UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

RAFAEL CUNHA DE ASSIS CASTRO

Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* produtora de etanol e sua aplicação no processo de sacarificação e fermentação simultânea da celulignina de palha de arroz

Lorena - SP
2011

RAFAEL CUNHA DE ASSIS CASTRO

Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* produtora de etanol e sua aplicação no processo de sacarificação e fermentação simultânea da celulignina de palha de arroz

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa.

Orientadora: Prf^a. Dr^a. Inês Conceição Roberto

Lorena - SP
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Castro, Rafael Cunha de Assis

Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* produtora de etanol e sua aplicação no processo de sacarificação e fermentação simultânea da celulignina de palha de arroz. / Rafael Cunha de Assis Castro. – 2011.

103 p. : il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2012.

Orientadora: Inês Conceição Roberto.

1. Etanol 2. Celulignina (Palha de arroz) 3. Sacarificação 4. Fermentação 5. *Kluyveromyces marxianus*. I. Título

661.722 - CDU

*Dedico esta dissertação aos meus pais,
Paulo Sérgio e Solange, e à minha noiva
Raquel.*

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e de todos, agradeço a Deus por conduzir e abençoar a minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Inês Conceição Roberto, pela orientação sempre presente, pela disposição, o comprometimento, o esforço e o capricho para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Paulo Sérgio e Solange, pelo amor incondicional, carinho, apoio e incentivo constante.

À minha noiva Raquel, pelo companheirismo, amor, carinho, conselhos e ajuda nos momentos certos. Agradeço a você, meu amor, pela compreensão e por sonharmos juntos em construir a nossa família.

Aos meus sogros, Paulo e Alice, por receber mais um filho em vários fins de semana e feriados, com todo o carinho e atenção.

Aos companheiros de república, Juan Rivaldi, Thales e José Afonso Júnior pela amizade e convivência agradável.

Aos amigos do laboratório: Bruno Guedes, Dani Cortez, Lívia, João Paulo, Dani Garcia, Túlio, Isabela, Bárbara, Tanus, Tathi, Juliana, e aos amigos internacionais Maria Fernanda, Alberto, Soledad e Juan Gabriel, pela amizade, ajuda, conselhos e ensinamentos.

Aos amigos dos demais laboratórios: Germano, Celso, Victor, Paula, Jose, Felipe, Sérgio, Flávio, Cláudio, Kelly, Naila, Rafael Candido, Omar, Fernanda e Gina, pelos momentos de confraternização e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Biotecnologia, Paulinho, Nicamor, Zé “Cobrinha”, Cibeles, André, Nadir e Isnaldi por estarem sempre prontos a ajudar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

RESUMO

CASTRO, R. C. A. **Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* produtora de etanol e sua aplicação no processo de sacarificação e fermentação simultânea da celulignina de palha de arroz.** 2011. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

O presente trabalho teve como principal objetivo selecionar uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* e avaliar a sua aplicação em processos de produção de etanol a partir da celulignina de palha de arroz. Inicialmente, foram avaliadas oito diferentes linhagens de *K. marxianus* em meio semissintético contendo 50 g/L de glicose sob temperatura de 45 °C. De acordo com os principais parâmetros fermentativos obtidos, a linhagem *K. marxianus* NRRL Y-6860 foi selecionada e o efeito da oxigenação do meio sobre os parâmetros fermentativos desta levedura foi realizado de acordo com um planejamento experimental 2². Os resultados revelaram que a produção de etanol foi favorecida nas menores condições de agitação e aeração estudadas (100 rpm e relação $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ de 2,5) sendo obtido um valor de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$) de 0,44 g/g e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) de 3,63 g/L.h. Nestas condições, *K. marxianus* NRRL Y-6860 foi também capaz de fermentar elevada concentração de glicose (112 g/L), apresentando valores de $Y_{P/S} = 0,42$ g/g e $Q_P = 3,24$ g/L.h. Numa segunda etapa, ensaios de sacarificação da celulignina (8% m/v) permitiram definir a carga de Cellubrix (25 FPU/g) e Novozyme 188 (25 UI/g) as quais promoveram um rendimento de hidrólise de aproximadamente 50 % em 12 horas. A celulignina foi obtida após o pré-tratamento da palha de arroz com H₂SO₄ diluído e apresentou a seguinte composição (g/100g de matéria seca): celulose (54,9), hemicelulose (7,9), lignina (24,9) e cinzas (8,0). Para os ensaios de sacarificação e fermentação da celulignina com a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860 duas estratégias foram avaliadas: 1) sacarificação e fermentação em separado (*SHF*), com e sem inativação das enzimas e 2) sacarificação e fermentação simultânea (*SSF*) em que o inóculo e as enzimas foram adicionados no início do processo. Os resultados revelaram que na estratégia *SHF* a inativação das enzimas antes da inoculação não influenciou o desempenho fermentativo da levedura. Além disso, o emprego de um maior teor de celulignina (12 % m/v) proporcionou um ganho de 42 % na produtividade total do processo (Q_{PT}) em relação ao teor de 8 % (m/v), atingindo o valor de 0,97 g/L.h. O emprego da estratégia *SSF* a partir de 8 % (m/v) de celulignina permitiu um incremento de 177 % e 287 % nos valores de Q_{PT} quando comparados ao processo *SHF* com 12 e 8 % de celulignina (m/v), respectivamente. Ensaios de *SSF* com *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que para ambas as temperaturas avaliadas (30 °C ou 45 °C) a termotolerante *K. marxianus* NRRL Y-6860 mostrou-se superior com relação a produtividade total do processo. Com os resultados do presente trabalho pode-se concluir que a levedura termotolerante *K. marxianus* NRRL Y-6860 é um micro-organismo em potencial para produção de etanol celulósico a partir da estratégia *SSF* devido aos elevados valores de produtividade volumétrica ($Q_{PT} = 2,69$ g/L.h) obtidos a partir da celulignina de palha de arroz.

Palavras-chave: Etanol. Celulignina (Palha de arroz). Sacarificação. Fermentação. *Kluyveromyces marxianus*.

ABSTRACT

CASTRO, R. C. A. **Selection of a thermotolerant ethanol producer *Kluyveromyces marxianus* strain and its application in the process of simultaneous saccharification and fermentation of rice straw cellulignin.** 2011. 103 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

This work aimed to select a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* and evaluate its application on ethanol production by using rice straw cellulignin. Initially, were evaluated eight different strains of *K. marxianus* on semi-synthetic media containing 50 g/L of glucose at 45 °C. According to the main fermentation parameters, the strain *K. marxianus* NRRL Y-6860 was selected and the effect of oxygenation on ethanol production by this yeast was investigated through a 2² factorial design. The best results of ethanol yield factor ($Y_{P/S} = 0.44$ g/g) and ethanol volumetric productivity ($Q_P = 3.63$ g/L.h) were found at the lowest agitation and aeration conditions (100 rpm and 2.5 $V_{\text{flask}}/V_{\text{medium}}$ ratio) employed. Under this conditions, *K. marxianus* NRRL Y-6860 was also able to ferment at high glucose concentration (112 g/L), with values of $Y_{P/S} = 0.42$ g/g and $Q_P = 3.24$ g/L.h. In a second step, the effect of Cellubrix loading and its supplementation with Novozyme 188 on the cellulignin saccharification were evaluated. The results showed that the highest hydrolysis yield (50 %) was attained when a load of Cellubrix (25 FPU/g dry matter) and Novozyme 188 (25 IU/g dry matter) was used. The cellulignin obtained from dilute sulfuric acid pretreatment of rice straw showed the following composition (g/100g dry matter): cellulose (54.9), hemicellulose (7.9), lignin (24.9) and ash (8.0). For the studies of cellulignin saccharification and fermentation with *K. marxianus* NRRL Y-6860 two strategies were evaluated: 1) Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF), with and without inactivation of enzymes, which inoculum was added after the hydrolysis step and 2) Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF), which inoculum and enzymes were added at the beginning of the process. The results revealed that the enzyme inactivation step prior to inoculation in SHF did not influence the yeast's fermentation performance. In addition, the use of a higher loading of cellulignin (12 % w/v) increased the overall ethanol productivity (Q_{PT}) in 42 %, reaching a value of 0.97 g/L.h as compared to the loading of 8 % (w/v). The SSF process from 8 % (w/v) of cellulignin increased the values of Q_{PT} in 177 % and 287 % when compared to SHF loading of 12 and 8 % (w/v), respectively. By using *Saccharomyces cerevisiae* in SSF process under different temperatures (30 °C or 45 °C) the overall ethanol productivity was lower in relation with the thermotolerant *K. marxianus* NRRL Y-6860. Based on the experimental results of this work, it can be concluded that *K. marxianus* NRRL Y-6860 herein selected represents a potential microorganism to application on ethanol production from lignocellulosic materials in SSF process due to its high fermentative potential at elevated temperatures.

Keywords: Ethanol. Cellulignin (Rice straw). Saccharification. Fermentation. *Kluyveromyces marxianus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Contexto energético e importância do etanol	13
2.2. Matérias-primas lignocelulósicas para obtenção de etanol.....	15
2.2.1. A palha de arroz	17
2.3. Pré-tratamento do material lignocelulósico	18
2.4. Hidrólise enzimática da celulose e fermentação dos açúcares	22
2.4.1. Estratégias para hidrólise e fermentação da celulose	27
2.5. A levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	30
3. OBJETIVOS.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Seleção da linhagem termotolerante de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	34
4.1.1. Micro-organismo e preparo do inóculo.....	34
4.1.2. Meio e condições de fermentação	36
4.2. Efeito da aeração e agitação na produção de etanol	36
4.2.1. Micro-organismo e preparo do inóculo.....	36
4.2.2. Meio e condições de fermentação	37
4.3. Obtenção da celulignina de palha de arroz	38
4.3.1. Matéria-Prima	38
4.3.2. Pré-tratamento com ácido diluído e obtenção da celulignina	38
4.4. Caracterização do material lignocelulósico	40
4.5. Determinação das condições de hidrólise enzimática da celulignina	42
4.5.1. Enzimas	42
4.5.2. Determinação da atividade enzimática.....	43
4.5.3. Hidrólise enzimática	44
4.6. Sacarificação e fermentação da celulignina.....	45
4.6.1. Micro-organismos e preparo do inóculo	46
4.6.2. Meio e condições de fermentação	47
4.7. Métodos analíticos	48
4.7.1. Determinação do teor de umidade do material lignocelulósico	48
4.7.2. Determinação da concentração celular de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	48
4.7.3. Determinação dos teores dos açúcares, ácido acético e etanol	49
4.7.4. Determinação dos teores de furfural e hidroximetilfurfural	49
4.7.5. Determinação dos compostos fenólicos	50
4.7.6. Determinação de pH.....	50
4.8. Determinação dos parâmetros fermentativos e do rendimento de hidrólise enzimática	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1. Seleção da levedura termotolerante para a fermentação da celulignina	53
5.2. Efeito da agitação e aeração sobre a produção de etanol.....	58

5.2.1. Potencial fermentativo de <i>K. marxianus</i> NRRL Y-6860 com elevada concentração de glicose	65
5.3. Obtenção e caracterização da celulignina da palha de arroz.....	67
5.4. Determinação das condições de hidrólise enzimática da celulignina	71
5.5. Ensaio de sacarificação e fermentação da celulignina por <i>K. marxianus</i> NRRL Y-6860.....	76
5.5.1. Hidrólise e fermentação em separado (<i>SHF</i>)	76
5.5.2. Sacarificação e fermentação simultânea (<i>SSF</i>)	80
5.5.3. Comparação entre as estratégias de sacarificação e fermentação	81
5.5.4. Avaliação da influência da temperatura no processo de <i>SSF</i> da celulignina de palha de arroz por <i>K. marxianus</i> NRRL Y-6860 e <i>S. cerevisiae</i>	85
6. CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios da sociedade no século 21 é conciliar a crescente demanda de energia para as necessidades industriais e de transportes com a sustentabilidade. O uso indiscriminado de combustíveis fósseis tem sido apontado como um dos principais motivos para as mudanças climáticas, que causam um impacto significativo nos ecossistemas. Neste contexto, é necessária a busca de alternativas para suprir a demanda energética de forma sustentável.

O etanol, que pode ser obtido a partir de diferentes matérias-primas, tem sido apontado como combustível alternativo aos derivados de petróleo. Dentre as matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção de etanol, destacam-se os materiais lignocelulósicos, especialmente os resíduos agroindustriais, que possuem baixo custo, são renováveis e não competem com a produção de alimentos. A palha de arroz é um dos mais abundantes resíduos da atividade agrícola no mundo e, portanto, constitui um material em potencial para a produção de etanol combustível de segunda geração.

Para a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol, primeiramente deve-se obter os açúcares fermentescíveis derivados da celulose (glicose) e da hemicelulose (xilose, arabinose, glicose, manose e galactose) os quais, em uma segunda etapa, serão convertidos em etanol pela ação de micro-organismos. A hidrólise enzimática para a obtenção dos açúcares fermentescíveis é altamente específica, podendo ser realizada sob condições brandas e com baixa formação de subprodutos tóxicos, que é favorável à fermentação. Entretanto, alguns fatores podem diminuir o rendimento da hidrólise enzimática, tais como as características do substrato, a fonte e a concentração da enzima, as condições da reação, e a inibição causada pelo produto (inibição por *feedback* ou retroalimentação).

O processo de sacarificação e fermentação simultânea (*SSF*) que combina, em uma mesma etapa, a hidrólise enzimática da celulose e a fermentação da glicose, permite diminuir a inibição sofrida pelo complexo enzimático, uma vez que a glicose é continuamente removida do meio pelo micro-organismo. Portanto, no processo de *SSF* é recomendável o emprego de leveduras termotolerantes, com alta capacidade fermentativa na mesma faixa de temperatura ótima das enzimas (45-50 °C) para aumentar o rendimento e a produtividade total do processo.

O aproveitamento da biomassa vegetal para a obtenção de produtos de interesse industrial constitui uma das principais linhas de pesquisa conduzidas pelo Grupo de Microbiologia Aplicada do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia Lorena (EEL/USP). Visando contribuir para o desenvolvimento das pesquisas e dando continuidade ao estudo da obtenção de etanol de segunda geração, o presente trabalho propõe-se a um estudo da produção de etanol por bioconversão de glicose a partir da celulignina de palha de arroz, obtida após o pré-tratamento com ácido diluído, empregando uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contexto energético e importância do etanol

A crescente industrialização do mundo, em especial o desenvolvimento da indústria automobilística, levou a um aumento acentuado da procura por combustíveis derivados do petróleo. O setor de transportes, responsável por 58% do consumo mundial deste óleo, contribui com as emissões de 70% de monóxido de carbono e 19% de dióxido de carbono (NIGAM; SINGH, 2011). Segundo Balat (2011), foram estimados 806 milhões de automóveis no mundo em 2007, e este valor poderá ultrapassar 2 bilhões de veículos em 2050. Este aumento significativo poderá causar um impacto negativo no equilíbrio dos ecossistemas, bem como no clima e nas reservas de petróleo.

O esgotamento progressivo dos combustíveis fósseis e as emissões de gases de efeito estufa provenientes da queima destes combustíveis motivaram a busca por fontes de energia de caráter renovável, sustentável, de baixo custo e com menores emissões desses gases (NIGAM; SINGH, 2011). Neste contexto, o etanol tem sido apontado como combustível alternativo e, portanto, existe um grande interesse nas pesquisas visando sua obtenção a partir de diferentes matérias-primas renováveis (PRASAD; SINGH; JOSHI, 2007). O etanol combustível contém 35% de oxigênio, o que reduz a emissão de partículas e óxidos de nitrogênio (NOx) durante a sua combustão, quando comparado à gasolina (DEMIRBAS, 2005). O etanol pode ser usado diretamente como combustível (95% etanol e 5% água), e, nessas proporções, traz benefícios ambientais, devido à sua baixa pressão e reduzida emissão para a atmosfera durante a combustão (LYND et al., 1991).

O Brasil é um dos maiores produtores de álcool de biomassa vegetal a baixo custo do mundo, atividade responsável por mais de um milhão de postos diretos de trabalho (PESSOA-JR et al., 2005). De acordo com os autores, no início da década de 70, o Programa Nacional do Alcool (PROALCOOL) estimulou a criação da indústria do etanol que proporcionou grandes melhorias econômicas, sociais e científicas para o Brasil. O investimento acumulado no PROALCOOL totalizou 11 bilhões de dólares, e o Brasil economizou 27 bilhões de dólares em importação de petróleo. A indústria de produção do etanol de cana-de-açúcar gerou 152 vezes mais empregos do que teria sido se a mesma quantidade de combustível fosse produzida a partir de petróleo.

Segundo Amorim et al. (2011), para superar os baixos preços no mercado e seus custos de produção, as indústrias de açúcar e álcool no Brasil melhoraram seus processos de fermentação, baseados em diferentes estratégias incluindo: 1) a seleção e desenvolvimento de linhagens industriais mais adaptadas; 2) processos eficientes de reciclo de inóculo e 3) controle de contaminação. Além disso, investimentos em logística e no desenvolvimento de novas técnicas de plantio e colheita contribuíram para alavancar o setor nos últimos 20 anos. A incorporação dessas tecnologias teve um papel fundamental no aumento da eficiência industrial, bem como na redução do impacto ambiental dessas usinas. Em 2008, o consumo de etanol como combustível ultrapassou o consumo de gasolina no Brasil (CHADDAD, 2010).

A gasolina comercializada no Brasil contém 25% de etanol anidro (E25). A percentagem de etanol na gasolina é controlada pelo governo brasileiro de acordo com o preço e a demanda de mercado (AMORIM et al., 2011). Segundo Balat (2011) a mistura etanol-gasolina é também utilizada em diversos países, porém, em uma menor proporção. Este autor cita os exemplos dos Estados Unidos e Canadá que utilizam uma mistura de 10% de etanol na gasolina (E10) e para veículos *flex fuel* (E85), e em outros países as misturas são E5 na Índia, E10 na Austrália, China, Peru e Colômbia e E7 no Paraguai.

De acordo com o Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior - MDIC (2011), o advento dos veículos *flex fuel* (que podem utilizar álcool ou gasolina em qualquer proporção) gerou um aumento significativo no consumo de álcool hidratado no Brasil: 4,3 bilhões de litros em 2003 para 15 bilhões de litros em 2010. Ainda segundo o MDIC, desde o lançamento já foram comercializados 14,6 milhões de veículos *flex fuel*. Em 2011 (até setembro) a participação destes automóveis no mercado brasileiro de veículos leves foi estimada em 83,4 %.

De acordo com a *Renewable Fuel Association* (RFA), os Estados Unidos continuam sendo o maior produtor de etanol do mundo, com uma produção estimada em 51 bilhões de litros em 2011 (RFA, 2011). Segundo os dados apresentados pelo MDIC (2011), na safra 2010/2011 foram produzidos no Brasil 27,6 bilhões de litros de álcool (8 bilhões de litros de anidro e 19,6 de hidratado), que correspondeu a um aumento de 7% em relação a safra 2009/2010 na qual foram produzidos 25,8 bilhões de litros de etanol.

De acordo com a previsão da *Global Renewable Fuels Alliance* (GRFA) a produção mundial de etanol no ano de 2011 deve alcançar 88,7 bilhões de litros, substituindo o equivalente a um milhão de barris de petróleo por dia no mundo. Esta projeção mostra o

impacto crescente que a produção de etanol possui na redução da dependência mundial do petróleo (RFA, 2011).

2.2. Matérias-primas lignocelulósicas para obtenção de etanol

O etanol pode ser obtido de diferentes tipos de matéria-prima, que são classificadas em três categorias: açucaradas (cana-de-açúcar, beterraba, e frutas), amiláceas (milho, arroz, batata e cevada) e lignocelulósicas, tais como madeira e resíduos da produção agrícola (BALAT, 2011). Dentre as três categorias citadas, os materiais lignocelulósicos, especialmente os resíduos agroindustriais (bagaço de cana, palha de arroz e bagaço de malte), contribuem para um desenvolvimento sustentável, pois, além de representarem uma fonte de biomassa abundante, possuem baixo custo, são renováveis e não competem com a produção de alimentos (LIN; TANAKA, 2006; DEMAINE, 2009).

Os materiais lignocelulósicos são compostos por uma mistura de polímeros de carboidratos, denominados celulose e hemicelulose, e uma estrutura contendo substâncias aromáticas denominada lignina (RUBIN, 2008), conforme estrutura mostrada na Figura 2.1.

