumetric productivity of 3.1 g L $^{-1}$ h, a product yield of 0.457 g/g substrate consumed and a 90.6% fermentation efficiency. Compared with two recent studies on bioethanol production from hydrolysates arisen from acid pretreatment of *K. alvarezii*, Khambhaty et al. (2012) and Meinita et al. (2012a) obtained 15.7 g L $^{-1}$ (0.32 g L $^{-1}$ h volumetric productivity) and 1.7 g L $^{-1}$ (0.063 g L $^{-1}$ h volumetric productivity) of ethanol, respectively.

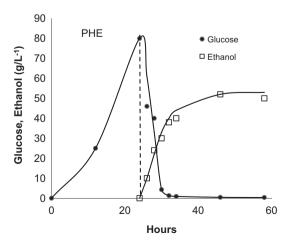


Fig. 4. Simultaneous saccharification and fermentation of *K. alvarezii* cellulosic residue (CR) by *S. cerevisiae* at 30 °C. PH: prehydrolysis (24 h at 50 °C, CR concentration of 18% w/v) with an inoculum size of 7 g dw L⁻¹.

Table 4 Cell growth in sugar mixture.

Time (h)	Glucose (g L^{-1})	Galactose (g L ⁻¹)	Cell concentration (g L ⁻¹)
0	5	5	0.4
1	4.5	5.00	0.41
2	2.58	5.00	1.15
3	0.19	4.90	1.93
4	0.21	4.41	2.22
5	0.03	3.04	2.39
6	0.02	0.34	3
7	0	0.11	3.1
8	0	0.07	3.1

3.5. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of the algae cellulosic residue

After the assessment of enzymatic hydrolysis of the cellulosic residue, an SSF process (Fig. 4) was performed to demonstrate the feasibility of fermenting the algae cellulosic residue. The glucose concentration reached $80.8~g~L^{-1}$ after 24 h of enzymatic prehydrolysis, where the concentration of ethanol after 46 h was $52.0~g~L^{-1}$ with the cellulolytic pool acting continuously on the cellulose residue. This result corresponds to a volumetric productivity of $1.13~g~L^{-1}$ h and 78.5% fermentation efficiency.

The SSF of the CR with a composition of 66% cellulose (w/w) resulted in an enzymatic efficiency of 70.3%. Ge et al. (2011) reported a higher value for the hydrolysis of Laminaria japonica (80.8%). However, the hydrolysate was concentrated by rotary evaporation to reach a glucose concentration of $53.5~{\rm g\,L^{-1}}$, which was fermented separately, resulting in an ethanol concentration of $23.3~{\rm g\,L^{-1}}$ after 48 h of fermentation. This result corresponds to a volumetric productivity of 0.49 g ${\rm L^{-1}}$ h, which is much less than the value obtained in the present work.

3.6. Evaluation of the inoculum size for the co-fermentation of glucose and galactose

Yeast growth was supported by both sugars; however, galactose was assimilated after total glucose depletion (Table 4). Preliminary observations confirmed that the galactose consumption had been inhibited by glucose uptake when the cells were grown previously in glucose. Further assays indicated that when using galactose as the substrate in the inoculum medium, the galactose assimilation lag phase was considerably reduced (data not shown).

The co-fermentation assay indicated that the strategy of increasing the inoculum is interesting, not only to increase the kinetics of the process but also to diminish the inhibition of the galactose consumption caused by the glucose uptake (Fig. 5b). It

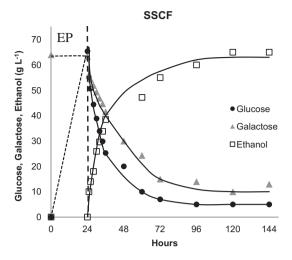
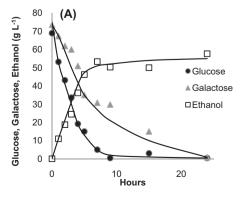


Fig. 6. Simultaneous saccharification and co-fermentation with 18% CR content and 45 FPU/g for pre-hydrolysis, taking 24 h, and algae hydrolysate (63.2 g $\rm L^{-1}$ of galactose).

is well documented that glucose is a potent inhibitor of the consumption of other sugars (Gancedo, 1998) because microbial cells have a higher affinity for glucose. Nonetheless, the yeast cells used in the present investigation were pre-cultivated in a galactose medium, causing the inhibition phenomenon to be less important. Additionally, the more efficient galactose consumption as the inoculum size rose can be ascribed to the presence of a higher number of more competent cells in the medium, bearing specific transporters that allowed them to readily metabolize galactose by enzymes of the Leloir pathway before the process of inhibition began due to the presence of glucose.