A celulose é um homopolímero linear formado por unidades de D-glicose unidas por ligação β (1-4), e se encontra na forma de fibras compostas por um grande número de microfibrilas, ordenadas paralelamente e ligadas entre si por ligações de hidrogênio. As microfibrilas de celulose possuem um tamanho indeterminado e variam consideravelmente na largura e no grau de ordenação dependendo da fonte (TAIZ; ZEIGER, 2006). A hidrólise ácida ou enzimática da celulose resulta em glicose. Entretanto, um dos principais obstáculos para sua hidrólise é a sua estrutura altamente cristalina (PARISI, 1989).

A hemicelulose é uma classe heterogênea de polímeros que, em geral, representa de 15 a 35% da biomassa vegetal. Esta fração é formada por pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e ácidos urônicos (α -D-glucurônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e α -D-galacturônico). Outros açúcares como a α -L-ramnose e α -L-fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades e os grupos hidroxila dos açúcares podem ser parcialmente substituídos por grupos acetil (GÍRIO et al., 2010). A composição da hemicelulose varia de acordo com o tipo de material lignocelulósico. Enquanto as coníferas contêm principalmente glucomananos, as

folhosas são compostas em sua maioria por xilanas, que podem ainda ser categorizadas em homoxilana linear, arabinoxilana, glucuronoxilana e glucuronoarabinoxilana (SAHA, 2003).

Figura 2.1: Estrutura do material lignocelulósico em que são apresentados os seus principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina (Fonte: modificado de Rubin, 2008).

A lignina é um polímero aromático sintetizado a partir de precursores de fenilpropanóides, na qual os monômeros estão ligados por diversos tipos de ligações, formando uma estrutura polifenólica complexa que não pode ser convertida em açúcar fermentescível (GOLDSTEIN, 1981). A lignina, que constitui de 15 a 25% da matéria seca da biomassa vegetal, é responsável pela rigidez estrutural dos materiais lignocelulósicos e confere a resistência à degradação química e biológica que estes materiais possuem (BALAT, 2011). A lignina apresenta muitas aplicações, não só como combustível para energia térmica, mas também como matéria-prima para a indústria química e farmacêutica, principalmente na produção de polímeros, resinas, colas e cosméticos (STEWART, 2008).

2.2.1. A palha de arroz

Um dos mais abundantes resíduos lignocelulósicos da atividade agrícola no mundo é a palha de arroz. Cada quilograma de cereal colhido é acompanhado da produção de 1,0 a 1,5 Kg de palha (BINOD et al., 2010). Segundo dados de Kim e Dale (2004), a produção anual de palha de arroz é de cerca de 731 milhões de toneladas (Mton). A América do Sul tem uma produção anual de 23,51 Mton, constituindo a segunda região do mundo em disponibilidade de palha de arroz. As demais são, em milhões de toneladas, 20,93 na África, 668 na Ásia, 3,9 na Europa, 10,9 na América do Norte e 2,8 na América Central.

A palha de arroz é um material lignocelulósico fibroso, o qual difere da maioria dos resíduos devido ao seu alto conteúdo de dióxido de sílica (SiO_2), que confere um alto grau de resistência contra microrganismos patogênicos, dificultando seu processo de degradação. Seu conteúdo de cinzas em peso seco pode variar de 13 a 20% em função do estado de conservação da palha após a colheita (MUSSATO; ROBERTO, 2005). As cinzas geralmente contêm cerca de 75 % de SiO_2 , 10% de K_2O , 3% de P_2O_5 , 3 % de Fe_2O_3 , 1,3% de CaO e pequenas quantidades de Mg, S e Na (KADAM et al., 2000). De acordo com Roberto, Mussatto e Rodrigues (2003) a palha de arroz é composta por celulose (43 %), hemicelulose (23 %), lignina (17%) e cinzas (11 %). Segundo Binod et al. (2010) a qualidade da palha pode variar substancialmente de acordo com a região e a estação do ano em que ocorreu a colheita.

A queima da palha de arroz que permanece no campo após a colheita do cereal ainda é praticada em muitos países, apesar da crescente preocupação ambiental com o uso desta prática, pois aumentam a poluição e, conseqüentemente, afetam a saúde pública (ABDEL-MOHDY et al., 2009). De forma alternativa, a palha de arroz também pode ser utilizada na alimentação de animais, conforme reportado por Drake, Nader e Forero (2002). Segundo estes autores, a palha de arroz deve ser utilizada apenas como aditivo em rações para alimentação de bovinos, não devendo ser empregada como ração completa, devido ao limitado valor nutritivo em relação ao teor protéico e à baixa digestibilidade.

Uma vez que as mudanças climáticas são amplamente reconhecidas como uma ameaça ao planeta, há um crescente interesse no uso de resíduos agro-industriais para aplicações energéticas (DEMAIN, 2009). Neste contexto, devido ao elevado conteúdo de celulose e hemicelulose, que podem ser hidrolisados em açúcares fermentescíveis, a palha de arroz constitui um resíduo em potencial para a produção de etanol, colaborando com as

necessidades energéticas futuras (BINOD et al., 2010). De acordo com Kim e Dale (2004), estima-se que o potencial de produção de etanol a partir da produção anual de palha de arroz (731 Mton) seja de 205 bilhões de litros por ano. Entretanto, segundo Domínguez-Escribà e Porcar (2010), a realidade da produção de etanol a partir da palha de arroz ainda é restrita a projetos de pesquisa em escala piloto, devido às dificuldades técnicas em converter a palha de arroz em açúcares fermentescíveis, principalmente pelo alto teor de lignina e cinzas que influenciam negativamente a eficiência de hidrólise e, consequentemente, da fermentação.

De acordo com Chandra et al. (2007), a palha de arroz *in natura* é difícil de ser hidrolisada somente por enzimas celulolíticas devido à recalcitrância e sua estrutura heterogênea. Geralmente, o rendimento de conversão de celulose em glicose durante a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos *in natura* não ultrapassa 20% em relação ao rendimento teórico, mesmo quando altas cargas de enzima e longos períodos de reação são empregados (KIM; LEE, 2007). Avanços no pré-tratamento da palha de arroz, na produção de enzimas hidrolíticas e no processo de fermentação podem levar a melhorias significativas no processo de produção de etanol, particularmente em relação ao rendimento e custos (DOMÍNGUEZ-ESCRIBÀ; PORCAR, 2010). Portanto, uma etapa de pré-tratamento que altere a estrutura da palha de arroz para fornecer um maior acesso à celulose é essencial no processo de conversão enzimática (KO et al., 2009)

2.3. Pré-tratamento do material lignocelulósico

A biomassa lignocelulósica é composta por um complexo heterogêneo de polímeros de carboidratos (hemicelulose e celulose) que são densamente empacotadas por camadas de lignina, que as protege contra a degradação. Assim, é necessário uma etapa de pré-tratamento para romper a ligação da lignina e expor a celulose e a hemicelulose à ação química ou enzimática para a obtenção de açúcares fermentescíveis (BINOD et al., 2010).

De acordo com Sun e Cheng (2002), o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos incluem métodos físicos, químicos e/ou biológicos, assim como suas combinações, e devem atender às seguintes exigências: (1) melhorar a formação de açúcares durante a hidrólise enzimática; (2) evitar a degradação ou perda de carboidratos; (3) evitar a

formação de inibidores para os processos subsequentes de hidrólise e fermentação; e (4) ser viável economicamente.

Mosier et al. (2005) estudaram o modo de ação e os parâmetros de vários métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica com ênfase na composição química e estrutura físico-química, conforme apresentado na Tabela 2.1. Ressalta-se que alguns efeitos não contemplados por estes autores foram complementados por Alvira et al. (2010) e Sánchez (2009).

A explosão a vapor é um pré-tratamento hidrotérmico no qual a biomassa é sujeita a um vapor pressurizado por certo período de tempo, e então subitamente despressurizada. Este método combina forças mecânicas e efeitos químicos, devido à hidrólise (auto-hidrólise) dos grupos acetila presentes na hemicelulose. Os efeitos mecânicos são devidos à súbita redução da pressão (descompressão explosiva) que provocam a separação das fibras (ALVIRA et al., 2010).

A água quente é outro tratamento hidrotérmico que não emprega catalisador, e não requer rápida descompressão. A pressão é aplicada para manter a água em estado líquido a elevadas temperaturas (160 a 240 °C) e provocar alterações na estrutura do material (ALVIRA et al., 2010). O objetivo deste tratamento é solubilizar principalmente a hemicelulose, para tornar a celulose mais acessível e evitar a formação de compostos inibidores, os quais podem ser evitados mantendo o pH entre 4 e 7 durante o pré-tratamento. De acordo com Mosier et al. (2005), nesta faixa de pH os açúcares da hemicelulose são mantidos em sua forma oligomérica, minimizando ou evitando, assim, a formação de produtos de degradação (hidroximetilfurfural e furfural)

Uma variação destes processos hidrotérmicos consiste em criar um fluxo contínuo de água quente através do material, que pode ser realizado em diferentes configurações, no mesmo sentido da corrente, contra corrente e passagem através da biomassa acomodada no reator (MOSIER et al., 2005). Em alguns materiais os sistemas de passagem de água têm sido reportados por remover maior quantidade de hemicelulose e lignina em comparação a sistemas de batelada (ALVIRA et al., 2010).

O pré-tratamento biológico de materiais lignocelulósicos emprega micro-organismos, em especial fungos de decomposição branda (*soft-rot fungi*), parda (*brown-rot fungi*) e branca (*white-rot fungi*), que degradam principalmente a lignina e a hemicelulose (SÁNCHEZ, 2009). A degradação da lignina por fungos de decomposição branca, como *Ceriporiopsis subvermispora*, ocorre pela ação de enzimas como peroxidases e lacases (KUMAR et al., 2009a). Em geral, este processo oferece vantagens como baixo custo,

ausência de reagentes químicos e condições ambientais brandas. Entretanto, a principal desvantagem da aplicação de pré-tratamentos biológicos é a baixa taxa de hidrólise em relação a outras tecnologias (SUN; CHENG, 2002).

Tabela 2.1 - Efeito de vários métodos de pré-tratamento na composição química e estrutura físico-química da biomassa lignocelulósica (adaptado de Moiser et al., 2005; Alvira et al., 2010; Sánchez, 2009).

Pré-tratamento	Efeitos				
	Aumento da área superficial	Alteração da cristalinidade da celulose	Remoção da hemicelulose	Remoção da lignina	Alteração da estrutura da lignina
Explosão a vapor não catalisada	■	nd	■	□	□
Água quente	■	nd	■	□	□
Água quente com pH controlado	■	nd	■	□	nd
Fluxo de água quente	■	nd	■	□	□
Ácido diluído	■	nd	■	□	■
Fluxo de ácido	■	nd	■	□	■
AFEX	■	■	□	■	■
ARP	■	■	□	■	■
Tratamento alcalino	■	nd	□	■	■
Biológico (fungos)	nd	nd	□	■	■

■: efeito importante; □:efeito minoritário; nd: não determinado

No processo conhecido como AFEX (*Ammonia Fiber Explosion* ou explosão da fibra com amônia), a biomassa é tratada com amônia anidra líquida entre 60 e 100 °C, e pressurizada por 5 a 30 minutos (WYMAN et al., 2005; SUN; CHENG, 2002). A pressão é então liberada, resultando em uma rápida expansão do gás de amônia que provoca perturbações nas fibras do material, diminuindo a cristalinidade da celulose. O AFEX

produz apenas um material sólido pré-tratado, ao contrário de outros pré-tratamentos tais como explosão a vapor e hidrólise com ácido diluído, que produzem um licor rico em pentoses que pode ser separado da fração sólida (ALVIRA et al., 2010).

Outro processo que utiliza amônia é o ARP (*Ammonia Recycle Percolation* ou percolação com reciclo de amônia) que consiste na passagem contínua de uma solução de amônia (de 5 a 15% p/p) através da biomassa acomodada em um reator. A amônia pode ser separada e reciclada no efluente para dar continuidade e diminuir os custos do processo (MOSIER et al., 2005). A temperatura normalmente é fixada entre 140 e 210 °C, com um tempo de reação de até 90 minutos em que a solução extratora passa com uma velocidade de 5 mL/min através do material (SUN; CHENG, 2002). Nestas condições, a amônia reage primariamente com a lignina, clivando as ligações entre a lignina e os carboidratos (MOSIER et al., 2005). A amônia em solução aquosa e a altas temperaturas quebra as ligações da lignina pela reação de amonólise, e não tem efeito sobre os carboidratos. Portanto, em contato com materiais lignocelulósicos, a amônia exibe alta seletividade para reações de deslignificação e, como consequência, aumentam a acessibilidade da celulose para a posterior hidrólise enzimática (YANG; WYMAN, 2008). A imersão do material em solução aquosa contendo amônia foi investigada por Ko et al. (2009), que obtiveram posterior hidrólise enzimática com 71% de digestibilidade a partir da palha de arroz pré-tratada com 21% (p/p) de amônia a 69 °C por 10 horas.

A aplicação de soluções alcalinas preparadas com NaOH ou KOH tem sido também empregadas para aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose por remover a lignina e parte da hemicelulose. Este pré-tratamento pode ser realizado a temperaturas baixas, no entanto, requer um tempo relativamente longo, em termos de horas ou dias, e com alta concentração de base (MOSIER et al., 2005; GASPAR et al., 2007). O principal efeito do tratamento prévio com NaOH é a quebra das ligações éster entre a lignina e a xilana, aumentando a porosidade da biomassa (TARKOV; FEIST, 1969).

A hidrólise com ácido diluído pode ser classificada como pré-tratamento, quando o interesse é a posterior hidrólise da celulose, ou como fracionamento, nos casos em que o licor rico em pentoses (hidrolisado hemicelulósico) é o substrato para a fermentação (KIM; YUM; PARK, 2000). O ácido empregado mais comumente é o H₂SO₄, embora tenham sido testados HCl, HNO₃, CF₃CO₂H, H₃PO₄ e ácidos orgânicos fracos, como mostra a revisão de Gírio et al., 2010. Resultados obtidos por diversos autores (NGYUEN et al., 1999; KIM; YUM; PARK, 2000; NEUREITER et al., 2002; ROBERTO; MUSSATO; RODRIGUES, 2003) demonstraram que a hidrólise ácida da hemicelulose depende do tipo

de matéria-prima e das condições operacionais impostas, tais como tempo de reação, temperatura e concentração do ácido.

O pré-tratamento ácido, empregando ácido diluído, é um dos processos mais utilizados para a separação da hemicelulose do material lignocelulósico. Neste pré-tratamento, o ácido solubiliza predominantemente a porção hemicelulósica, com um pequeno impacto na degradação da lignina, e torna a celulose mais susceptível a ação enzimática (BINOD et al., 2010).

De um modo geral, a hidrólise com ácido diluído proporciona uma recuperação de 70 a 95% de açúcares a partir da hemicelulose. A concentração de H_2SO_4 tipicamente utilizada para a hidrólise seletiva da hemicelulose é de 0,5 a 1,5% (p/v), com temperatura de reação entre 121 e 160 °C (ALLEN et al., 2001; ROBERTO; MUSSATO; RODRIGUES, 2003; CARVALHEIRO et al., 2004; MARZIALETTI et al., 2008). Estima-se que a utilização eficiente dos componentes da hemicelulose reduz o custo da produção de etanol combustível em até 25% (NIGAM, 2001).

Hsu et al. (2010) avaliaram o efeito de diferentes severidades de pré-tratamento com ácido diluído em palha de arroz, variando a concentração de ácido, a temperatura e o tempo de reação. Os autores reportaram um rendimento de conversão enzimática do sólido pré-tratado entre 60 e 85% após o tratamento com 0,1% (p/v) de H_2SO_4 , com tempo de reação entre 1 e 5 minutos, sob temperatura de 160 e 180 °C.

Um pré-tratamento eficiente é requerido para que a posterior hidrólise enzimática possa obter maior produtividade em conversão dos açúcares fermentescíveis, de forma que a perda desses açúcares seja minimizada (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

2.4. Hidrólise enzimática da celulose e fermentação dos açúcares

Para que os açúcares presentes no material lignocelulósicos sejam fermentados, é necessária a etapa de hidrólise dos polímeros de carboidratos, que pode ser realizada por enzimas celulolíticas (BALAT, 2011).

As celulasas são um grupo de enzimas que hidrolisam a celulose sinergisticamente (i.e. de forma cooperativa) (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988). Um esquema da ação das celulasas está apresentado na Figura 2.2. O mecanismo amplamente aceito para a hidrólise enzimática da celulose envolve ações sinérgicas entre, pelo menos, três grupos

maiores de celulases: (1) endoglucanases (EG, *endo-1,4-D-glucanohydrolase* ou EC 3.2.1.4.), que, randomicamente, atacam regiões de baixa cristalinidade da fibra de celulose, criando extremidades de cadeia livres; (2) exoglucanase ou celobiohidrolase (CBH, *1,4-β-D-glucan cellobiodehydrolase* ou EC 3.2.1.91.), que remove unidades de celobiose a partir das extremidades livres; (3) β-Glicosidase (EC 3.2.1.21.), que hidrolisa a celobiose para produzir glicose. Devido à quantidade insuficiente de β-Glicosidase produzida pelo fungo *Trichoderma reesei* (principal micro-organismo produtor de celulases comerciais), é necessário adicioná-la para prevenir a inibição das outras enzimas pela acumulação da celobiose (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988).

Figura 2.2: Mecanismo de ação das celulases: As endoglucanases hidrolisam ligações glicosídicas intramoleculares (β -1,4) de forma randômica, produzindo novas terminações de cadeia; as exoglucanases clivam as cadeias de celulose nas extremidades, redutora (R) ou não-redutora (NR), para liberar celobiose ou glicose; e a β -glicosidase hidrolisa celobiose a glicose a fim de eliminar a inibição que a celobiose exerce sobre as demais enzimas. (Modificado de Zhang, Himmel e Mielenz, 2006).

As enzimas celulolíticas podem ser produzidas tanto por fungos quanto bactérias. Os gêneros de bactérias descritos por produzirem celulasas são: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, e *Streptomyces* (SUN; CHENG, 2002). Entretanto, apesar de produzirem celulasas com alta atividade específica, as bactérias anaeróbias possuem uma taxa de crescimento muito baixa e requerem condições especiais de crescimento. Desta forma, a maioria das pesquisas para produção comercial de celulasas tem sido focada nos fungos, sendo os principais *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium* e espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* e *Penicillium* (DUFF; MURRAY, 1996).

A hidrólise enzimática é conduzida usualmente em condições brandas de pH (4,8) e temperatura (45 a 50 °C), com a vantagem de não promover corrosão do reator, quando comparada ao processo de hidrólise ácida (DUFF; MURRAY, 1996). Esta tecnologia é um fator chave para alcançar o custo-benefício necessário para a produção de etanol em longo prazo. Embora o processo de hidrólise ácida apresente maior maturidade técnica, o enzimático apresenta um custo projetado comparável e com potencial de ser reduzido com a melhoria da tecnologia (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAALJ, 2005).

De acordo com Moreira (2005), as empresas de biotecnologia Genencor e Novozymes têm investido no desenvolvimento de tecnologias, baseadas no melhoramento de linhagens produtoras de celulasas, visando reduzir o custo dessas enzimas em processos de obtenção de etanol celulósico. De acordo com o autor o custo foi reduzido de US\$ 5,40 para US\$ 0,20 por galão de etanol. Além do melhoramento de linhagens, o autor também reporta que, para alcançar uma redução significativa de custos, esforços têm sido direcionados não apenas na obtenção de novas linhagens com elevada capacidade de produção, mas também no aprimoramento do processo, como, por exemplo, a busca e desenvolvimento de meios de indução de menor custo.

Uma baixa concentração de enzimas gera baixos rendimentos e taxas de reação, enquanto uma dosagem elevada de enzimas pode aumentar os custos desproporcionalmente (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAALJ, 2005). Uma dosagem de 10 FPU/g (unidade de papel de filtro por grama de biomassa) de celulase é frequentemente utilizada em estudos de laboratório, por fornecer um perfil de hidrólise com altos níveis de rendimento em glicose (acima de 70 %) em um tempo de 48 a 72 h, sem gasto excessivo de enzimas (GREGG; SADDLER, 1996).

De acordo com Arantes e Saddler (2011), a hidrólise enzimática da celulose é um fenômeno de superfície em que deve ocorrer um contato físico direto entre as enzimas e o

substrato. Uma das maiores barreiras enfrentadas pelas enzimas durante a hidrólise da celulose é o seu limitado acesso a grande parte do substrato, que está contido em uma arquitetura fibrilar altamente ordenada. Segundo Rollin et al. (2011), o aumento da acessibilidade da celulose é mais importante do que a deslignificação do material. Estes autores demonstraram que altos níveis de deslignificação da gramínea *Panicum virgatum* (após o pré-tratamento com amônia), não resultaram em maior digestibilidade da celulose, uma vez que não ocorreu aumento da acessibilidade. Já o pré-tratamento do mesmo material com solventes orgânicos e inorgânicos (os quais promovem o rompimento das ligações de hidrogênio que mantêm as fibras de celulose ordenadas, sem remoção da lignina), tornou a celulose mais acessível, e resultou em maior digestibilidade mesmo com menores cargas de enzimas.

Segundo Arantes e Saddler (2011), um processo típico de conversão da celulose em batelada, é caracterizado por uma curva de três fases (Figura 2.3).

Figura 2.3: Fases do processo de hidrólise enzimática da celulose (Traduzido de Arantes e Saddler, 2011).

O processo de conversão é iniciado com a adsorção das enzimas sobre a celulose de fácil acesso, caracterizada por uma fase com alta taxa de hidrólise. Entretanto, a reação atinge rapidamente uma fase intermediária, caracterizada por uma taxa moderada de hidrólise em que cerca de 50 a 70% do substrato original foi convertido. Posteriormente, uma fase com velocidade de conversão muito lenta é atingida, caracterizada pela baixa

conversão do substrato restante, chamado então de inacessível ou recalcitrante (ARANTES; SADDLER, 2011).

De acordo com Detroy e Julian (1982), diversos fatores afetam a hidrólise enzimática da celulose, tais como as características do substrato, a fonte e a concentração da enzima, as condições da reação, e a inibição causada pelo produto das reações (inibição por *feedback* ou retroalimentação). A taxa de hidrólise enzimática é dependente de várias características estruturais da celulose, as quais incluem: a estrutura molecular, a cristalinidade, a área superficial e o grau de entumescimento e polimerização da fibra de celulose, além da associação à lignina ou outros materiais. Outros autores discutem também a influência negativa que a presença de hemicelulose e lignina causam sobre a hidrólise enzimática da celulose. Mussatto et al. (2008) concluíram que a remoção de hemicelulose e lignina do bagaço de malte resultou em uma melhor performance de hidrólise enzimática, sendo mostrado que uma remoção parcial destes constituintes é suficiente para alcançar alta conversão enzimática (acima de 70 %) a partir da celulose. Kumar e Wyman (2009) mostraram que a lignina que permanece presente no material pré-tratado com ácido possui um efeito inibitório menor em relação à lignina resultante de um pré-tratamento básico. De acordo com estes autores, as condições alcalinas que removem parte da lignina causam também modificações químicas na lignina restante, tornando-a mais propensa a adsorver as proteínas, resultando em ligações improdutivas que diminuem o rendimento de hidrólise.

Segundo Kristensen, Felby e Jørgensen (2009), para alcançar uma alta concentração de açúcares a partir da hidrólise de materiais lignocelulósicos e, conseqüentemente, obter maior concentração do produto, é necessária a utilização de altos teores de sólidos. Entretanto, a utilização de uma elevada carga de sólidos, maior que 10 % (m/v), aumentam a viscosidade do meio dificultando a mistura e, conseqüentemente, limitam a transferência de massa. Além disso, elevados teores de sólidos causam efeitos sobre a atividade das enzimas, como a inibição pelo produto gerado. De acordo com Yun et al. (2001), a inibição da glicose (produto final de hidrólise) sobre a atividade de β -glicosidases típicas apresenta K_i entre 1 e 14 mM, o que corresponde a 0,18 e 2,52 g/L, respectivamente.

De acordo com Jørgensen, Kristensen e Felby (2007), outros fatores também são conhecidos por inibir a atividade das celulasas, como, por exemplo, os produtos derivados da lignina (vanilina, siringaldeído, além dos ácidos ferúlico, *p*-cumárico e siríngico) e da degradação açúcares (hidroximetilfurfural, furfural e ácido fórmico), que podem ser formados durante a etapa de pré-tratamento. Os efeitos destes compostos sobre a atividade

de celulasas e hemicelulasas foram estudados por Panagiotou e Olsson (2007). Os autores concluíram que as celulasas foram significativamente inibidas apenas pelo ácido fórmico, enquanto as hemicelulasas foram inibidas não só por este ácido, mas também pelos ácidos vanílico e sirínico, além do siringaldeído. Segundo Tengborg, Galbe e Zacchi (2001) este efeito inibitório pode ser contornado com a lavagem do material pré-tratado para a remoção destes compostos. Os autores, trabalhando com uma madeira do grupo das coníferas (*Picea abies*), pré-tratada com vapor catalizado por SO₂, reportaram um aumento de aproximadamente 30 % no rendimento de hidrólise enzimática do material lavado em relação à conversão enzimática obtida com o material não lavado.

2.4.1. Estratégias para hidrólise e fermentação da celulose

A bioconversão da biomassa lignocelulósica em etanol ocorre em dois passos. Primeiramente a cadeia de celulose é despolimerizada, gerando as unidades monoméricas (glicose), as quais, em uma segunda etapa, são fermentadas em etanol (ALFANI et al., 2000).

De acordo com García-Aparício et al. (2011), a hidrólise enzimática e a posterior fermentação da biomassa podem ser realizadas em duas configurações diferentes: a) hidrólise e fermentação em separado (*SHF*, do inglês *Separate Hydrolysis and Fermentation*) ou b) sacarificação e fermentação simultânea (*SSF*, do inglês *Simultaneous Saccharification and Fermentation*). A Figura 2.4 apresenta o esquema geral dos processos *SHF* e *SSF*.

No processo *SHF*, o agente da fermentação é inoculado após a etapa de hidrólise. A *SHF* pode ser realizada em um mesmo reator, ou em reatores separados (HAMELINCK; VAN HOOIJDONK; FAALJ, 2005). A vantagem da *SHF* é a possibilidade de realizar cada etapa em sua condição ideal (i.e. hidrólise enzimática a 45-50 °C e fermentação a 30 °C). No entanto, a principal desvantagem desta estratégia é a inibição que as enzimas sofrem pela liberação de glicose e celobiose durante a hidrólise (*feedback*), fazendo com que parte da celulose disponível não seja aproveitada no processo, diminuindo assim o rendimento da hidrólise (OLOFSSON; BERTILSSON; LÍDEN, 2008). Para minimizar o efeito de inibição pelo produto e alcançar maiores rendimentos na etapa de hidrólise, sugere-se tanto a utilização de uma menor carga de sólidos, diminuindo a concentração de produtos

inibitórios, quanto uma maior carga de enzimas (BALAT, 2011). Entretanto, um menor teor de sólidos na etapa de hidrólise implica também na diminuição da concentração de glicose, que está diretamente ligada à quantidade de etanol que pode ser obtida na posterior etapa de fermentação, enquanto que o aumento na carga de enzimas pode elevar substancialmente o custo do processo (ÖHGREN et al., 2006).

Figura 2.4: Representação esquemática dos sistemas de a) hidrólise e fermentação em separado (*SHF*) e b) sacarificação e fermentação simultânea (*SSF*).

Uma melhor alternativa para evitar a inibição das celulasas é a remoção contínua dos produtos de hidrólise enzimática (glicose) do meio de fermentação. Uma vez que as leveduras consomem glicose para produzir etanol, a utilização destes micro-organismos em conjunto com a hidrólise enzimática pode, em uma só etapa, aliviar a inibição das celulasas e fermentar o substrato em produto (DRISSEN et al., 2009). Este processo que combina, em uma mesma etapa, a hidrólise enzimática da celulose e a fermentação dos produtos gerados é denominado sacarificação e fermentação simultânea (*SSF*).

A ideia de realizar a *SSF* foi colocada em prática por Gauss e colaboradores em uma patente em 1976 (GAUSS¹; SUZUKI TAKAGI, 1976 apud OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008). É estimado que a diminuição no investimento de capital seja maior do que 20 % ao empregar a *SSF*, o que é importante no processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, uma vez que esta tecnologia ainda busca viabilidade econômica (WINGREN; GALBE; ZACCHI, 2003).

Apesar das vantagens econômicas, a *SSF* requer condições compatíveis para a atuação das enzimas (sacarificação) e dos micro-organismos (fermentação), uma vez que os processos ocorrem simultaneamente (BALLESTEROS et al., 2004). A condição de pH não é um problema, uma vez que tanto as enzimas quanto a maioria das leveduras atuam na mesma faixa (4,5 a 5,0). Uma vez que a temperatura ótima das celulasas (aproximadamente 50 °C) é bem superior à das leveduras comumente empregadas na produção de etanol (de 30 a 37 °C), o maior desafio da *SSF* é encontrar uma levedura com capacidade de fermentar de forma eficiente nas mesmas condições de temperatura do complexo celulolítico. Portanto, o uso de leveduras termotolerantes capazes de fermentar glicose a etanol em temperaturas acima de 40 °C, que são próximas àquelas de ótima atividade do complexo celulolítico, é recomendável (BALLESTEROS et al., 2004).

Segundo Öhgren et al. (2007), uma etapa de pré-hidrólise enzimática, ou pré-sacarificação, pode ser realizada antes da *SSF*. A pré-sacarificação é o período de tempo em que as enzimas hidrolisam o substrato lignocelulósico antes da inoculação da levedura. Esta estratégia tem sido proposta por reduzir a viscosidade do meio quando se utiliza alta concentração de substrato, acima de 10 % (m/v), facilitando a agitação e a homogeneização (GARCÍA-APARÍCIO et al., 2011)

Karimi et al. (2006) estudaram a *SSF* de palha de arroz pré-tratada com ácido diluído e avaliaram a performance fermentativa de *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, e *S. cerevisiae*. Os melhores resultados foram obtidos com *R. oryzae* e *M. indicus*, que alcançaram, respectivamente, 74 e 68% de eficiência em etanol, baseado na glicose potencial presente na palha de arroz pré-tratada.

Ko et al. (2009) avaliaram o pré-tratamento da palha de arroz por amônia visando a obtenção de etanol por *SSF*. Sob as condições de pré-tratamento otimizadas (amônia 21 % (g/g), com relação sólido:líquido de 1:6, em temperatura de 69 °C por 10 horas) foi

¹GAUSS, W. F.; SUZUKI, S.; TAKAGI, M. Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments. Volume 3990944. Issue 610731 Edited by: Office USPT. USA , Bio Research Center Company Limited, 1976.

alcançado um rendimento de hidrólise enzimática de 71,1 % com carga de 30 FPU e 60 CBU por grama de celulases e β -glicosidase, respectivamente. Os ensaios de *SSF* foram realizados na temperatura de 38 °C, empregando a levedura *S. cerevisiae* D₅A (ATCC200062), o qual alcançou uma eficiência de 83,1 % a partir da glicose potencial no material pré-tratado, com máxima concentração de etanol (12,7 g/L) em 120 horas de processo, o que correspondeu a uma produtividade volumétrica em etanol de 0,11 g/L.h.

2.5. A levedura *Kluyveromyces marxianus*

Dentre as leveduras não convencionais ou “*não Saccharomyces*” com potencial para aplicações industriais estão aquelas que pertencem ao gênero *Kluyveromyces* (FONSECA et al., 2007). Em particular, *Kluyveromyces lactis* foi a primeira levedura a receber o status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) após *Saccharomyces cerevisiae*, um importante pré-requisito para muitas aplicações industriais (BONEKAMP; OOSTEROM, 1994). *K. marxianus* é descrita como uma levedura ascomiceta, homotálica, filogeneticamente relacionada à *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* (LLORENTE et al., 2000). Entre outras características interessantes, *K. marxianus* utiliza uma vasta gama de substratos, cresce mais rapidamente que *K. lactis*, até mesmo em temperaturas acima de 40 °C (ROUWENHORST et al., 1988; STEENSMA; DE JONGH; LINNEKAMP, 1988).

Em relação à *K. lactis*, a levedura *K. marxianus* tem sido mais amplamente empregada na indústria, por apresentar características desejáveis para aplicações biotecnológicas. Estas características incluem a capacidade de assimilar açúcares como a lactose e a inulina; alta velocidade específica de crescimento; termotolerância, com capacidade de crescer em temperaturas de até 52 °C; e alta capacidade de secreção de proteínas, destacando-se a expressão heteróloga de enzimas (LANE; MORRISSEY, 2010). Como consequência, muitas aplicações biotecnológicas diferentes têm sido investigadas com esta levedura, incluindo a produção de enzimas (β -galactosidase, β -glicosidase, inulinase e poligalacturonases), etanol (especialmente processos conduzidos em alta temperatura) e oligonucleotídeos (empregados como realçadores de sabor). Além destas aplicações, a biomassa de *K. marxianus* tem sido utilizada como aditivo de rações para animais (*single-cell protein*), na redução do conteúdo de lactose em produtos alimentícios,

na biorremediação de efluentes da indústria de laticínios e como agente anti-colesterolêmico (FONSECA et al., 2008).

Segundo Lane e Morrissey (2010), *K. marxianus*, assim como *S. cerevisiae*, é uma levedura respiro-fermentativa, que pode gerar energia tanto por meio do ciclo do ácido cítrico (TCA) quanto por fermentação. A concentração de oxigênio é um dos fatores mais importantes na regulação do metabolismo energético em células vivas, e influenciam espécies de levedura de forma diferenciada (MERICO et al. (2007). As leveduras são classificadas como Crabtree positivas quando, mesmo em presença de oxigênio, o NADH é reoxidado preferencialmente pela via fermentativa em detrimento da via respiratória (PISKUR et al., 2006). *S. cerevisiae* é o exemplo clássico de levedura com status Crabtree positivo, pois quando a concentração de açúcar é elevada, a fermentação predomina sobre a respiração, mesmo em condições aeróbias (MERICO et al., 2007).

Apesar de *K. lactis* e *K. marxianus* serem geralmente classificadas como Crabtree negativas, ambas espécies possuem genes necessários para a produção de etanol e podem assumir um perfil mais voltado para a fermentação de acordo com as condições empregadas (FONSECA et al., 2008). Há dados conflitantes na literatura referentes ao “status Crabtree” de *K. marxianus* e esta dificuldade de classificação reflete a variabilidade existente entre as espécies estudadas. Merico et al. (2007) realizaram um estudo com 40 leveduras filogeneticamente relacionadas à *S. cerevisiae*, incluindo espécies de *K. marxianus*, para buscar explicações sobre a origem e evolução do efeito Crabtree nestas leveduras. Os autores concluíram que as leveduras do gênero *Kluyveromyces* são essencialmente Crabtree negativas, pois em condições aeróbias direcionam o metabolismo preferencialmente para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), embora apresentem a capacidade de fazer respiração e fermentação simultaneamente, sendo que a preferência por uma via ou por outra depende da linhagem e das condições empregadas. Este fato explica o motivo pelo qual algumas, mas não todas, as linhagens desta espécie são produtoras efetivas de etanol (FONSECA et al., 2008).

De acordo com dados da literatura, existem linhagens de *K. marxianus* capazes de produzir etanol em temperaturas acima de 40°C e com temperatura máxima de crescimento a 47 °C (ANDERSON; MCNEIL; WATSON, 1986), 49 °C (HUGHES; TUDROSZEN; MOYE, 1984) e até 52 °C (BANAT et al., 1992).

Algumas linhagens de *K. marxianus* termotolerantes merecem um maior destaque, devido à quantidade de trabalhos realizados com as mesmas. Um grupo de pesquisadores espanhóis do CIEMAT (*Cientro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y*

Tecnológicas) identificaram linhagens de *Kluyveromyces marxianus* e *K. fragilis* com alta produtividade em etanol a 42 °C partindo de 27 linhagens de levedura (BALLESTEROS et al. 1991). Os autores reportaram uma produção de 38 g/L de etanol, com fator de conversão de 0,5 g/g (grama de etanol por grama de celulose) em 78 horas a 42 °C, empregando 76 g/L de Solka-Floc 200 como substrato. Outro trabalho publicado pelo mesmo grupo de pesquisadores (BALLESTEROS et al., 2004), mostram os parâmetros obtidos no processo de *SSF* utilizando a levedura *K. marxianus* CECT 10875 em diferentes substratos lignocelulósicos (madeiras *Populus nigra* e *Eucalyptus globulos*, palha de trigo, bagaço de sorgo e resíduo de mostarda *Brassica carinata*) pré-tratados com explosão a vapor. Os experimentos de *SSF* foram realizados a 42 °C, com concentração de 10% (m/v) de substrato, utilizando celulase comercial (Celluclast 1.5L) na concentração de 15 FPU/g de material. Os resultados mostraram que a eficiência (baseada no rendimento teórico a partir da glicose disponível no material pré-tratado) da *SSF* variou de 50 a 72%, dependendo do substrato empregado, com tempo de fermentação entre 72 e 82 horas. O trabalho mais recente publicado por este grupo de pesquisadores com a linhagem *K. marxianus* CECT 10875 estudou a produção de etanol por *SSF* a partir de palha de cevada pré-tratada por explosão a vapor (GARCÍA-APARÍCIO et al., 2011). Os autores reportaram 22 g/L de etanol em 72 horas de processo como a máxima concentração alcançada, o que correspondeu a 67,4% de rendimento baseado na glicose disponível no material pré-tratado.

Outro grupo de pesquisadores, da Universidade de Ulster, Irlanda do Norte, em parceria com pesquisadores da Universidade Agrícola de Haryana, Índia, isolaram cinco linhagens termotolerantes de *K. marxianus* (IMB1, IMB2, IMB3, IMB4 e IMB5) em ambiente de destilarias de vinho na Índia (BANAT et al., 1992). Dentre estas, a levedura mais estudada é a IMB3, haja vista o grande número de trabalhos que foram realizados desde o seu isolamento, como pode ser verificado na revisão publicada por Singh et al. (1998), que apresenta diversos resultados e aplicações desta linhagem. Trabalhos mais recentes empregando esta levedura incluem a sua utilização em *SSF* sob temperatura de 45 °C (PESSANI et al., 2011). Os autores avaliaram os efeitos da carga enzimática, temperatura e concentração inicial de substrato na produção de etanol a partir de *switchgrass* (*Panicum virgatum*), e reportaram uma concentração máxima de 22,5 g/L de etanol a partir de 8% (m/v) de substrato em 168 horas de *SSF*.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como principal objetivo contribuir para os avanços das pesquisas na área de produção de etanol, por via biotecnológica, a partir de matérias primas lignocelulósicas.

Para atingir o objetivo deste trabalho, as seguintes etapas foram cumpridas:

- Selecionar uma linhagem termotolerantes de *Kluyveromyces marxianus* capaz de produzir etanol a partir de glicose a 45 °C;
- Avaliar as condições de aeração e agitação em meio semissintético que favorecem a produção de etanol a partir de glicose por *K marxianus* NRRL Y-6860;
- Avaliar o potencial fermentativo da *K. marxianus* NRRL Y-6860 em elevada concentração de glicose em meio semissintético;
- Obter e caracterizar a celulignina de palha de arroz pré-tratada com ácido diluído;
- Caracterizar os extratos comerciais Cellubrix e Novozyme 188 e definir a carga destas enzimas para a hidrólise da celulignina de palha de arroz;
- Avaliar as estratégias de sacarificação e fermentação da celulignina de palha de arroz empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860 para a produção de etanol;
- Comparar a sacarificação e fermentação simultânea (*SSF*) da celulignina de palha de arroz empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860 e *S. cerevisiae* em temperaturas de 30 e 45 °C.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Fermentação do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP).

4.1. Seleção da linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus*

Esta etapa visou selecionar uma linhagem de *K. marxianus* com a capacidade de fermentar glicose a etanol na temperatura de 45 °C, para posterior aplicação na fermentação do hidrolisado enzimático da celulignina da palha de arroz. Para a seleção da linhagem termotolerante utilizou-se como critério os seguintes parâmetros fermentativos: fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$), eficiência (η), produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e velocidade máxima de crescimento específico ($\mu_{\text{máx}}$).

4.1.1. Micro-organismo e preparo do inóculo

Nestes experimentos foram avaliadas oito linhagens de *K. marxianus*, designadas como Km-1 a Km-8, para a seleção de leveduras termotolerantes na produção de etanol a partir de glicose (Tabela 4.1).

As culturas foram mantidas, separadamente, repicadas em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinado e conservadas em geladeira a 4°C. O meio utilizado para crescimento do inóculo foi descrito por Tomás-Pejó et al. (2009), e formulado utilizando soluções concentradas de cada componente (Tabela 4.2), as quais foram preparadas separadamente e esterilizadas a 121°C por 20 minutos, exceto a solução de glicose que foi autoclavada a 112°C por 15 minutos. As soluções foram então misturadas assepticamente de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente no meio de cultura.