3.7. Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of pretreated K. alvarezii

After confirming the possibility of using a massive inoculum to overcome the inhibition of the Leloir pathway in the presence of glucose, the same strategy was adopted for the SSCF process. The galactose-containing liquid fraction was assembled with the cellulosic residue in a concentration of 18% (w/v), followed by enzymatic prehydrolyis for 24 h; after which, the yeast strain was inoculated for ethanol fermentation (Fig. 6). The results indicated a clear improvement in the assimilation and fermentation of galactose together with glucose, as shown in the assay with the synthetic medium of the co-fermentation of both sugars. Despite achieving a good result (65 g $\rm L^{-1}$ of ethanol) at the end of the



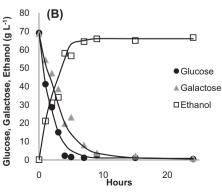


Fig. 5. Co-fermentation by S. cerevisae at 30 °C using a syntetic sugar mixture of galactose and glucose for the inoculum size evaluation. (A) 10 g L⁻¹ inoculum and (B) 20 g L⁻¹ inoculum.

Table 5Material balance for the production of ethanol from *K. alvarezii*.

Step	Input	Output	Efficiency
Pre-treatment	1000 g DSW + 2 L 1% v/v H ₂ SO ₄	$1.4 L (80 g Gal L^{-1} + 20 g HMFL^{-1}) + 150 g CR^*$	38%
Detoxification	1.4 L (80 g GAL ⁻¹ + 20 HMF g/L ⁻¹) + 370 g AC	1.3 L (80 g Gal L^{-1} + < 1 g HMF/ L^{-1})*	95%
GAL fermentation	1.3 L (80 g Gal L^{-1} and <1 g HMF L^{-1})	48.1 g EtOH#	90.6%
SSF	833 mL + 150 g CR	43.7 g EtOH#	78.5%

DSW: dry seaweed; GAL: galactose, HMF: hydroxymethyl furfural, AC: activated charcoal, CR: dry cellulosic residue, SSF Simultaneous Saccharification and Fermentation; EtOH: ethanol: *after filtration: #HPLC analysis.

fermentation, some glucose and galactose remained in the medium, which might be due to the yeast ethanol tolerance.

In other studies using brown algae, Kim et al. (2011) using an *E. coli* KO11 recombinant as the fermenting agent obtained an ethanol concentration of 23–29 g L $^{-1}$ after 44 h. In another paper by Lee and Lee (2012) using *S. cerevisiae* (KCCM50550) as the fermentation agent, an ethanol concentration of only 2.7 g L $^{-1}$ was attained, and with *Debaryomyces occidentalis* (KCTC7196), the concentration of this biofuel was 10.9 g L $^{-1}$ after 7 days of fermentation. The results obtained herein show an additional step toward third generation biofuel production, indicating that seaweed has the potential and may be an interesting alternative feedstock for ethanol production.

3.8. Mass balance

Based on the two-stream model for ethanol production from *K. alvarezii* and on the results obtained in the present work, a material balance was done to evaluate the ratio of ethanol produced per dry weight of seaweed. Table 5 shows the inputs and outputs of each step (diluted acid pretreatment, detoxification, galactose fermentation and simultaneous saccharification and fermentation of the algal cellulosic residue).

Considering the values reported by Lechat et al. (1997) for *K. alvarezii*, which contains 320 g of galactose and 180 g of glucose, for every kilo of dry seaweed, 104 g of galactose was obtained in the present work, resulting in an estimated efficiency of 38%. After detoxification, a medium containing 80 g galactose L⁻¹ was efficiently fermented (90.6%) by the galactose-consuming strain of *S. cerevisiae*. On the other side, the simultaneous saccharification and fermentation of the algal cellulosic residue performed quite well, providing an overall efficiency of 78.5%, which is in accordance with the results reported in literature for the SSF process applied to lignocellulosic feedstocks (Zhu et al., 2011; Maeda et al., 2013).

Taking into account the yields and losses in each step, one can estimate that the process herein investigated resulted in a ratio 105 L of ethanol per ton of dry seaweed. Certainly, there are opportunities for process improvements since, a part from the good results obtained in the fermentation stages, the bottleneck of the process resides in the pretreatment, where a great part of the galactose was converted into hydroxymethyl furfural and other derivatives. Also, additional part of the galactose was retained in the cellulosic solid fraction (50%). Its recuperation for the two-stream model process would require washes which in turn would dilute the released galactose; however this diluted galactose stream is not wasted since it can be used for inoculum preparation.

4. Conclusions

This work demonstrates the feasibility of producing ethanol 3G from *K. alvarezii* through different process strategies: the two-stream model and the integrated model. The diluted acid

pretreatment conditions created from a factorial design were sufficient for obtaining a liquid fraction containing $80\,\mathrm{g\,L^{-1}}$ of galactose. The galactose-using strain of *S. cerevisiae* proved to be capable of efficiently growing and fermenting the galactose hydrolysate from the pretreatment and the glucose generated by the enzymatic hydrolysis of the algal cellulose fraction. The two-stream model was shown to be the best strategy, resulting in $105\,\mathrm{L}$ of ethanol per ton of dry seaweed.