O inóculo foi preparado transferindo-se uma alçada de células, proveniente do repique em meio de manutenção, para tubos de ensaio contendo cerca de 5 ml de água destilada

esterilizada. Alíquotas de 1 ml desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml do meio descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4.1 – Linhagens de *K. marxianus* testadas na fermentação de glicose a 45 °C

Linhagem	Designação	Fonte
<i>K. marxianus</i> ATCC 8554	Km-1	LOT EEL-USP*
<i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i> CCT 4086	Km-2	LOT EEL-USP*
<i>K. marxianus</i> CCT 3192	Km-3	LOT EEL-USP*
<i>K. marxianus</i> UFV-3	Km-4	UFV**
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-6860	Km-5	USDA***
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-6373	Km-6	USDA***
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-8287	Km-7	USDA***
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-2265	Km-8	USDA***

*Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP), Departamento de Biotecnologia.

**Universidade Federal de Viçosa, BIOAGRO, Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos.

***Coleção de culturas ARS/USDA, Peoria – IL, Estados Unidos.

Tabela 4.2 – Composição do meio em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8.

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	30,0 ou 50,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
Extrato de levedura	5,0

Os frascos foram incubados à 42°C em agitador rotatório (Tecnal TE-420) a 200 rpm por 16 horas. Após este tempo as células foram separadas por centrifugação a 4000 × g por 10 minutos e ressuspensas diretamente no meio de fermentação.

4.1.2. Meio e condições de fermentação

Foram realizados dois testes fermentativos com as linhagens de *K. marxianus*, ambos em temperatura de 45 °C, porém variando-se a velocidade de agitação (150 e 100 rpm). As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo de 50 ml de meio de fermentação (Tabela 4.2), inoculado com $DO_{600} = 3,0$, equivalente a cerca de 0,5 g/L. Os frascos inoculados foram incubados em agitador rotatório (Tecnal TE-420) por 24 horas. Durante as fermentações foram retiradas amostras para determinação do crescimento celular, consumo de glicose e produção de etanol

4.2. Efeito da aeração e agitação na produção de etanol

Visando definir melhores condições de fermentação para a linhagem de *K. marxianus* selecionada na etapa anterior, foi estudado o efeito da velocidade de agitação e aeração (relação volume do frasco/volume do meio de fermentação) sobre a produção de etanol a 45 °C. Esta etapa visou definir melhores condições de fermentação para a levedura selecionada na etapa anterior. Sob as condições de agitação e aeração selecionadas, um ensaio fermentativo contendo cerca de 110 g/L de glicose foi também realizado a fim de avaliar o potencial fermentativo da levedura selecionada.

4.2.1. Micro-organismo e preparo do inóculo

O micro-organismo utilizado nestes experimentos foi a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860. A cultura foi mantida repicada em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinado e conservada em geladeira a 4°C. O meio utilizado para crescimento do inóculo foi formulado utilizando soluções concentradas de cada componente (Tabela 4.2), as quais foram preparadas separadamente e esterilizadas a 121°C por 20 minutos, exceto a solução de glicose que foi autoclavada a 112°C por 15 minutos. As soluções foram então

misturadas assepticamente de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente no meio de cultura.

O inóculo foi preparado transferindo-se uma alçada de células, proveniente do repique em meio de manutenção, para tubos de ensaio contendo cerca de 5 ml de água destilada esterilizada. Alíquotas de 1 ml desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml do meio descrito na Tabela 4.2. Os frascos foram incubados à 42°C em agitador rotatório (Tecnal TE-420) a 200 rpm por 16 horas. Após este tempo as células foram separadas por centrifugação a $4000 \times g$ por 10 minutos e ressuspensas diretamente no meio de fermentação.

4.2.2. Meio e condições de fermentação

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo de 25, 33,3 ou 50 ml de meio de fermentação com 50 g/L de glicose (Tabela 4.2), inoculado com uma concentração celular inicial de 1 g/l. Os ensaios foram realizados de acordo com um planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, conforme mostrado na Tabela 4.3. Após inoculados, os frascos foram incubados à 45 °C sob agitação de 100, 150 ou 200 rpm em agitador rotatório (Tecnal TE-420) por 24 h. Durante as fermentações foram retiradas amostras para determinação do crescimento celular, consumo de glicose e produção de etanol.

Tabela 4.3 – Planejamento fatorial 2^2 para avaliação do efeito da agitação e aeração sobre produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860 a 45 °C

Ensaio	Níveis originais		Níveis codificados	
	Agitação (rpm)	$V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$	Agitação (rpm)	$V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$
1	100	2,5	-1	-1
2	200	2,5	+1	-1
3	100	5	-1	+1
4	200	5	+1	+1
5	150	3,75	0	0
6	150	3,75	0	0
7	150	3,75	0	0

4.3. Obtenção da celulignina de palha de arroz

4.3.1. Matéria-Prima

A palha de arroz utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida por produtores da cidade de Canas, no estado de São Paulo. Após a colheita no campo, a palha de arroz foi seca ao sol e moída a 2 x 0,5 cm em moinho de martelo (BEMEDETTI – dupla 270), pesada, ensacada e armazenada até a realização do pré-tratamento.

4.3.2. Pré-tratamento com ácido diluído e obtenção da celulignina

O pré-tratamento da palha de arroz foi realizado em um reator de aço inoxidável AISI 316 com o volume útil de 350 litros, provido de aquecimento indireto por resistência elétrica equipado com camisa de óleo térmico. Foram empregados 17,3 kg de palha de arroz seca (20 kg de palha com 13,4% de umidade), sendo o volume total de solução ácida no reator de 173,2 L (960,5 mL de H₂SO₄ 98% (p/p) e 172,24 L de água), de tal forma que a proporção de ácido por matéria seca fosse de 100mg/g e a relação de matéria seca/solução ácida fosse de 1:10, de acordo com as condições definidas por Roberto, Mussatto e Rodrigues (2003). Todo o material foi colocado no reator (pela abertura superior), que já continha parte da solução ácida pré-aquecida (na temperatura de 68 °C), e, posteriormente, foi adicionado o volume de água restante para alcançar a concentração de ácido definida. O pré-tratamento ocorreu por 30 minutos a 126 °C.

Ao término do pré-tratamento foi necessário um tempo de 90 minutos para que a pressão interna do reator atingisse a pressão ambiente, fornecendo assim condições para a abertura do reator e a retirada do material, o qual foi filtrado para a separação da fração sólida. A parte líquida (hidrolisado hemicelulósico) foi estocada para posterior análise quanto ao teor de carboidratos e outros produtos de degradação do material lignocelulósico.

O material sólido (celulignina) obtido após a hidrólise ácida foi recolhido em recipientes plásticos de 200 litros (bombonas) e lavado pela passagem de 5 volumes de

água através do material. A bombona possuía furos nas laterais e na parte inferior, de modo a permitir a saída da água de lavagem. Posteriormente, a celulignina foi exposta ao sol e, durante a noite, acondicionada em estufa a 60 °C com fluxo de ar, até que o teor de umidade fosse menor do que 10%, para que não houvesse risco de contaminação por fungos durante a estocagem.

A Figura 4.1 mostra quatro imagens do reator utilizado no pré-tratamento da palha de arroz, bem como o recipiente plástico em que o material pré-tratado foi recolhido.

Figura 4.1: Reator AISI 316 utilizado no pré-tratamento da palha de arroz com ácido diluído. (A) Parte superior do reator, mostrando a abertura (B) utilizada para a adição da palha de arroz. (C) Parte inferior do reator, mostrando a válvula de abertura para retirada do material pré-tratado e (D) um dos recipientes plásticos (bombona) que foi utilizado para recolher o hidrolisado e o sólido pré-tratado.

4.4. Caracterização do material lignocelulósico

As amostras de palha de arroz e de celulignina (obtida após o pré-tratamento ácido) foram caracterizadas quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, baseando-se nas metodologias descritas por Browning (1967) e Rocha (2000). Para isso, 2 gramas de amostra do material foram transferidas para um béquer de 100 mL onde adicionou-se 10 mL de H₂SO₄ 72% (p/p). A reação foi mantida em banho termostatizado (MICRONAL modelo B.15) a 50 °C, por 7 minutos, sob agitação constante e vigorosa com bastão de vidro. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 50 mL de água destilada e todo o conteúdo do béquer foi transferido quantitativamente para um Erlenmeyer de 500 mL, onde o volume total de água foi elevado para 275 mL. Em seguida, o Erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e levado à autoclave a 121°C por 45 minutos, para promover a hidrólise completa dos oligômeros restantes. Após autoclavagem, o frasco foi resfriado até temperatura ambiente e o material sólido foi separado da fração líquida por filtração utilizando papel de filtro previamente tarado. O hidrolisado foi recolhido em um balão volumétrico de 500 mL e o sólido contido no papel de filtro foi lavado com água destilada até atingir o volume do balão. A lignina retida no papel de filtro foi lavada ainda com 1,5 L de água destilada antes da secagem em estufa à 105°C até atingir peso constante. A relação entre a massa do resíduo e a massa inicial da amostra foi utilizada para determinar a porcentagem de lignina insolúvel presente nas amostras (Equação 4.1). Uma alíquota da fração líquida obtida foi filtrada em filtro Sep Pak C₁₈ e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinação das concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, as quais foram utilizadas para o cálculo da porcentagem de celulose, hemicelulose e grupos acetil presentes na amostra de acordo com as Equações 4.2, 4.3 e 4.4:

$$\% \text{ Lignina insolúvel} = \frac{m_R - m_C}{m_A} \times 100 \quad (4.1)$$

$$\% \text{ Celulose} = \frac{C_{gli} \times 0,5 \times F_C \times F_{PH}}{m_A} \times 100 \quad (4.2)$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \frac{(C_{\text{xil}} + C_{\text{ara}}) \times 0,5 \times F_C \times F_{\text{PH}}}{m_A} \times 100 \quad (4.3)$$

$$\% \text{ Grupos acetil} = \frac{C_{\text{acet}} \times F_C}{m_A} \times 100 \quad (4.4)$$

onde: F_C = fator de conversão (0,9 para a celulose, 0,88 para a hemicelulose e 0,72 para grupos acetil); F_{PH} = fator de perda de hidrólise (1,055 para celulose e 1,155 para hemicelulose); C_{gli} , C_{xil} , C_{ara} e C_{acet} (concentração em g/L de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, respectivamente); m_A = massa da amostra seca (g); m_R = massa do resíduo de lignina (g); m_C = massa de cinzas após calcinação (g).

Para determinação de teor de cinzas, aproximadamente 1 grama da amostra (pesada em balança analítica) foi colocada em um cadinho de porcelana previamente tarado e aquecida em mufla elétrica a 800 °C por 2 h. As cinzas foram determinadas pela diferença de peso das amostras, antes e após a incineração (Equação 4.5). Antes de serem pesadas, as amostras foram colocadas em um dissecador por 45 minutos.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{m_{\text{CT}}}{m_A} \times 100 \quad (4.5)$$

onde: m_{CT} = massa de cinzas totais (g), obtida pela diferença de peso das amostras; m_A = massa da amostra seca (g).

Para determinação da lignina solúvel, uma alíquota de 5 mL do hidrolisado foi alcalinizada com NaOH 6M até atingir pH 12, diluída em balão volumétrico de 100 ml e analisada por espectroscopia de UV (espectrofotômetro Hitachi U-1800) a um comprimento de onda de 280 nm, utilizando água destilada em pH 12 como branco. Amostras do hidrolisado foram também analisadas por CLAE para determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural, as quais juntamente com a leitura de absorbância, foram empregadas para calcular o teor de lignina solúvel na amostra, de acordo com as Equações 4.6, 4.7 e 4.8 a seguir:

$$A_{PD280} = (C_{Furf} \times \varepsilon_{Furf}) + (C_{HMF} \times \varepsilon_{HMF}) \quad (4.6)$$

$$C_{Lignina \text{ solúvel}} = [(4,187 \times 10^{-2} \times (A_{hid280} - A_{PD280})) - 3,279 \times 10^{-4}] \quad (4.7)$$

$$\% \text{ Lignina solúvel} = \frac{C_{Lignina \text{ solúvel}} \times 0,5}{m_A} \times 100 \quad (4.8)$$

onde: A_{hid280} = absorbância do hidrolisado alcalinizado a 280 nm (com a correção da diluição); A_{PD280} = absorbância dos produtos de degradação de açúcares; C_{Furf} e C_{HMF} concentração de furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, no hidrolisado (g/l); ε_{Furf} = absortividade do furfural (146,85 L/g.cm); ε_{HMF} = absortividade do hidroximetilfurfural (114 L/g.cm); $C_{Lignina \text{ solúvel}}$ = concentração de lignina solúvel (g/L); m_A = massa da amostra seca.

4.5. Determinação das condições de hidrólise enzimática da celulignina

Nestes experimentos utilizou-se como substrato a celulignina obtida após pré-tratamento da palha de arroz por ácido diluído (item 4.3.2).

4.5.1. Enzimas

As fontes de enzima para a hidrólise da celulignina utilizadas neste trabalho foram as preparações comerciais Cellubrix (fonte de celulases) e Novozyme 188 (fonte de β -glicosidase), ambas da empresa Novozymes Corporation (Dinamarca). A atividade de celulase total e de β -glicosidase de cada preparado enzimático foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Ghose (1987) e por Wood e Bath (1988), descritas a seguir.

4.5.2. Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade de celulasas totais foi adotada a metodologia descrita por Ghose (1987). Em tubos de ensaio de 25 mL, adicionou-se tiras de 1 x 6 cm (50 mg) de papel de filtro Whatman nº 1 e 1,0 mL de tampão citrato 50 mM (pH 4,8). Os tubos foram pré-incubados à 50 °C. Para dar início a reação, foram adicionados 0,5 mL de diferentes diluições enzimáticas. Os respectivos brancos (enzima e substrato) e diferentes diluições do padrão de glicose (10 mg/mL) foram submetidos às mesmas condições experimentais para construção da curva de calibração. Após o tempo de 60 minutos, as reações foram interrompidas com 3 mL do reagente DNS (MILLER, 1959) e fervidas durante 5 minutos. Logo após, foram adicionados 20 mL de água destilada em cada tubo e a leitura da absorbância foi feita à 540 nm em espectrofotômetro (HITACHI U-1800). A concentração de glicose liberada no meio foi determinada utilizando uma curva padrão de glicose.

Para o cálculo da atividade de celulasas totais (FPU), primeiramente foi estimada a concentração enzimática responsável por liberar exatamente 2 mg de glicose. Para isso, foi plotado um gráfico semilog da concentração do extrato enzimático em relação à massa de glicose liberada na reação. Após encontrar a diluição enzimática responsável por liberar exatamente 2 mg de glicose (uma diluição enzimática de 1/200 equivale a 0,005), a atividade enzimática foi determinada pela Equação 4.9.

$$\text{FPU/mL} = \frac{0,37}{\text{Diluição enzimática que liberou 2 mg de glicose}} \quad (4.9)$$

Uma unidade de papel de filtro (FPU) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por minuto, empregando como substrato o papel de filtro Whatman nº 1, na temperatura de 50 °C. O fator 0,37 corresponde à conversão de 2 mg de glicose em 1 µmol de glicose por minuto, levando em consideração o volume de amostra e o tempo de reação, conforme se segue:

$$1 \mu\text{mol de glicose} = 0,18 \text{ mg de glicose}$$

$$2 \text{ mg de glicose} = 2/0,18 \mu\text{mol de glicose}$$

$$2 \text{ mg de glicose} = (2/0,18) \mu\text{mol de glicose} \times (1/60 \text{ min.}) \times (1/0,5 \text{ mL})$$

$$2 \text{ mg de glicose} = 0,37 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} (\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1})$$

Para a determinação da atividade de β -glicosidase foi utilizada a metodologia proposta por Wood e Bath (1988), a qual se utilizou uma solução de *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (50 mM) como substrato. Tubos de ensaio com 1 mL de substrato e 1,8 mL de tampão citrato de sódio 50mM (pH 4,8) foram pré-incubados à 50 °C. Após esse tempo, foram adicionados 0,2 mL de diferentes diluições enzimáticas. Para obter a cinética enzimática, a produção de *p*-nitrofenol foi monitorada nos tempos de 10, 20 e 30 minutos. Também foram conduzidos os brancos das diluições enzimáticas e do substrato nas mesmas condições experimentais. As reações enzimáticas foram interrompidas pela adição de 4 mL de tampão glicina 0,4 M (pH 10,8) e a leitura das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Hitachi U-1800), à 430 nm. A concentração de *p*-nitrofenol liberada no meio reacional foi determinada de acordo com uma curva padrão previamente construída. Uma unidade de atividade enzimática de β -glicosidase é definida como 1 μmol de *p*-nitrofenol formado por minuto (UI).

O teor de proteína presente nas preparações enzimáticas comerciais foi determinado de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando soroalbumina bovina como padrão.

4.5.3. Hidrólise enzimática

Visando definir as condições de hidrólise para a posterior etapa de sacarificação e fermentação da celulignina de palha de arroz, foram realizados experimentos de hidrólise enzimática com 8% (m/v) de celulignina empregando diferentes cargas de Cellubrix e/ou Novozyme 188 em temperatura de 45 °C e sob agitação rotatória de 100 rpm.

As cargas dos extratos enzimáticos empregadas nestes ensaios estão apresentadas na Tabela 4.4. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de volume de reação (mistura enzima-tampão). Para os experimentos, 4g de celulignina (base seca) foi adicionada aos frascos Erlenmeyer em tampão citrato de sódio

50 mM (pH 4,8). Após a adição das enzimas, previamente diluídas em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), os frascos foram fechados com papel filme e incubados em agitador rotatório (Tecnal TE-420) a 45°C durante 24 horas.

Tabela 4.4 – Cargas dos extratos enzimáticos Cellubrix e Novozyme 188 empregados na hidrólise de 8% (m/v) de celulignina de palha de arroz

Ensaio	Carga do extrato enzimático	
	Cellubrix (FPU/g)	Novozyme 188 (UI/g)
1	10	-
2	25	-
3	40	-
4	10	10
5	25	25
6	40	40
7	10	40
8	40	10

Amostras do meio reacional foram retiradas periodicamente até o tempo final de hidrólise para determinar a concentração de glicose liberada. Assim que retirada, a amostra foi aquecida em banho-maria a 100 °C durante 5 minutos, para precipitar as proteínas e interromper a atividade enzimática. Após resfriada, a mistura reacional foi centrifugada a 4000×g durante 10 minutos e os hidrolisados obtidos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinar a concentração de glicose e assim calcular o rendimento de hidrólise enzimática da celulignina de palha de arroz.

4.6. Sacarificação e fermentação da celulignina

De acordo com os resultados obtidos nas etapas anteriores, foram realizados experimentos de sacarificação e fermentação da celulignina da palha de arroz pré-tratada

com ácido diluído. A Figura 4.2 ilustra as três estratégias de sacarificação e fermentação da celulignina: 1) Hidrólise e fermentação em separado em que a celulignina foi hidrolisada enzimaticamente por 12 horas e, após este tempo, a levedura foi inoculada, na presença de enzimas ativas (SHF_A) ou 2) inativadas pelo calor por aquecimento em banho-maria a 100 °C por 10 minutos (SHF_i); e 3) sacarificação e fermentação simultânea (SSF) em que a levedura foi inoculada ao mesmo tempo da adição das enzimas.

Figura 4.2: Representação esquemática das estratégias utilizadas para os ensaios de sacarificação e fermentação da celulignina de palha de arroz.

4.6.1. Micro-organismos e preparo do inóculo

As condições de cultivo do microrganismo (*K. marxianus* NRRL Y-6860) e preparo do inóculo utilizadas nestes experimentos foram as mesmas descritas anteriormente no item 4.3.1. Nos ensaios empregando *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizado fermento comercial seco, da marca Dr. Oetker. Para a obtenção do inóculo de *S. cerevisiae*, 1g da levedura seca foi adicionado a um tubo Falcon contendo 10 mL de água destilada estéril por 10 minutos (THOMAZ, 2008). Após este tempo, 1 mL da suspensão celular foi

adicionada em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio descrito na Tabela 4.2, e incubado em agitador rotatório a 200 rpm em temperatura de 30 ou 37 °C por 16 horas, dependendo das condições de temperatura na etapa posterior de fermentação.

4.6.2. Meio e condições de fermentação

Todos os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de volume de reação (mistura enzima-tampão) em agitação rotatória de 100 rpm e 45 °C. Nos ensaios contendo 8% (m/v) de substrato, o meio de fermentação foi composto por 4 g de celulignina (matéria seca), 2,5 mL de tampão citrato de sódio 1 M (concentração final 50 mM, pH 4,8) e 40 mL de água destilada. Para alcançar a carga de 25 FPU/g e 25 UI/g de substrato, foram adicionados 5 mL de uma solução diluída (1:2) de Cellubrix e 2,5 mL de uma solução diluída (1:8) de Novozyme 188, respectivamente.

No ensaio contendo 12 % (m/v) de substrato, foram adicionados 6 g (matéria seca) de celulignina, 2,5 mL de tampão citrato de sódio 1 M e 36,25 mL de água destilada. Para manter a mesma carga enzimática (25 FPU/g e 25 UI/g), foram adicionados 7,5 mL de uma solução diluída (1:2) de Cellubrix e 3,75 mL de uma solução diluída (1:8) de Novozyme 188.

A concentração inicial do inóculo nos ensaios com *K. marxianus* NRRL Y-6860 foi de 1 g/L, e nos ensaios com *S. cerevisiae* utilizou-se uma DO₆₀₀ de 3,0. No momento da adição do inóculo, 2 mL de uma solução concentrada de sais (KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O) e extrato de levedura também foi adicionada ao meio de fermentação, a fim de se obter a concentração destes nutrientes descritos na Tabela 4.2.

Com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura sobre a produção de etanol no processo de sacarificação e fermentação da celulignina de palha de arroz, foram realizados experimentos de *SSF* a 30 °C, empregando *S. cerevisiae* ou *K. marxianus* NRRL Y-6860.

Durante todas as fermentações foram retiradas amostras para determinação da concentração de glicose e etanol.

4.7. Métodos analíticos

4.7.1. Determinação do teor de umidade do material lignocelulósico

O teor de umidade da palha de arroz e da celulignina foram determinados em balança analítica provida de aquecimento por infravermelho (IV2000 – GEHAKA). Aproximadamente 1 g da amostra foi colocada na balança, a qual foi aquecida pela ação dos raios infravermelhos até obter peso constante. A umidade do material foi então determinada pela diferença entre a massa obtida antes e após o aquecimento, de acordo com a Equação 4.10.

$$\% \text{ Umidade} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (4.10)$$

onde: m_i = massa inicial; m_f = massa final após aquecimento

4.7.2. Determinação da concentração celular de *Kluyveromyces marxianus*

A concentração celular das leveduras foi determinada pela medida da densidade óptica a 600 nm (turbidimetria) em espectrofotômetro (Hitachi U-1800) utilizando água como branco. Para isso, cultivou-se a levedura em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio descrito na Tabela 4.2 por 12 horas a 200 rpm e 42 °C. Todo o volume do meio contendo as células foi centrifugado a 4000×g por 10 minutos, para recuperação da massa celular que, posteriormente, foi lavada 2 vezes com água destilada. As células foram ressuspensas em 15 mL de água destilada, formando uma suspensão celular densa. Alíquotas de 3 mL desta suspensão celular foram colocadas em cadinhos previamente tarados e incubados em estufa a 105 °C até peso constante. Alíquotas da mesma suspensão

celular foram diluídas entre 10 e 1000 vezes para que uma faixa de leitura entre 0,1 a 0,9 unidades de DO_{600} fosse alcançada. A concentração celular foi determinada utilizando uma equação obtida por regressão linear dos dados entre peso seco e absorbância a 600 nm.

4.7.3. Determinação dos teores dos açúcares, ácido acético e etanol

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em um equipamento Waters nas seguintes condições: detector de índice de refração, coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), temperatura de 45°C, ácido sulfúrico 0,01 N como eluente em um fluxo de 0,6 ml/min e volume de amostra de 100 µl. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em filtros Sep Pak C₁₈ (Millipore). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas com soluções padrão.

4.7.4. Determinação dos teores de furfural e hidroximetilfurfural

As concentrações de furfural, hidroximetilfurfural, foram determinadas por CLAE, em um equipamento Waters nas seguintes condições: detector UV, coluna Waters C₁₈ 5 µm (300 x 3,9 mm), temperatura ambiente, acetonitrila e água na proporção de 1:9 com 1% de ácido acético como eluente, fluxo de 0,8 ml/min e volume de amostra de 20 µl. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em membranas do tipo HSWP com poros de 0,45 µm (Millipore). As concentrações destes compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

4.7.5. Determinação dos compostos fenólicos

A concentração total dos compostos fenólicos foi quantificada colorimetricamente pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999) usando ácido ferúlico como padrão de calibração. As amostras foram centrifugadas a 3000×g por 10 minutos para remover os sólidos e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e diluído com água deionizada. Foram adicionados 3,0 mL da amostra e 0,2 mL do reagente de Folin em tubos de ensaio e, após agitação em vórtice, a mistura foi mantida em repouso por 5 minutos. Após este tempo, adicionou-se 0,8 mL de uma solução de (Na)₂CO₃ na concentração de 150 g/L. Após agitação em vórtice, a mistura foi mantida em repouso na ausência de luz em temperatura ambiente por 30 minutos. Utilizou-se como branco 3,0 mL de água deionizada em substituição à amostra, o qual foi submetido às mesmas etapas da amostra. Procedeu-se, então, a leitura da absorvância da amostra a 760 nm em espectrofotômetro (HITACHI U-1800).

4.7.6. Determinação de pH

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria, em um aparelho MICRONAL modelo B474, com correção de temperatura.

4.8. Determinação dos parâmetros fermentativos e do rendimento de hidrólise enzimática

Os valores apresentados para os fatores de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$) foram calculados pelo coeficiente angular da equação linear $\Delta P = a + Y_{P/S} \times (-\Delta S)$, quando três ou mais pontos experimentais foram obtidos, ou pela razão $\Delta P / \Delta S$ quando apenas os pontos iniciais e finais eram conhecidos, em que P é a concentração de etanol e S a concentração de glicose, ambos em g/L. De forma semelhante, o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) foi calculado pelo coeficiente angular da equação linear $\Delta X = a$

+ $Y_{X/S} \times (-\Delta S)$, quando três ou mais pontos experimentais foram obtidos, ou pela razão $\Delta X / \Delta S$ quando apenas os pontos iniciais e finais eram conhecidos, em que X corresponde à concentração celular e S a concentração de glicose, ambos em g/L. O fator de conversão de célula em etanol ($Y_{P/X}$) foi estimado pelo quociente entre $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$. A eficiência de produção de etanol a partir de glicose (η , %) foi calculada pela relação entre os valores de $Y_{P/S}$ obtido e o valor máximo teórico para este parâmetro (0,51 g/g). A velocidade máxima de crescimento específico ($\mu_{\text{máx}}$) foi estimada pelo coeficiente angular da regressão linear de $\ln X$ versus o tempo (h), em que X é a concentração celular (DO_{600} ou g/L), na fase de crescimento exponencial. A produtividade volumétrica em etanol (Q_P , g/L.h) foi calculada pela Equação 4.11. Para os experimentos de sacarificação e fermentação da celulignina, além do cálculo de Q_P , relativo apenas ao tempo de fermentação, também foi realizado o cálculo da produtividade volumétrica total em etanol (Q_{PT} , g/L.h) em que foi considerado o tempo de sacarificação e o tempo de fermentação, foi calculada pela Equação 4.12.

$$Q_P = \frac{\Delta P}{t} \quad (4.11)$$

$$Q_{PT} = \frac{\Delta P}{t_{\text{total}}} \quad (4.12)$$

onde: ΔP = variação da concentração de etanol (g/L); t = tempo (h); t_{total} = tempo total do processo, dado pela soma do tempo de sacarificação e de fermentação (h).

A concentração de glicose potencial que poderia ser alcançada no meio de fermentação contendo a celulignina de palha de arroz foi estimada pela equação 4.13, considerando toda a glicose presente na celulignina da palha de arroz. O rendimento de hidrólise enzimática ($R_{\text{Hidrólise}}$, %) foi calculado pela relação entre a concentração de glicose obtida e a concentração potencial de glicose (Equação 4.14).

$$C_{\text{GliPotencial}} = \frac{C_{\text{celulignina}} \times \text{teor de celulose} \times 0,1}{F_c} \quad (4.13)$$

$$R_{\text{Hidrólise}} (\%) = \left(\frac{C_{\text{gli}}}{C_{\text{GliPotencial}}} \right) \times 100 \quad (4.14)$$

onde: $C_{\text{GliPotencial}}$ = Concentração de glicose potencial (g/L); $C_{\text{celulignina}}$ = Concentração de celulignina (% m/v); teor de celulose (% g/g); F_c = fator de conversão de celulose em glicose (0,9); C_{gli} = Concentração de glicose obtida (g/L).

Para os experimentos de sacarificação e fermentação, também foram definidos outros parâmetros. O fator de conversão de glicose potencial em etanol ($Y'_{P/S}$) foi calculado pela equação 4.15, considerando a glicose potencial presente na celulignina de palha de arroz. A eficiência de fermentação (η' , %) foi estimada pela relação entre $Y'_{P/S}$ e o fator teórico de conversão de glicose em etanol (0,51), calculada pela equação 4.16.

$$Y'_{P/S} = \frac{C_{\text{Etanol}}}{C_{\text{GliPotencial}}} \quad (4.15)$$

$$\eta' = \frac{Y'_{P/S}}{0,51} \times 100 \quad (4.16)$$

onde: C_{Etanol} = Concentração de etanol obtida (g/L); $C_{\text{GliPotencial}}$ = Concentração de glicose potencial (g/L).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção da levedura termotolerante para a fermentação da celulignina

Foram realizados testes fermentativos com as oito linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, todos sob temperatura de 45 °C, porém variando-se a velocidade de agitação (150 e 100 rpm). O primeiro ensaio, com agitação rotatória de 150 rpm, foi realizado com todas as linhagens (Km-1 a Km-8) e os resultados estão apresentados na Figura 5.1, em que não são mostrados os perfis cinéticos das leveduras Km-7 e Km-8, uma vez que estas não apresentaram crescimento nas condições avaliadas. Na temperatura de 30 °C estas leveduras foram capazes de crescer em meio semissintético contendo glicose (dados não mostrados), mas sob temperaturas em torno de 45 °C o crescimento destas foi totalmente inibido, mostrando que estas linhagens não possuíam a característica visada nesta seleção.

Nota-se que, nas condições de fermentação empregadas, praticamente toda a glicose foi consumida em 8 horas de fermentação pelas linhagens Km-1, Km-2, Km-3, Km-5 e Km-6 (Figura 5.1 a, b, c, e, f, respectivamente). Apenas a linhagem Km-4 apresentou baixo consumo de substrato e consequentemente baixo crescimento e produção de etanol (Figura 5.1 d). Este comportamento pode ser atribuído à inibição da levedura pela elevada temperatura empregada na fermentação (45 °C), uma vez que nas condições de obtenção do inóculo, onde se utilizou uma temperatura de 42 °C, a mesma alcançou uma concentração celular correspondente a 30 unidades de DO₆₀₀ (dados não mostrados). De fato, Souza (2011) observou a sensibilidade desta levedura perante pequenas variações na temperatura. O autor reportou que a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da levedura *K. marxianus* UFV-3, aqui designada como Km-4, diminuiu em 55 % quando a temperatura de crescimento passou de 42 para 45 °C.

A máxima produção de etanol para as linhagens Km-1, Km-2, Km-3 e Km-5 ocorreu em 8 horas, enquanto para a linhagem Km-6 foi observada a maior concentração de produto em 12 horas de fermentação. Nota-se também que, para estas linhagens, não ocorreu consumo acentuado de etanol após o término da glicose presente no meio. Vale destacar que a levedura Km-6 foi a que apresentou o maior crescimento celular, atingindo uma DO₆₀₀ de 30 unidades, enquanto as demais apresentaram valores abaixo de 20 unidades.

Figura 5.1: Produção de etanol por diferentes linhagens de *K. marxianus* a) Km-1, b) Km-2, c) Km-3, d) Km-4, e) Km-5 e f) Km-6, em meio semissintético contendo glicose como fonte de carbono a 45 °C e agitação de 150 rpm.

Devido à ausência de crescimento das linhagens Km-7 e Km-8 e aos baixos consumo de glicose e produção de etanol pela linhagem Km-4, estas leveduras não foram empregadas na etapa posterior do processo de seleção. Desta forma, a etapa seguinte foi realizada com as linhagens Km-1, Km-2, Km-3, Km-5 e Km-6 também a 45 °C, visando avaliar o efeito da agitação sobre a produção de etanol por estas leveduras. Os resultados obtidos com a agitação rotatória de 100 rpm estão apresentados na Figura 5.2.

De maneira semelhante ao ensaio com agitação de 150 rpm, observa-se que, empregando a agitação de 100 rpm, as cinco leveduras avaliadas consumiram toda a glicose disponível no meio em apenas 8 horas. Este tempo também foi o ponto de máxima produção de etanol para todas as linhagens, que apresentaram perfis semelhantes de crescimento e produção de etanol. Verifica-se na Figura 5.2 que a linhagem Km-2 foi a que apresentou a menor concentração de etanol (12,94 g/L), enquanto a levedura Km-5 foi a que apresentou maior concentração de etanol (14,68 g/L). Nota-se ainda que nenhuma das linhagens ultrapassaram o valor de 20 unidades de DO_{600} , o que corresponde a uma concentração celular de, aproximadamente, 3,5 g/L.

Figura 5.2: Produção de etanol por diferentes linhagens de *K. marxianus* a) Km-1, b) Km-2, c) Km-3, d) Km-5, e e) Km-6, em meio semissintético contendo glicose como fonte de carbono a 45 °C e agitação de 100 rpm.

A Tabela 5.1 apresenta os parâmetros fermentativos durante o cultivo das diferentes linhagens de *K. marxianus* sob as condições de agitação avaliadas.

Tabela 5.1 – Parâmetros fermentativos e produção de etanol das linhagens de *K. marxianus* a 45 °C sob diferentes condições de agitação em meio contendo glicose como fonte de carbono.

Linhagem	Agitação (rpm)	$\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g/g)	η (%)	Q_P (g/L.h)
Km-1	150	0,35	0,25	49,0	1,59
	100	0,25	0,33	64,7	1,83
Km-2	150	0,27	0,25	49,0	1,57
	100	0,22	0,31	60,8	1,62
Km-3	150	0,26	0,27	52,9	1,73
	100	0,29	0,31	60,8	1,66
Km-5	150	0,24	0,23	45,1	1,47
	100	0,27	0,35	68,6	1,96
Km-6	150	0,26	0,25	49,0	1,20
	100	0,28	0,33	64,7	1,97

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.1, pode-se observar que a menor condição de agitação (100 rpm) favoreceu a conversão de glicose em etanol para as cinco linhagens avaliadas. Verifica-se que os maiores valores de produtividade volumétrica em etanol foram obtidos quando a agitação foi de 100 rpm para as linhagens Km-1, Km-5 e Km-6, que apresentaram Q_P de 1,83, 1,96 e 1,97 g/L.h, respectivamente. A linhagem Km-3 foi a única que apresentou um maior valor de Q_P na agitação de 150 rpm. Com relação à velocidade máxima de crescimento específico ($\mu_{\text{máx}}$) nota-se um comportamento diferente entre as linhagens avaliadas. Enquanto que para Km-1 e Km-2 o valor de $\mu_{\text{máx}}$ decresceu ao empregar a menor agitação, para as linhagens Km-3, Km-5 e Km-6 este parâmetro aumentou. Vale destacar que a levedura Km-5 foi a que apresentou maior influência com a variação da velocidade de agitação, apresentando um aumento de 52 % de eficiência quando a agitação decresceu de 150 para 100 rpm. Nesta condição, a linhagem Km-5 alcançou o maior valor de eficiência observado em todos os ensaios (68,6%). Este resultado mostra a importância da condição de oxigenação sobre a produção de etanol, a qual foi melhor investigada em uma etapa posterior.

Com base nos parâmetros fermentativos ($Y_{P/S}$ e Q_P), pode-se inferir que as cinco leveduras (Km-1, Km-2, Km-3, Km-5 e Km-6) apresentam potencial para a fermentação

de glicose a etanol na temperatura de 45 °C, o que as tornam candidatas potenciais para a utilização no processo de sacarificação e fermentação de matérias-primas lignocelulósicas.

Para dar continuidade aos trabalhos propostos foi selecionada a linhagem Km-5 (*K. marxianus* NRRL Y-6860) por apresentar a maior eficiência de conversão de glicose em etanol. Esta linhagem foi isolada a partir de uma bebida alcoólica equatoriana feita de banana, e identificada como *K. marxianus* por sequenciamento de rDNA 26S (ARS/USDA, 2011), a qual foi gentilmente cedida para a realização deste trabalho.

5.2. Efeito da agitação e aeração sobre a produção de etanol

A etapa anterior de seleção da levedura revelou que os parâmetros fermentativos de *K. marxianus* NRRL Y-6860 foram dependentes do nível de oxigenação do meio, o qual foi avaliado pela variação da velocidade de agitação. Visando definir melhores condições para o processo de bioconversão de glicose em etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860, foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com três repetições no ponto central, estudando a variação da velocidade de agitação em combinação com o grau de aeração (relação $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$). As respostas avaliadas foram os parâmetros de fermentação Q_P , $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, $\mu_{\text{máx}}$, $Y_{P/X}$ e η .

A Tabela 5.2 apresenta os parâmetros fermentativos obtidos nos ensaios do planejamento experimental para avaliar o efeito da agitação e aeração sobre a produção de etanol de *K. marxianus* NRRL Y-6860 a 45 °C.

Verifica-se que nas condições de menor agitação e aeração (ensaio 1) tanto o fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$) quanto a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) apresentaram os maiores valores, 0,44 g/g e 3,63 g/L.h, respectivamente. Nestas condições foi também observada uma menor conversão de substrato em célula (0,050). Nota-se ainda que quando foram empregadas as maiores condições de agitação e aeração (ensaio 4) a conversão de substrato em célula foi favorecida em detrimento da produção de etanol. Uma comparação entre os resultados obtidos no ensaio 1 e no ensaio 4 mostra que a condição de menor agitação e aeração proporcionou um ganho 45% no fator de conversão de glicose em etanol, 69% no fator de conversão de célula em produto e 42% na produtividade volumétrica em etanol.

Tabela 5.2 - Planejamento fatorial do tipo 2^2 para a avaliação do efeito da agitação e aeração sobre os parâmetros fermentativos de *K. marxianus* NRRL Y-6860 a 45 °C.

Ensaio	Níveis		Q _P (g/L.h)	Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	μ _{máx} (h ⁻¹)	Y _{PX} (g/g)	η (%)
	A	B						
1	100	2,5	3,63	0,44	0,050	0,25	8,8	86,3
2	200	2,5	3,06	0,37	0,066	0,27	6,2	72,5
3	100	5	3,35	0,39	0,068	0,27	5,6	76,5
4	200	5	2,09	0,24	0,089	0,28	2,7	47,1
5	150	3,75	2,97	0,35	0,075	0,26	5,0	68,6
6	150	3,75	3,11	0,36	0,070	0,25	5,1	70,6
7	150	3,75	3,04	0,37	0,071	0,25	5,3	72,5

A = Agitação (rpm); B= Razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$. Q_P calculado para 6 horas.

O perfil cinético de *K. marxianus* NRRL Y-6860 sob as diferentes condições avaliadas estão mostrados na Figura 5.3. Observa-se que, para todas as condições avaliadas, a glicose disponível no meio foi totalmente consumida em apenas 6 horas de fermentação, exceto para a condição de menor agitação e aeração (ensaio 1) que apresentou um residual de 3,2 g/L de glicose (Figura 5.3a). Nota-se ainda que a levedura atingiu a fase estacionária após 6 horas de fermentação, apresentando neste tempo a máxima concentração de etanol em todas as condições avaliadas. Comparando o perfil cinético de *K. marxianus* NRRL Y-6860 obtido nas condições de menor agitação e aeração (ensaio 1) com as condições de maior agitação e aeração (ensaio 4), nota-se que no ensaio 1 a produção de etanol foi favorecida em detrimento da produção de células. A máxima produção de etanol foi 21,53 g/L, enquanto no ensaio 4 este valor decresceu para 12,54 g/L. Os perfis cinéticos obtidos nos demais ensaios (Figura 5.3b, 5.3c e 5.3e) foram muito semelhantes, os quais apresentaram valores de, aproximadamente, 19 g/L de etanol.

Figura 5.3: Produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860 em diferentes condições de agitação e aeração **a)** Ensaio 1 (100 rpm, $V_f/V_m=2,5$), **b)** Ensaio 2 (200 rpm, $V_f/V_m=2,5$), **c)** Ensaio 3 (100 rpm, $V_f/V_m=5$), **d)** Ensaio 4 (200 rpm, $V_f/V_m=5$), e **e)** Média dos Ensaios 5,6 e 7 (150 rpm, $V_f/V_m=3,75$), em meio semissintético contendo glicose como fonte de carbono a 45 °C.