Acknowledgements

The authors would like to thank the continuous support of the Brazilian Council for Research and Development (CNPq), the Rio de Janeiro State Foundation for Research (FAPERJ) and OndasBiomar for providing the seaweed.

References

Betancur, G.J.V., Pereira Jr., N., 2010. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: diluted acid pretreatment optimization. Electron. J. Biotechnol. 13 (3), Issue of May 15.

Campo, V.L., Kawano, D.F., da Silva Jr., D.B., Carvalho, I., 2009. Carragenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. Carbohydr. Polym. 77, 167–180.

Da Costa, A.C.A., Pereira Jr., N., Aranda, D.A.G., 2010. The situation of biofuels in Brazil: new generation technologies. Renew. Sustain. Energy Rev. 14, 3041–3049.

Daroch, M., Geng, S., Wang, G., 2012. Recent advances in liquid fuel production from algal feedstock. Appl. Energy. http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.031.

Estevez, J.M., Ciancia, M., Cerezo, A.S., 2004. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with empashis on its minor constituents. Carbohydr. Res. 339, 2575–2592.

Gancedo, J.M., 1998. Yeast carbon catabolite repression. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 334–361.

Ge, L., Wang, P., Mou, H., 2011. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. Renewable Energy 36, 84–89.

Hoek, C. Van Den, Mann, D.G., Jahns, H.M., 1998. Algae: An Introduction to Phycology. Cambridge University Press, United Kingdom.

Khambhaty, Y., Mody, K., Gandhi, M.R., Thampy, S., Maiti, P., Brahmbhatt, H., Eswaran, K., Ghosh, P.K., 2012. *Kappaphycus alvarezii* as a source of bioethanol. Bioresour. Technol. 103, 180–185.

Kim, N.-J., Li, H., Jung, K., Chang, H.N., Lee, P.C., 2011. Ethanol production from marine algal hydrolysates using Escherichia coli KO11, Bioresour. Technol. 102, 7466–7469.

Kim, S.R., Ha, S., Wei, N., Oh, E.J., Jin, Y., 2012. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. Trends Biotechnol. 30 (5).

Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B.K., 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66, 10–26.

Lechat, H., Amat, M., Mazoyer, J., Gallant, D.J., Buleon, A., Lahaye, M., 1997. Cell wall composition of the carrageenanophyte *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) partitioned by wet sieving. J. Appl. Phycol. 9, 565–572.

Lee, S., Lee, J., 2012. Ethanol fermentation for main sugar components of brownalgae using various yeasts. J. Ind. Eng. Chem. 18, 16–18.

Maeda, R.N., Serpa, V.I., Rocha, V.A., Mesquita, R.A., Santa Anna, L.M., Castro, A.M., Driemeird, C.E., Pereira Jr., N., Polikarpov, I., 2011. Enzymatic hydrolysis of preteated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Thricoderma harzianum*. Process Biochem. 46, 1196–1201.

Maeda, R.N., Barcelos, C.A., Anna, L.M., Pereira Jr., N., 2013. Cellulase production by Penicillium funiculosum and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. J. Biotechnol. 163 (1), 38–44.

- Martin, C., Gonzalez, Y., Fernandez, T., Thomsen, A.B., 2006. Investigation of cellulose convertibility and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. J. Chem. Technol. Biotechnol. 81 (10), 1669–1677.
- Meinita, M.D.N., Kang, J.-Y., Jeong, G.-T., Koo, H., Park, S., Hong, Y.-K., 2012a. Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenanophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). J. Appl. Phycol., 1–6.
- Meinita, M.D.N., Hong, Y.-K., Jeong, G.-T., 2012b. Detoxification of acidic catalyzed hydrolysate of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). Bioprocess Biosyst. Eng. 35, 93-98
- Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. Bioresour. Technol. 93, 1–10.
- Tamanini, C., Hauly, M.C.O., 2004. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. Semina: Ciências Agrárias 25 (4), 315–330.

- Villarreal, M.L.M., Prata, A.M.R., Felipe, M.G.A., Almeida, E., Silva, J.B., 2006. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. Enzyme Microb. Technol. 40, 17–24.
- Ververis, C., Georghiou, Danielidis, K.D., Hatzinikolaou, D.G., Santas, P., Santas, R., Corleti, V., 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. Bioresour. Technol. 98, 296–301.
- Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R., 2004. Towards an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. Biotechnol. Bioeng. 88, 797–824.
- Zhu, J.Y., Gleisner, R., Scott, C.T., Luo, X.L., Tian, S., 2011. High titer ethanol production from simultaneous enzymatic saccharification and fermentation of aspen at high solids: a comparison between SPORL and dilute acid pretreatments. Bioresour. Technol. 102, 8921–8929.