A significância estatística dos principais efeitos das variáveis agitação e aeração, assim como suas interações sobre os parâmetros fermentativos ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$ e Q_P) foram determinadas pelo teste t de Student, a 95% de confiança e erro com 2 graus de liberdade ($t = 3,18$).

Nos gráficos de Pareto (Figura 5.4 a, b, c e d), estão apresentadas as estimativas dos efeitos, para $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$ e Q_P , respectivamente. São significativos os termos cujos valores de t calculado (representado pelas barras no gráfico de Pareto) apresentam-se superiores ao valor de t tabelado (representado pela linha tracejada do gráfico).

Figura 5.4: Estimativa dos efeitos A (agitação, rpm) e B ($V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$) e da sua interação AB ao nível de 95 % de confiança pelo gráfico de Pareto para as respostas a) $Y_{X/S}$, b) $Y_{P/S}$, c) $Y_{P/X}$ e d) Q_P .

Verifica-se na Figura 5.4 que, para todas as respostas avaliadas, os efeitos principais das variáveis agitação (A) e aeração (B) foram significativos ao nível de 95% de confiança, enquanto que o efeito de interação (AB) foi significativo apenas para as respostas produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$). Observa-se também que as variáveis A e B mostraram influências distintas sobre as respostas analisadas. Enquanto o efeito da agitação e da aeração foi positivo para

o fator de conversão em células ($Y_{X/S}$), para as respostas relacionadas com o produto ($Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$ e Q_P) estes efeitos foram negativos, indicando que a produção de etanol foi favorecida quando a agitação e a aeração foram diminuídas.

Para confirmar a significância estatística dos efeitos principais e de suas interações sobre os parâmetros fermentativos no processo de bioprodução de etanol foi realizada a análise da variância dos efeitos (Tabelas 5.3 a 5.6). Uma análise de variância com estimativa de curvatura foi também realizada para todas as respostas estudadas e revelou que, a 95% de confiança, este parâmetro apresentou significância estatística apenas para a resposta $Y_{P/X}$. Entretanto, o coeficiente de correlação permaneceu com um valor aceitável ($R^2=0,96$) mesmo quando este parâmetro foi desprezado, devido à pequena contribuição da curvatura sobre a explicação desta resposta (4,1%). Isto significa que, na região em estudo, todas as respostas ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$ e Q_P) podem ser explicadas por modelos lineares.

Tabela 5.3: Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$).

Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Y_{X/S}$ (g/g)	A	0,000342	1	0,000342	26,944	0,013887*	42,4
	B	0,000420	1	0,000420	33,084	0,010440*	52,0
	AB	0,000006	1	0,000006	0,492	0,533539	0,7
	Erro	0,000038	3	0,000013			4,7
$R^2=0,95$	Total	0,000807	6				

A= Agitação; B= Razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; * Significante ao nível de 95 % de confiança.

Tabela 5.4: Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$).

Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Y_{P/S}$ (g/g)	A	0,0121	1	0,012100	181,5000	0,000884*	55,0
	B	0,0081	1	0,008100	121,5000	0,001599*	36,8
	AB	0,0016	1	0,001600	24,0000	0,016277*	7,3
	Erro	0,0002	3	0,000067			0,9
$R^2=0,99$	Total	0,0220	6				

A= Agitação; B= Razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; * Significante ao nível de 95 % de confiança.

Tabela 5.5: Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre o fator de conversão de célula em produto ($Y_{P/X}$).

Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Y_{P/X}$ (g/g)	A	7,5625	1	7,56250	26,89413	0,013922*	38,5
	B	11,222	1	11,22250	39,90999	0,008017*	57,1
	AB	0,0225	1	0,02250	0,08002	0,795671	0,1
	Erro	0,8436	3	0,28120			4,3
$R^2=0,96$	Total	19,6511	6				

A= Agitação; B= Razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; * Significante ao nível de 95 % de confiança.

Tabela 5.6: Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produtividade em etanol (Q_P).

Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
Q_P (g/L.h)	A	0,8372	1	0,837225	253,7961	0,000538*	61,7
	B	0,3906	1	0,390625	118,4139	0,001661*	28,8
	AB	0,1190	1	0,119025	36,0812	0,009243*	8,8
	Erro	0,0099	3	0,003299	253,7961	0,000538	0,7
$R^2=0,99$	Total	1,3568	6				

A= Agitação; B= Razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; * Significante ao nível de 95 % de confiança.

Verifica-se na análise de variância (Tabelas 5.3 a 5.6) que, para todas as respostas avaliadas ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$ e Q_P), os coeficientes de correlação (R^2) foram superiores a 0,95, permitindo, portanto, a obtenção de modelos matemáticos que descrevem as respostas dentro da região estudada. Estes modelos estão apresentados na forma das Equações 5.1 a 5.4.

$$Y_{X/S} = 0,070 + 0,018A + 0,020B \quad (5.1)$$

$$Y_{P/S} = 0,360 - 0,110A - 0,090B - 0,040AB \quad (5.2)$$

$$Y_{P/X} = 5,531 - 2,750A - 3,350B \quad (5.3)$$

$$Q_p = 3,036 - 0,915A - 0,625B - 0,345AB \quad (5.4)$$

A partir das equações obtidas pelo modelo linear foi possível construir curvas de nível que mostram o comportamento de cada resposta em função de cada variável estudada (Figura 5.5). Observa-se que a conversão em células (Figura 5.5 a) foi o único parâmetro influenciado positivamente pela combinação dos maiores níveis de agitação e aeração. Os parâmetros $Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$ e Q_P (Figura 5.5 b, c e d, respectivamente) foram influenciados negativamente pelo aumento dos fatores estudados, indicando que uma maior condição de aeração e agitação não são favoráveis para a produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860.

Figura 5.5: Curvas de nível que correlacionam os parâmetros fermentativos a) $Y_{X/S}$, b) $Y_{P/S}$, c) $Y_{P/X}$ e d) Q_P com a agitação e aeração ($V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$).

Kiers et al. (1998) demonstraram que a produção de etanol em reator a partir de glicose por uma levedura do gênero *Kluyveromyces* (*K. lactis* CBS 2359) foi completamente inibida quando o cultivo em batelada foi realizado sob elevada concentração de oxigênio dissolvido (acima de 40 % de saturação). Ainda segundo os

autores, esta levedura foi capaz de produzir etanol quando cultivada em frascos agitados sob limitação de oxigênio. Rodrussamee et al. (2011) estudando a fisiologia de *K. marxianus* DMKU3-1042 em diferentes condições de cultivo também observaram que, na temperatura de 45 °C, o fator de conversão de glicose em etanol foi influenciado pela agitação empregada, em que foi obtido $Y_{P/S}$ de 0,51 g/g na fermentação sem agitação (estática) e 0,48 g/g sob 160 rpm. Entretanto, os autores verificaram que, para esta linhagem, a produtividade volumétrica em etanol diminuiu de 0,83 g/L.h para 0,21 g/L.h quando a fermentação foi conduzida sob condições estáticas. Este comportamento foi diferente ao observado no presente trabalho, em que a menor condição de oxigenação favoreceu tanto a conversão de glicose em etanol quanto a produtividade volumétrica. De fato, Lane e Morrissey (2010) já haviam relatado que o efeito da disponibilidade de oxigênio sobre a produção de etanol pode variar entre linhagens de *K. marxianus*.

O presente estudo mostrou que a velocidade de agitação e o grau de aeração ($V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$) são fatores capazes de interferir significativamente nos parâmetros fermentativos de *K. marxianus* NRRL Y-6860. Portanto, a disponibilidade de oxigênio é um fator ambiental importante na fermentação de glicose por esta linhagem de levedura, afetando tanto a conversão quanto a produtividade em etanol, pois o nível de oxigenação determina a divisão do fluxo de carbono da glicose entre o crescimento e a formação de produto.

Dentro da faixa de agitação e aeração estudada, a melhor condição para produção de etanol a partir de glicose por *K. marxianus* NRRL Y-6860 foi aquela correspondente aos menores níveis, com agitação de 100 rpm e uma razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ de 2,5 (50 mL de meio em frasco Erlenmeyer de 125 mL). Os fatores de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$), de conversão de célula em etanol ($Y_{P/X}$) e a produtividade volumétrica em etanol (Q_p) para estas condições foram de 0,44 g/g, 8,8 g/g e 3,63 g/L.h, respectivamente.

5.2.1. Potencial fermentativo de *K. marxianus* NRRL Y-6860 com elevada concentração de glicose

Para verificar a capacidade da levedura previamente selecionada em fermentar elevadas concentrações de glicose, foi realizado um ensaio preliminar em meio

semissintético contendo uma concentração inicial de cerca de 110 g/L de glicose (Figura 5.6).

Verifica-se que a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860 foi capaz de produzir etanol a partir de uma alta concentração inicial de glicose, indicando que, aparentemente, esta condição inicial de substrato não exerceu efeito inibitório sobre este micro-organismo. Em 12 horas de fermentação observa-se que a levedura produziu aproximadamente 40 g/L de etanol e que a biomassa celular atingiu cerca de 3,5 g/L. Nota-se ainda que a concentração residual de glicose foi de 20 g/L. O consumo incompleto de glicose por *K. marxianus* NRRL Y-6860 nas condições empregadas pode ser devido a três fatores: 1) a concentração de etanol alcançada (cerca de 40 g/L) exerceu um efeito inibitório no metabolismo da levedura; 2) a concentração de nutrientes presentes no início da fermentação não estava equilibrada com a concentração inicial de glicose; 3) diminuição da solubilidade do oxigênio pela elevada temperatura e concentração de glicose empregadas.

Figura 5.6: Perfil da fermentação de *K. marxianus* NRRL Y-6860 em meio semissintético contendo 112 g/L de glicose em temperatura de 45 °C e 100 rpm de agitação rotatória.

Nas condições do ensaio, os parâmetros fermentativos de *K. marxianus* NRRL Y-6860 foram: $Y_{P/S} = 0,42$ g/g; $Y_{X/S} = 0,03$ g/g; $Q_P = 3,24$ g/L.h. O valor de produtividade volumétrica em etanol obtido no presente trabalho é comparável ao observado para

linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, conforme relatado por Lu et al. (2011). Segundo os autores, a linhagem *S. cerevisiae* CE25 apresentou valores de produtividade volumétrica em etanol de 3,30 g/L.h a partir de 100 g/L de glicose. Também, no trabalho de Pereira et al. (2011) foi reportado uma produtividade volumétrica em etanol de 2,51 e 2,53 g/L.h a partir de 340 g/L de glicose, para as linhagens *S. cerevisiae* PE-2 e CA1185, respectivamente, ambas isoladas de destilarias brasileiras.

Rosa e Sá-Correia (1992), trabalhando com diferentes linhagens de *K. marxianus*, encontraram menor tolerância a etanol quando comparada à *S. cerevisiae*, com variação entre as linhagens avaliadas, e relacionaram o efeito inibitório à atividade da ATPase de membrana. Como o efeito de inibição parece variar entre linhagens de *K. marxianus*, estudos mais aprofundados ainda são necessários para elucidar a tolerância de *K. marxianus* NRRL Y-6860 ao etanol.

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860 apresenta elevada capacidade fermentativa, a qual pode ser ainda melhorada através de estudos de otimização do nível de oxigenação, necessidades nutricionais e nível de inóculo em concentrações de glicose superiores a 100 g/L.

5.3. Obtenção e caracterização da celulignina da palha de arroz

A celulignina utilizada no presente trabalho foi obtida após o pré-tratamento da palha de arroz com ácido diluído conforme as condições descritas no item 4.3.2 da seção material e métodos.

A fração líquida resultante deste pré-tratamento apresentou a seguinte composição de açúcares, em g/L: glicose ($2,47 \pm 0,005$), xilose ($14,03 \pm 0,005$), arabinose ($2,42 \pm 0,02$). Este hidrolisado hemicelulósico, com maior proporção de pentoses, pode ser utilizado como substrato para obtenção de diferentes substâncias de valor agregado por processos biotecnológicos, incluindo xilitol e etanol (ROBERTO et al., 1996).

Após sucessivas lavagens da celulignina, esta foi seca até que o teor de umidade fosse menor que 10 %. A Figura 5.7 mostra o aspecto da palha de arroz antes e após o pré-tratamento com ácido diluído.

Figura 5.7: (A) Palha de arroz antes do pré-tratamento. (B) Celulignina obtida após o pré-tratamento com ácido diluído.

A composição da palha de arroz antes e após o pré-tratamento (celulignina) está apresentada na Tabela 5.7. Observa-se que o pré-tratamento da palha de arroz com ácido sulfúrico diluído resultou em um maior teor de celulose no material sólido resultante. A diferença nos valores percentuais de celulose e lignina deve-se prioritariamente à remoção da hemicelulose da palha de arroz, alterando assim a proporção dos constituintes estruturais da celulignina.

Tabela 5.7 - Composição da palha de arroz antes e após o pré-tratamento com ácido diluído.

Componente	Composição (g/100g)	
	Antes do pré-tratamento (palha de arroz)	Após o pré-tratamento (celulignina)
Celulose	35,10 ± 0,61	54,94 ± 0,50
Hemicelulose	25,94 ± 0,51	8,13 ± 0,16
Grupos Acetil	1,50 ± 0,06	0,38 ± 0,01
Lignina Solúvel	5,13 ± 0,02	2,34 ± 0,01
Lignina insolúvel	14,73 ± 2,85	22,59 ± 0,18
Cinzas	9,75 ± 0,04	8,00 ± 0,20
Outros*	7,85	3,62

*Calculado por diferença.

De fato, a hemicelulose foi o componente estrutural da palha de arroz que sofreu o maior efeito do pré-tratamento com H_2SO_4 diluído, o que já era esperando, uma vez que este pré-tratamento visa, principalmente, a solubilização e remoção seletiva da fração hemicelulósica contida em materiais lignocelulósicos (NEUREITER et al., 2002). Apesar disso, nas condições experimentais empregadas, a celulignina ainda apresentou 8,13% de hemicelulose. Nota-se, também, que o teor de celulose somado ao teor de lignina da palha pré-tratada resultou em aproximadamente 80% do teor total, justificando a utilização do termo “celulignina” para identificar este material.

Com relação às frações referentes aos grupos acetil e à lignina solúvel, nota-se que após o pré-tratamento estas frações decresceram de 1,5 para 0,38% e de 5,13 para 2,34%, respectivamente, indicando que a maior parte se solubilizou na fração líquida hemicelulósica.

A Tabela 5.8 apresenta a composição da palha de arroz pré-tratada em outros trabalhos da literatura, assim como aquela obtida no presente trabalho. Todos os trabalhos listados nesta tabela utilizaram o pré-tratamento com ácido diluído com o objetivo de favorecer uma posterior etapa de hidrólise enzimática.

Tabela 5.8 - Composição da palha de arroz pré-tratada com ácido diluído.

Componente (g/100g)	Presente trabalho ¹	2	3	4
Celulose	54,5	53,4	45,2	43,2
Hemicelulose	8,1	1,7	2,7	3,4
Lignina	24,9	21,3	20,8	nd

¹ H_2SO_4 10 % (p/p), 126 °C, 30 minutos.

² Hsu et al. (2010), H_2SO_4 1 % (p/p), 180 °C, 1 minuto.

³ Chen et al. (2011), explosão a vapor com H_2SO_4 1 % (p/p), 180 °C, 2 minutos.

⁴ Vlasenko et al. (1997), H_2SO_4 0,8% (p/p), 160 °C, 10 minutos.

nd = não determinado.

Observa-se na Tabela 5.8 que os teores de celulose, hemicelulose e lignina obtidos no presente trabalho foram maiores que aqueles reportados nos trabalhos listados. Esta diferença pode estar relacionada às condições de pré-tratamento empregadas, como concentração de ácido, tempo de residência e temperatura.

A presença de hemicelulose e lignina retida no material pré-tratado é um fator que pode influenciar negativamente a posterior hidrólise enzimática da celulose, tanto por atuar como uma barreira física que restringe o acesso das celulasas ao substrato, bem como por adsorção improdutiva das enzimas celulolíticas à lignina (BERLIN et al., 2005). De acordo com Chandra et al. (2007), a remoção parcial da hemicelulose aumenta o tamanho médio dos poros do substrato lignocelulósico, e, portanto, aumenta a acessibilidade e a probabilidade da celulose ser hidrolisada enzimaticamente. De fato, Mussatto et al. (2008), empregando bagaço de malte, mostraram que a remoção parcial da hemicelulose por H_2SO_4 diluído (de 28,4 para 7,9 %) influenciou positivamente o rendimento de hidrólise. Os autores alcançaram um aumento no rendimento de hidrólise de 274 % empregando a celulignina de bagaço de malte pré-tratada em substituição ao material não tratado. No presente trabalho, o pré-tratamento com H_2SO_4 diluído proporcionou uma remoção semelhante da hemicelulose (de 25,9 para 8,1 %).

De acordo com Mussatto e Roberto (2004), o pré-tratamento com ácido diluído, além de solubilizar a fração hemicelulósica, também produz vários compostos inibitórios ao metabolismo microbiano, como os produtos de degradação de açúcares (hidroximetilfurfural, furfural e ácido fórmico) e de lignina (vanilina, siringaldeído e ácido ferúlico). Com o objetivo de avaliar o efeito da lavagem da celulignina sob a remoção dos inibidores que são formados durante o pré-tratamento com ácido diluído, amostras do hidrolisado do pré-tratamento e da solução de 8 % (m/v) de celulignina previamente lavada foram analisadas quanto aos teores de fenólicos totais e dos produtos de degradação de açúcares, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 – Concentração de inibidores no hidrolisado do pré-tratamento e na solução com teor de 8 % (m/v) de celulignina previamente lavada.

Inibidores	Hidrolisado do pré-tratamento	Celulignina 8 % (m/v)
Fenólicos totais (g/L)	3,88	0,03
HMF (g/L)	0,079	< 0,001
Furfural (g/L)	0,073	< 0,001

Verifica-se que após a lavagem da celulignina apenas traços dos compostos avaliados foram encontrados. Estes resultados revelaram que a lavagem da celulignina

removeu eficientemente os compostos que atuam como inibidores do metabolismo microbiano. Oliva et al. (2003) observaram uma inibição do crescimento de *K. marxianus* CECT 10875 em meio contendo 2 g/L de furfural. Segundo os autores, o furfural prolongou a fase lag da levedura até a sua completa redução em seu álcool correspondente. Taherzadeh et al. (2000) reportaram uma inibição do crescimento de *S. cerevisiae* em 72% na presença de 2 g/L de hidroximetilfurfural e 2 g/L de furfural, e de 93% na presença de 4 g/L de furfural. Portanto, como no presente trabalho foram encontradas concentrações de HMF, furfural e fenólicos totais bem inferiores às aquelas reportadas por inibir o crescimento de leveduras, foi assumido que a celulignina a ser empregada na etapa de fermentação não apresenta características tóxicas ao metabolismo microbiano.

5.4. Determinação das condições de hidrólise enzimática da celulignina

Esta etapa visou definir a carga enzimática de extratos comerciais para hidrolisar a celulose presente na celulignina da palha de arroz obtida conforme mostrado no item 4.5 da seção material e métodos. Para isso, utilizou-se dois extratos enzimáticos comerciais, Cellubrix e Novozyme 188, cuja caracterização quanto ao teor de proteínas e à atividade de celulase total e de β -glicosidase estão apresentados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Determinação das atividades enzimáticas e teor de proteínas

	Cellubrix	Novozyme 188
<i>Celulase total (FPU/mL)</i>	40,22	nd
<i>β-glicosidase (UI/mL)</i>	133,0	640,0
<i>Proteínas (mg/mL)</i>	30,4 $\pm$ 0,9	67,2 $\pm$ 0,5

nd = não determinado

Um dos extratos comerciais de celulasas mais empregados na hidrólise de materiais lignocelulósicos é o Celluclast 1.5 L da empresa Novozymes (Dinamarca), como pode ser observado em diversos trabalhos na literatura reportando a hidrólise enzimática de diferentes materiais como bagaço de malte (MUSSATTO et al., 2008a), palha de milho

(ÖHGREN et al., 2007), palha de trigo (SAHA et al., 2005), bagaço de cana-de-açúcar (MARTÍN et al., 2002) e palha de arroz (VLASENKO et al., 1997; KO et al., 2009). O extrato Celluclast 1.5 L é obtido a partir do cultivo do fungo *Trichoderma reesei*, o qual possui baixa atividade de β -glicosidase (celobiase), necessitando assim de uma suplementação desta enzima (PRYOR; NAHAR, 2010). O extrato comercial Cellubrix empregado neste trabalho, também da empresa Novozymes, é formado a partir da Celluclast 1.5 L por adição de celobiase (DRISSEN et al., 2007). De fato, verifica-se na Tabela 5.10 que o extrato enzimático Cellubrix já possui atividade de β -glicosidase (133 UI/mL). No entanto, este valor é cerca de 5 vezes menor que o observado no extrato Novozyme 188 (640 UI/mL), o qual é obtido a partir do cultivo do fungo *Aspergillus niger*.

Verifica-se ainda na Tabela 5.10 que os valores de atividade enzimática e teor de proteína para os extratos comerciais Cellubrix e Novozyme 188 estão de acordo com a literatura. Drissen et al. (2009) reportaram que o extrato Cellubrix possui atividade de 56,0 FPU/mL de celulase total, 138,0 UI/mL de β -glicosidase e teor de proteína de 32,2 mg/mL. García-Aparício et al. (2011) encontraram atividade de β -glicosidase de 664 UI/mL e teor de proteína de 82,8 mg/mL para o extrato Novozyme 188, e verificaram que a atividade de celulase total é muito baixa (0,23 FPU/mL), uma vez que este extrato não possui quantidades significativas de endo e exo-glucanases.

O efeito da carga de Cellubrix sobre a hidrólise enzimática da celulignina de palha de arroz está apresentado na Figura 5.8. Nota-se que o aumento gradual da carga de Cellubrix de 10 para 40 FPU/g proporcionou um maior rendimento de hidrólise. Em relação ao tempo de 24 horas, observa-se que o rendimento de hidrólise aumentou de 22 para 36 % quando a carga de enzima passou de 10 para 25 FPU/g e que na carga de 40 FPU/g foi obtido um rendimento de 42 %.

Figura 5.8: Perfil cinético da hidrólise enzimática de 8% (m/v) de celulignina em três diferentes dosagens de Cellubrix (10, 25 e 40 FPU/g) sem suplementação com Novozyme 188.

Mussatto et al. (2008a), trabalhando com bagaço de malte (8 % m/v) pré-tratado por ácido diluído, também mostraram que o aumento na carga enzimática proporcionou um maior rendimento de hidrólise. Estes autores utilizaram o extrato enzimático Celluclast 1.5 L e reportaram um aumento de 25,9 % para 73,8 % no rendimento de hidrólise quando a carga da enzima passou de 5 para 45 FPU/g. Este aumento de 9 vezes na carga da enzima proporcionou um incremento de 185 % no rendimento de hidrólise, enquanto no presente trabalho foi obtido um incremento de 90 % com um aumento de 4 vezes na carga enzimática (10 para 40 FPU/g). Esta diferença pode estar relacionada às características particulares do substrato empregado e do tipo de enzima.

Verifica-se ainda na Figura 5.8 a existência de três fases distintas durante a reação de hidrólise. A primeira delas, a qual é caracterizada pela maior velocidade de reação, apresentou uma duração de 6 horas, enquanto que a segunda fase, caracterizada pela diminuição da velocidade de hidrólise, a duração foi de 4 horas. Após este tempo, caracterizando uma terceira fase, a liberação de glicose praticamente não varia com o tempo, em que a celulose é considerada inacessível ou recalcitrante. Este comportamento pode ser explicado pelo fato que as celulasas degradam rapidamente a celulose amorfa, mais acessível, a qual, com o progresso da reação de hidrólise, torna-se mais resistente à

degradação enzimática, diminuindo assim a taxa de conversão (GREGG; SADDLER, 1996).

O efeito da suplementação do extrato Cellubrix com diferentes proporções de Novozyme 188 foi também avaliado, e os resultados estão apresentados na Figura 5.9 e 5.10.

Figura 5.9: Perfil cinético da hidrólise enzimática de 8% (m/v) de celulignina em três diferentes dosagens de Cellubrix (10, 25 e 40 FPU/g) sem suplementação e com suplementação de Novozyme 188 na proporção 1:1.

Verifica-se que a suplementação de Cellubrix com Novozyme 188 (na relação de 1:1) proporcionou um aumento médio de 20 % no rendimento de hidrólise da celulignina quando comparado aos ensaios não suplementados (Figura 5.9). Nota-se que os maiores valores de rendimento de hidrólise (acima de 50 %) foram obtidos com a carga de 25:25 e 40:40 (FPU/g:UI/g).

A Figura 5.10 mostra o rendimento de hidrólise da celulignina empregando Cellubrix suplementada com Novozyme 188 nas proporções de 1:1, 1:4 e 4:1. Observa-se que a proporção de 1:1 (25:25 e 40:40 FPU/g:UI/g) entre Cellubrix e Novozyme 188 foram mais eficientes na hidrólise da celulignina que as proporções de 1:4 e 4:1 (10:40 e 40:10 FPU/g:UI/g), respectivamente. O perfil cinético de hidrólise na carga de 40 FPU/g e 10 UI/g foi muito semelhante ao obtido com carga de 10 FPU/g e 10 UI/g, mostrando que um excesso da atividade de Cellubrix não proporcionou um aumento no rendimento de hidrólise.

Figura 5.10: Perfil cinético da hidrólise enzimática de 8% (m/v) de celulignina de palha de arroz empregando o extrato Cellubrix suplementado com Novozyme 188 em diferentes proporções (1:1, 1:4 e 4:1).

Nota-se também que, inicialmente, o perfil cinético de hidrólise na carga de 10 FPU/g e 40 UI/g foi semelhante aos ensaios com carga de 25:25 e 40:40, mas que, após 8 horas, a taxa de hidrólise diminuiu aproximando-se mais do perfil obtido em cargas de 40:10 e 10:10. Este resultado mostra que o excesso de β -glicosidase proporcionou maior velocidade inicial, mas não foi capaz de sustentar a mesma velocidade de hidrólise obtida em maiores cargas de Cellubrix.

Os resultados ainda indicam que, apesar do extrato Cellubrix possuir atividade de β -glicosidase, é necessário complementá-lo com uma fonte extra desta enzima para obter maiores rendimentos de hidrólise a partir da celulignina de palha de arroz. Varga et al. (2003) também verificaram que uma adição extra de β -glicosidase no extrato Cellubrix foi necessária para alcançar maiores rendimentos de hidrólise em palha de milho pré-tratada por oxidação úmida. Um aumento de aproximadamente 35% no rendimento de hidrólise foi obtido quando o extrato Cellubrix foi suplementado com Novozyme 188, com carga total de 25 FPU/g de material. Entretanto os autores não descrevem qual foi a carga extra de β -glicosidase empregada.

Em relação aos ensaios na proporção de 1:1 entre Cellubrix e Novozyme 188 que apresentaram os melhores resultados de conversão enzimática, verifica-se que o rendimento de hidrólise em 24 horas passou de 54,8 para 59,8% quando a carga foi aumentada de 25 FPU e 25 UI/g para 40 FPU e 40 UI/g. É importante ressaltar que a

utilização de uma alta carga de enzimas pode contribuir significativamente com os custos do processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. De acordo com os cálculos técnico-econômicos realizados por Sassner, Galbe e Zacchi (2007), uma redução de 50% na carga enzimática é benéfica para o processo de conversão do material lignocelulósico em etanol desde que o rendimento de hidrólise não diminua mais do que 7% e o tempo de residência não aumente mais do que 30%.

No presente trabalho, visando reduzir os custos do processo, buscou-se optar pela carga enzimática que apresentasse a melhor relação custo-benefício. Assim, considerando os custos associados ao aumento da carga enzimática (60 %) e a pequena diferença entre os rendimentos de hidrólise (5 %), foi escolhida a condição de 25 FPU de Cellubrix e 25 UI de Novozyme 188 por grama de substrato para realização dos ensaios de sacarificação da celulignina de palha de arroz.

5.5. Ensaios de sacarificação e fermentação da celulignina por *K. marxianus* NRRL Y-6860

A partir dos resultados anteriores, que definiram a levedura termotolerante (*K. marxianus* NRRL Y-6860), as condições da fermentação (agitação de 100 rpm e 50 mL de meio em frasco Erlenmeyer de 125 mL) e a carga de enzimas (25 FPU Cellubrix e 25 UI de Novozyme 188 por grama de substrato), ensaios de sacarificação e fermentação foram realizados com a celulignina de palha de arroz empregando duas estratégias: (1) hidrólise e fermentação em separado (*SHF*, do inglês *Separate Hydrolysis and Fermentation*); (2) sacarificação e fermentação simultânea (*SSF*, do inglês *Simultaneous Saccharification and Fermentation*); de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 4.2 da seção material e métodos.

5.5.1. Hidrólise e fermentação em separado (*SHF*)

Nesta etapa, a celulignina foi previamente hidrolisada por 12 horas e, após este tempo, foram realizados dois ensaios: 1) *SHF_A*, em que a inoculação da levedura foi

realizada na presença das enzimas ativas e 2) SHF_i , em que a inoculação ocorreu após as enzimas serem inativadas por calor. Nesta etapa também foi avaliado o efeito de um maior teor de sólidos (12 % m/v) sobre a produção de etanol por SHF_A .

A Figura 5.11 mostra os resultados obtidos durante os ensaios de SHF sem e com inativação das enzimas (SHF_A e SHF_i , respectivamente). Nota-se que, para ambos os ensaios de SHF avaliados, a etapa de pré-sacarificação proporcionou a liberação de aproximadamente 24 g/L de glicose em 12 horas de hidrólise enzimática, o que corresponde a cerca de 50 % de rendimento de hidrólise. Após a adição do inóculo, observa-se também um perfil semelhante no consumo de glicose e na produção de etanol pela levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860. A glicose presente no meio foi totalmente consumida em 4 horas, apresentando neste tempo a máxima produção de etanol (11,56 g/L para SHF_A e 10,70 g/L para SHF_i).

Figura 5.11: Produção de etanol por SHF com inoculação na presença de enzimas ativas (SHF_A) e com enzimas inativas (SHF_i) a partir de 8% (m/v) de celulignina empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860, com carga enzimática de Cellubrix e Novozyme 188 de 25 FPU e 25 UI/grama, respectivamente, sob 45 °C e 100 rpm.

O fator de conversão de glicose em etanol foi 0,47 g/g ($Y'_{P/S} = 0,24$ g/g) para SHF_A e 0,44 g/g ($Y'_{P/S} = 0,22$ g/g) para SHF_i , enquanto as produtividades volumétricas em etanol para SHF_A e SHF_i foram 2,89 g/L.h ($Q_{PT} = 0,72$ g/L.h) e 2,68 g/L.h e ($Q_{PT} = 0,67$ g/L.h), respectivamente.

García-Aparício et al. (2011), trabalhando com 10 % (m/v) de palha de cevada pré-tratada por explosão a vapor, também observaram uma pequena variação nos parâmetros fermentativos em experimentos de hidrólise e fermentação em separado, na presença ou na ausência de enzimas ativas (retiradas por filtração). Os autores empregaram a levedura *K. marxianus* CECT 10875 na temperatura de 42 °C e reportaram um fator de conversão de glicose potencial em etanol ($Y'_{P/S}$) de 0,25 e 0,23 g/g e uma produtividade volumétrica total em etanol (Q_{PT}) de 0,68 e 0,63 g/L.h para o processo com enzimas ativas e na ausência de enzimas, respectivamente, os quais foram muito semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

De acordo com os resultados, pode-se assumir que, nas condições avaliadas, a inativação das enzimas e a manutenção das mesmas em conjunto com os sólidos não hidrolisados não influenciaram na posterior etapa de fermentação da celulignina de palha de arroz por *K. marxianus* NRRL Y-6860. Portanto, conclui-se que a etapa de inativação da enzima antes de inocular a levedura, a qual poderia agregar um maior custo ao processo, não necessita ser realizada.

Com o objetivo de alcançar uma maior concentração de etanol durante a sacarificação e fermentação da celulignina de palha de arroz por *K. marxianus* NRRL Y-6860, também foi realizado um ensaio de SHF_A com carga de 12% (m/v) de celulignina, uma vez que, potencialmente, esta maior carga de material pode liberar uma maior concentração de glicose no meio (Figura 5.12).

Verifica-se que a etapa de pré-sacarificação proporcionou a liberação de 36,5 g/L de glicose em 12 horas, o que corresponde a cerca de 50 % de rendimento de hidrólise. Após a adição do inóculo, verifica-se que a levedura produziu cerca de 20 g/L de etanol em 8 horas, tempo em que praticamente toda a glicose foi consumida (residual de 1,2 g/L). Nas condições empregadas, os valores de produtividade volumétrica em etanol Q_P e Q_{PT} foram de 2,44 e 0,97 g/L.h, respectivamente. Os fatores de conversão de glicose em etanol foram $Y'_{P/S} = 0,26$ g/g e $Y_{P/S} = 0,53$ g/g. Embora o valor de $Y_{P/S}$ esteja um pouco acima do máximo teórico (0,51 g/g), este pode ser justificado pela dificuldade de amostragem devido à viscosidade proporcionada pela carga de 12 % (m/v), ou ainda pelo fato de que a hidrólise da celulignina não havia cessado no decorrer da fermentação, fornecendo uma maior quantidade de glicose que não foi contabilizada no cálculo de $Y_{P/S}$.

Figura 5.12: Produção de etanol por *SHF_A* a partir de 12 % (m/v) de celulignina empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860, com carga enzimática de Cellubrix e Novozyme 188 de 25 FPU/g e 25 UI/g, respectivamente, sob 45 °C e 100 rpm.

Segundo Varga et al. (2004), a concentração de etanol deve ser acima de 50 g/L para a destilação ser economicamente viável em escala industrial. Este valor só poderá ser alcançado se cerca de 100 g/L de glicose estiverem disponíveis no meio de fermentação, o que requer aumentar o teor de celulose. Entretanto, ainda segundo estes autores, o aumento no teor de sólidos usualmente diminui o rendimento de hidrólise devido às dificuldades de realizar uma mistura eficiente. No presente trabalho, mesmo aumentando a carga de sólidos de 8 para 12 % (m/v), o rendimento de hidrólise permaneceu em 50 %. Diante disso, para aumentar a concentração de glicose pode-se lançar mão de duas alternativas: 1) proporcionar um aumento na conversão enzimática da celulignina (por volta de 80 %) por meio de diferentes tipos de pré-tratamento e 2) aplicar outras formas de condução do processo fermentativo, como o processo em batelada alimentada, o qual permitirá a utilização de maiores teores de sólido.

O processo de *SHF_A* em maior teor de material (12 % m/v) mostrou que a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860 foi capaz de produzir 70 % de etanol a mais que o obtido em *SHF_A* com carga de 8% (m/v), e que o rendimento de hidrólise em 12 horas foi mantido o mesmo (50 %). Estes resultados sugerem que, nas condições avaliadas, o maior teor de sólidos favoreceu a produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860 por *SHF* a partir

da celulignina e não afetou o rendimento de hidrólise enzimática, mesmo com a dificuldade em obter uma mistura eficiente do meio.

5.5.2. Sacarificação e fermentação simultânea (SSF)

Os resultados do ensaio de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) em que o inóculo e as enzimas foram adicionados ao mesmo tempo no meio contendo a celulignina estão mostrados na Figura 5.13.

Observa-se que a concentração de glicose liberada no meio pela ação das enzimas celulolíticas se manteve baixa (menor que 0,5 g/L) durante as 24 horas da SSF, devido à elevada taxa de consumo deste carboidrato pela levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860.

Figura 5.13: Produção de etanol por SSF a partir de 8% (m/v) de celulignina empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860, com carga enzimática de Cellubrix e Novozyme 188 de 25 FPU/g e 25 UI/g, respectivamente, sob 45 °C e 100 rpm.

Nota-se ainda que a máxima concentração de etanol (aproximadamente 11 g/L) foi alcançada em 4 horas de fermentação, fornecendo um valor de produtividade volumétrica em etanol ($Q_P = Q_{PT}$) de 2,69 g/L.h e um fator de conversão de glicose potencial em etanol ($Y'_{P/S}$) de 0,24 g/g. Considerando que o rendimento de hidrólise enzimática foi de 50 %,

próximo aos valores obtidos nos ensaios de *SHF*, estima-se uma concentração de glicose disponível no meio de 24,4 g/L, o que permitiu estimar $Y_{P/S}$ em 0,47 g/g.

Ballesteros et al. (2004) estudando a sacarificação e fermentação simultânea de 10 % (m/v) de bagaço de sorgo pré-tratado por explosão a vapor, obtiveram uma concentração máxima de 16,2 g/L de etanol em 86 horas de processo empregando a levedura *K. marxianus* CECT 10875 na temperatura de 42 °C. Os autores observaram uma pequena tendência de acúmulo de glicose (abaixo de 5 g/L) a partir de 86 horas, e atribuíram este comportamento à continuidade da sacarificação do material aliada à ausência da fermentação pela levedura, a qual estaria em condição de limitação nutricional ou de inibição pela concentração de etanol obtida no processo. Embora estes autores tenham alcançado um maior valor de concentração de etanol, verifica-se que a produtividade volumétrica total em etanol (0,19 g/L.h) foi muito inferior à obtida no presente trabalho (2,69 g/L.h).

Estes resultados permitem concluir que o processo de *SSF* a partir da celulignina de palha de arroz empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860 é promissor devido à elevada produtividade volumétrica em etanol encontrada.

5.5.3. Comparação entre as estratégias de sacarificação e fermentação

Diante dos resultados obtidos nas diferentes estratégias de sacarificação e fermentação empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860, faz-se necessário realizar uma comparação entre os parâmetros fermentativos referentes a estes ensaios, os quais estão apresentados na Tabela 5.11.

Verifica-se que, independente do teor de celulignina, o rendimento de hidrólise foi aproximadamente 50 %, indicando que, nas condições avaliadas, o aumento no teor de sólidos de 8 para 12 % (m/v) não diminuiu a eficiência de hidrólise. Nota-se que a maior concentração de etanol (19,36 g/L) foi obtida no experimento de *SHF_A* com teor de 12 % (m/v) de celulignina, o qual correspondeu a um aumento de aproximadamente 70 % em relação à concentração de etanol obtida nos demais ensaios com carga de 8 % (m/v). O fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$), calculado a partir da glicose disponível no tempo zero de fermentação, situou-se na faixa de 0,44 a 0,53 g/g, o que permitiu alcançar uma eficiência de fermentação (η) acima de 86 % para todas as estratégias avaliadas. Estes

resultados evidenciam a capacidade fermentativa da levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860 a partir da glicose solubilizada no meio.

Tabela 5.11 - Parâmetros fermentativos dos ensaios de *SHF* e *SSF* da celulignina de palha de arroz por *K. marxianus* NRRL Y-6860 em temperatura de 45 °C e agitação de 100 rpm.

Parâmetros	<i>SHF_A</i> (8%)	<i>SHF_i</i> (8%)	<i>SHF_A</i> (12%)	<i>SSF</i> (8%)
$t_{\text{sacarificação}}$ (h)	12	12	12	-
$t_{\text{fermentação}}$ (h)	4	4	8	4
t_{total} (h)	16	16	20	4
[Glicose] _{potencial} (g/L)	48,83	48,83	73,20	48,83
[Glicose] _{inicial} (g/L)	23,56	23,12	36,54	0
Rendimento de hidrólise (%)	48,2	47,34	49,92	-
Etanol (g/L)	11,56	10,70	19,36	10,76
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,49	0,44	0,53	0,47*
$Y'_{P/S}$ (g/g)	0,24	0,22	0,26	0,24
η (%)	96,1	86,3	103,9	92,1
η' (%)	47,1	43,1	51,0	47,1
Q_P (g/L.h)	2,89	2,68	2,47	2,69
Q_{PT} (g/L.h)	0,72	0,67	0,97	2,69

[Glicose]_{potencial} = Concentração de glicose potencial na celulignina.

[Glicose]_{inicial} = Concentração de glicose presente no meio no tempo zero de fermentação.

$Y_{P/S}$ = Fator de conversão de glicose em etanol

$Y'_{P/S}$ = Fator de conversão de glicose potencial em etanol

Q_P = Produtividade volumétrica em etanol considerando apenas o tempo de fermentação.

Q_{PT} = Produtividade volumétrica total em etanol considerando o tempo de sacarificação e de fermentação

* Estimado considerando 50 % de rendimento de hidrólise (8% = 24,41 g/L de glicose).

Devido à dificuldade em determinar a concentração de glicose liberada pela enzima durante o processo de *SSF*, uma vez que a glicose é simultaneamente metabolizada pela levedura, é necessário estimar um fator de conversão de glicose em etanol baseado na glicose potencial presente no material lignocelulósico ($Y'_{P/S}$). Para isso, é considerado que toda a glicose potencial estará disponível para fermentação, o que não é observado na

realidade, uma vez que parte dessa glicose permanece no material na forma de celulose. Portanto, para o cálculo da eficiência (η') a partir de $Y'_{P/S}$, deve-se assumir a conversão máxima dessa glicose potencial em etanol (0,51 g/g), o que dificilmente ocorreria, pois nem toda a glicose é transformada em etanol pelas leveduras, que também necessitam sintetizar outras moléculas para crescimento, divisão e manutenção celular. Estes parâmetros ($Y'_{P/S}$ e η'), embora conceitualmente discutíveis, são usualmente empregados em artigos de *SSF* de materiais lignocelulósicos, e foram também utilizados no presente trabalho a fim de comparar os resultados obtidos com aqueles reportados na literatura.

Nota-se na Tabela 5.11 que o fator de conversão de glicose potencial em etanol ($Y'_{P/S}$) apresentou valores em torno de 0,24 g/g para todas as estratégias avaliadas, inclusive quando a carga de celulignina foi de 12 % (m/v), indicando que este parâmetro não foi influenciado pelo aumento no teor de sólidos. A diferença observada entre η (calculada a partir da glicose realmente disponível no meio) e η' (calculada a partir da glicose potencial) é um indicativo que, nas condições empregadas, o rendimento de hidrólise foi o fator limitante da produção de etanol por sacarificação e fermentação por *K. marxianus* NRRL Y-6860, em que grande parte da glicose presente no material permaneceu insolúvel na forma de celulose, devido à recalcitrância do material mesmo após o pré-tratamento com ácido diluído.

Ainda na Tabela 5.11, é importante destacar que, dentre os parâmetros fermentativos obtidos para todos os ensaios, a produtividade volumétrica total em etanol (Q_{PT}) foi a que apresentou a maior variação nos valores. Por exemplo, quando o processo foi realizado com 8 % (m/v) de celulignina, a Q_{PT} na estratégia *SSF* foi cerca de 280 % maior que as observadas nas estratégias de *SHF*, e que, mesmo aumentando o teor de sólidos na *SHF* para 12 % (m/v), a Q_{PT} foi 177 % maior na *SSF* com 8 % (m/v). Portanto, considerando que a produtividade volumétrica em etanol é um dos fatores mais importantes para a viabilidade econômica do processo, pode-se concluir que, nas condições avaliadas no presente trabalho, a estratégia de *SSF* é a mais indicada para a produção de etanol a partir da celulignina de palha de arroz empregando a levedura termotolerante *K. marxianus* NRRL Y-6860.

Tabela 5.12 – Condições e parâmetros fermentativos de processos em *SSF* visando a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos

Matéria-prima (% m/v)	Pré- tratamento	Carga enzimática (Unidades/g)	Levedura	Temperatura (°C)	Etanol (g/L)	Y' P/S (g/g)	Tempo de fermentação (h)	Q _{PT} (g/L.h)	Referências *
Palha de milho (10 %)	Vapor (com SO ₂)	15 FPU celulasas 25 UI β-glicosidase	<i>S. cerevisiae</i> comercial	30	25,7	0,38	72	0,36	1
Palha de trigo (10 %)	Explosão a vapor	19 FPU celulasas 25 UI β-glicosidase	<i>S. cerevisiae</i> comercial	37	25,2	0,34	30	0,84	2
Palha de trigo (10 %)	Explosão a vapor	17 FPU celulasas 17 FPU β-glicosidase	<i>K. marxianus</i> CECT 10875	42	21,1	0,28	24	0,88	3
Bagaço de sorgo (10 %)	Explosão a vapor	15 FPU celulasas	<i>K. marxianus</i> CECT 10875	42	16,2	0,31	86	0,19	4
Palha de trigo (7,5 %)	Ácido diluído	26 FPU celulasas	<i>S. cerevisiae</i> comercial	37	14,6	0,34	120	0,12	5
Palha de arroz (5 %)	Ácido diluído	15 FPU celulasas	<i>S. cerevisiae</i> comercial	38	10,20	0,31	48	0,21	6
Palha de arroz (6%)	Amônia	30 FPU celulasas 60 CBU β-glicosidase	<i>S. cerevisiae</i> D ₅ A	38	12,7	0,42	120	0,11	7
Palha de arroz (8 %)	Ácido diluído	25 FPU celulasas 25 UI β-glicosidase	<i>K. marxianus</i> NRRL Y-6860	45	10,8	0,24	4	2,69	Presente trabalho

*Referências: ¹Öhgren et al. (2006); ²Alfani et al. (2000); ³Tomás-Pejó et al. (2009); ⁴Ballesteros et al. (2004); ⁵Wyman; Spindler; Grohmann (1992);

⁶Karimi; Emtiazi; Taherzadeh (2006); ⁷Ko et al. (2009)

Resultados promissores são observados quando se compara a produtividade volumétrica total em etanol obtida no presente trabalho com os principais grupos de pesquisadores que estudam a *SSF* de matérias lignocelulósicas, os quais estão listados na Tabela 5.12. Observa-se que, apesar de já ter sido relatada a obtenção de aproximadamente 25 g/L de etanol, poucos trabalhos reportam um tempo de processo inferior a 30 horas empregando linhagens de *K. marxianus* ou de *S. cerevisiae*, o que impacta de forma significativa a produtividade do processo. Verifica-se ainda que a temperatura de *SSF* empregada no presente trabalho (45 °C) é a maior dentre os trabalhos listados, o que pode ter contribuído para a diferença observada na produtividade volumétrica em etanol, uma vez que *K. marxianus* NRRL Y-6860 foi capaz de produzir etanol de forma eficiente em uma temperatura mais próxima à ótima para a atividade do complexo celulolítico.

5.5.4. Avaliação da influência da temperatura no processo de *SSF* da celulignina de palha de arroz por *K. marxianus* NRRL Y-6860 e *S. cerevisiae*

No processo de sacarificação e fermentação simultânea (*SSF*) de materiais lignocelulósicos é necessário encontrar uma temperatura que possibilite combinar a melhor condição para atuação das enzimas celulolíticas e a fermentação do produto de hidrólise pelo micro-organismo, uma vez que estes processos ocorrem simultaneamente (OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008). Porém, enquanto a faixa de temperatura para o micro-organismo mais utilizado na produção de etanol (*S. cerevisiae*) é de 30 a 37 °C, a temperatura ótima das celulasas é de 50 °C (KRISHNA; REDDY; CHOWDARY, 2001). Esta diferença entre as condições de temperatura tem limitado o uso de micro-organismos mesófilos em *SSF*, o que tem motivado a busca por micro-organismos termotolerantes alternativos com capacidade de fermentar os açúcares presentes no material lignocelulósico (SPLINDER et al., 1988).

Com o objetivo de avaliar o efeito da temperatura sobre a produção de etanol no processo de *SSF* empregando *S. cerevisiae* ou *K. marxianus* NRRL Y-6860, ensaios foram realizados nas temperaturas de 30 e 45 °C, as quais estão, respectivamente, na faixa ótima de crescimento para cada levedura. Nesta etapa foram utilizadas as mesmas condições de carga enzimática (25 FPU de Cellubrix e 25UI de Novozyme 188 por grama de substrato), teor de 8 % (m/v) de celulignina de palha de arroz e agitação rotatória de 100 rpm. A

Figura 5.14 mostra o efeito da temperatura sobre a hidrólise enzimática da celulignina de palha de arroz, sem a adição de inóculo.

Observa-se que a velocidade inicial de hidrólise é maior na temperatura de 45 °C, concordando com as especificações das enzimas que indicam uma temperatura ótima na faixa de 50 °C. Considerando a concentração de glicose liberada em 4 horas, a velocidade de hidrólise diminuiu de 4,12 g/L.h para 2,63 g/L.h quando a temperatura passou de 45 para 30 °C, o que correspondeu a um decréscimo de 36 %. Drissen et al. (2007) estudando a cinética da enzima comercial Cellubrix também observaram uma diminuição na velocidade inicial de hidrólise deste extrato enzimático quando a temperatura foi diminuída. Os autores reportaram uma diminuição de 46 e 27 % na taxa inicial de hidrólise quando a temperatura passou de 50 para 30 °C e de 40 para 30 °C, respectivamente.

Verifica-se que o efeito da temperatura sobre o rendimento de hidrólise foi mais pronunciado no tempo de 8 horas. Nota-se que neste tempo o rendimento de hidrólise na temperatura de 30 °C foi de 30 %, enquanto na temperatura de 45 °C foi de 47,3 %, o que corresponde a um aumento de 57,6 %. No entanto, nota-se que, independente da temperatura empregada, praticamente o mesmo rendimento (50 %) é obtido após 36 horas de hidrólise.

Figura 5.14: Hidrólise enzimática de 8% (m/v) de celulignina em temperaturas de 30 e 45 °C. Cargas de Cellubrix e Novozyme 188 de 25 FPU e 25 UI por grama de material, respectivamente.

A maior velocidade inicial de hidrólise observada na temperatura de 45 °C e a diferença de rendimento de hidrólise até 12 horas de reação justificam a necessidade de empregar leveduras termotolerantes em *SSF* de materiais lignocelulósicos, principalmente quando o objetivo é alcançar a máxima produtividade do processo. Uma alta taxa de hidrólise enzimática resulta em maior disponibilidade de substrato para ser fermentado pela levedura, a qual poderá produzir etanol em um menor intervalo de tempo.

A Figura 5.15 mostra o perfil cinético obtido nos ensaios de *SSF* com as leveduras *K. marxianus* e *S. cerevisiae* nas temperaturas de 30 e 45 °C. Observa-se que a maior concentração de etanol, cerca de 11 g/L, foi obtida com 8 horas de *SSF* empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860 na temperatura de 45 °C, enquanto na temperatura de 30 °C esta levedura produziu cerca de 6 g/L de etanol, provavelmente devido à menor quantidade de glicose liberada pelas enzimas, que atuavam em uma faixa de temperatura inferior à ótima para a hidrólise. Nota-se ainda que, independente da temperatura empregada, não foi observado acúmulo de glicose durante a *SSF* com *K. marxianus* NRRL Y-6860.

Figura 5.15: Produção de etanol em *SSF* por *K. marxianus* NRRL Y-6860 e *S. cerevisiae* em temperaturas de 30 e 45 °C. As linhas cheias representam a concentração de etanol e as linhas pontilhadas à concentração de glicose.

Em relação ao processo empregando *S. cerevisiae* observa-se que a maior produção de etanol (aproximadamente 10 g/L) foi obtida na temperatura de 30 °C em 24 horas, enquanto que na temperatura de 45 °C a máxima concentração de etanol foi de 6 g/L em 12 horas de processo. Nota-se ainda que para a *S. cerevisiae* houve acúmulo de glicose

durante toda a fermentação sob temperatura de 45 °C, alcançando um residual de cerca de 10 g/L deste carboidrato.

A Tabela 5.13 mostra os parâmetros fermentativos dos ensaios com *K. marxianus* NRRL Y-6860 e *S. cerevisiae* a 30 e 45 °C.

Tabela 5.13 - Parâmetros fermentativos dos ensaios de *SSF* da celulignina de palha de arroz por *K. marxianus* NRRL Y-6860 e *S. cerevisiae* em temperaturas de 30 e 45 °C.

	30 °C		45 °C	
	<i>K. marxianus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
$t_{\text{fermentação}} \text{ (h)}^a$	12	24	4	12
Etanol (g/L)	6,62	9,87	10,76	6,18
Glicose residual _{máx} (g/L)	0,29	2,14	0,44	10,41
$Y'_{\text{P/S}}$ (g/g)	0,14	0,20	0,24	0,13
Q_{PT} (g/L.h)	0,80	0,41	2,69	0,52
η' (%)	27,5	39,2	47,1	25,5

^aTempo em que foi observada a máxima concentração de etanol

$Y'_{\text{P/S}}$ = Fator de conversão de glicose potencial em etanol

Q_{PT} = Produtividade volumétrica total em etanol considerando o tempo de sacarificação e de fermentação

De maneira geral, verifica-se que independente da temperatura, a levedura termotolerante *K. marxianus* NRRL Y-6860 mostrou-se superior à *S. cerevisiae* em relação a produtividade do processo. Para a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860 observa-se que o fator de conversão de glicose potencial em etanol ($Y'_{\text{P/S}}$) decresceu de 0,24 para 0,14 g/g quando a temperatura foi diminuída de 45 para 30 °C. Quanto à *S. cerevisiae*, nota-se que o aumento da temperatura de 30 para 45 °C diminuiu o $Y'_{\text{P/S}}$ em 35 %, indicando que a maior temperatura foi capaz de inibir parcialmente a conversão de glicose em etanol por esta levedura. Verifica-se ainda que, nas melhores condições para cada levedura avaliada, *K. marxianus* NRRL Y-6860 (45 °C) e *S. cerevisiae* (30 °C), a eficiência de fermentação em *SSF* da primeira foi 20 % maior que a observada para a última. Com relação aos valores de produtividade volumétrica total em etanol obtidos na temperatura de 45 °C, verifica-se que Q_{PT} de *S. cerevisiae* foi cerca de 64 % menor que a observada para *K. marxianus* NRRL Y-6860.

Souza (2011) verificou que a velocidade máxima de crescimento específica de uma linhagem de *S. cerevisiae* (LBM1) foi reduzida em 90 % quando a temperatura de fermentação aumentou de 30 para 45 °C. Portanto, a temperatura de 45 °C exerce um efeito negativo sobre o crescimento e consequentes consumo de glicose e produção de etanol em *S. cerevisiae*, justificando o comportamento observado no presente trabalho.

Os resultados apresentados demonstraram as vantagens de empregar uma levedura termotolerante no processo de *SSF*. A levedura selecionada no presente trabalho (*K. marxianus* NRRL Y-6860) mostrou ser mais eficiente que *S. cerevisiae* na produção de etanol por *SSF* da celulignina de palha de arroz, por apresentar a capacidade de fermentar com elevada produtividade em uma temperatura próxima àquela ótima para a atuação das enzimas celulolíticas (45 °C).

6. CONCLUSÕES

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

- Dentre as oito linhagens de *K. marxianus* avaliadas quanto à capacidade de fermentar glicose em etanol na temperatura de 45 °C, cinco delas apresentaram potencialidade para a aplicação em processos fermentativos nesta temperatura. A linhagem *K. marxianus* NRRL Y-6860 foi selecionada por sua maior eficiência de conversão de glicose em etanol a 45 °C em relação as demais.
- As condições de agitação e aeração interferiram significativamente nos parâmetros fermentativos de *K. marxianus* NRRL Y-6860. A produção de etanol pela levedura foi favorecida nas menores condições de agitação e aeração avaliadas (100 rpm e razão $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ de 2,5).
- A levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860 foi capaz de produzir etanol a partir de elevadas concentrações de glicose (112 g/L), com produtividade volumétrica em etanol ($Q_P = 3,24$ g/L.h) comparável à linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* industriais.
- O pré-tratamento da palha de arroz com ácido diluído resultou em remoção parcial da hemicelulose presente no material, possibilitando a obtenção de uma celulignina com teor de celulose de 55 % (g/g).
- O rendimento de hidrólise da celulignina de palha de arroz foi favorecido pelo aumento da carga enzimática do extrato comercial Cellubrix e pela suplementação com Novozyme 188 (β -glicosidase) na proporção de 1:1.
- O processo de sacarificação e fermentação em separado (*SHF*) empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860 não foi influenciado pela inativação das enzimas no meio. O aumento no teor de sólido de 8 para 12 % (m/v) favoreceu a produtividade volumétrica total em etanol em cerca de 40 %, apresentando o valor de 0,97 g/L.h, enquanto que o fator de conversão de glicose potencial em etanol ($Y'_{P/S} \approx 0,24$ g/g) foi similar.
- A estratégia de sacarificação e fermentação simultânea (*SSF*) empregando *K. marxianus* NRRL Y-6860 com teor de 8 % (m/v) de celulignina apresentou maior produtividade volumétrica total em etanol ($Q_{PT} = 2,69$ g/L.h) em relação à *SHF* ($Q_{PT} = 0,72$ g/L.h), indicando ser um processo mais adequado para a produção de etanol a partir da celulignina de palha de arroz.

- O emprego da levedura termotolerante *K. marxianus* NRRL Y-6860 na *SSF* quando comparado a *Saccharomyces cerevisiae* demonstrou ser mais vantajoso, uma vez que a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860 é capaz de fermentar a glicose de forma eficiente na mesma faixa de temperatura ótima para atuação das enzimas celulolíticas.
- De uma forma geral, conclui-se que a levedura termotolerante *K. marxianus* NRRL Y-6860 é um micro-organismo em potencial para produção de etanol celulósico empregando a estratégia *SSF* devido aos elevados valores de produtividade volumétrica total em etanol ($Q_{PT} = 2,69 \text{ g/L.h}$) obtidos a partir da celulignina de palha de arroz.

Sugestões para trabalhos futuros:

- Avaliar outros fatores que interferem na produção de etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860, tanto em meio sintético quanto a partir de materiais lignocelulósicos, tais como: tolerância a etanol, necessidades nutricionais e um estudo mais aprofundado sobre as condições de oxigenação requeridas por esta levedura, uma vez que não há nenhum trabalho na literatura reportando estas questões.
- Estudar outras condições e tipos de pré-tratamento que possibilitem aumentar a acessibilidade da celulose às enzimas celulolíticas na palha de arroz, visando aumentar o rendimento de hidrólise do material.
- Avaliar outras condições e formas de condução do processo fermentativo em *SSF*, que possibilitem a utilização de um maior teor de sólido para ser hidrolisado e convertido em etanol por *K. marxianus* NRRL Y-6860, como, por exemplo, a batelada alimentada.
- Avaliar o potencial desta levedura para a produção de etanol a partir de outros materiais lignocelulósicos.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MOHDY, F.; ABDEL-HALIM, E.; ABU-AYANA, Y.; EL-SAWY, S. Rice straw as a new resource for some beneficial uses. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 44-51, 2009.

ALFANI, A.; GALLIFUOCO, F.; SAPOROSI, A.; SPERA, A.; CANTARELLA, M. Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 184–192, 2000.

ALLEN, S.G.; SCHULMAN, D.; LICHWA, J.; ANTAL, M.J.; JENNINGS, E.; ELANDER, R. A comparison of aqueous and dilute-acid single-temperature pretreatment of yellow poplar sawdust. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 40, p. 2.352–2.361, 2001.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4.851-4.861, 2010.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; CASTRO OLIVEIRA, J.V.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1.267-1.275, 2011.

ANDERSON, P.J.; MCNEIL, K.; WATSON, K. High efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 1.314-1.320, 1986.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 3, 2011.

ARS/USDA (Agricultural Research Service/ United States Department of Agriculture). ARS Culture Collection (NRRL) Database Server. Disponível em: <<http://nrrel.ncaur.usda.gov/cgi-bin/usda/yeast/report.html?nrrelcodes=Y-6860>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.

BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M.; CABANAS, A.; CARRASCO, J.; MARTIN, C.; NEGRO, M.J.; SAEZ, F.; SAEZ, R. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28, p. 307–315, 1991.

BALLESTEROS, M.; OLIVA, J.M.; NEGRO, M.J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1843-1848, 2004.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 259–263, 1992.

BERLIN, A.; GILKES, N.; KURABI, A.; BURA, R.; TU, M.; KILBURN, D., SADDLER, J.N. Weak lignin-binding enzymes: A novel approach to improve activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 163–170, 2005.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R.R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4.767-4.774, 2010

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

BROWNING, B.L. **Methods of Wood Chemistry**. New York; John Wiley & Sons, 1967. p. 689.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MEDEIROS, R.; GÍRIO, F.M. Optimization of brewery's spent grain dilute-acid hydrolysis for the production of pentose-rich culture media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, p. 1.059-1.072, 2004.

CHADDAD, F.R. UNICA: challenges to deliver sustainability in the brazilian sugarcane industry. **International Food and Agribusiness Management Review**, v. 13, p.173–192, 2010.

CHANDRA, R.P.; BURA, R.; MABEE, W.E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J.N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 108, p. 67-93, 2007.

COUGHLAN, M.P.; LJUNGDAHL, L.G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme system. In: AUBERT, J. P.; BEGUIN, P.; MILLET, J. (Eds.), **Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation**, London: Academic Press, 1988. p. 11-30.

DEMAIN, A.L. Biosolutions to the energy problem. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 319-332, 2009.

DEMIRBAS, A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energy Sources**, v.27, p. 327-337, 2005.

DETROY, R. W.; JULIAN, G. S. Biomass conversion: fermentation chemicals and fuels. **Critical Reviews in Microbiology**, v.10, p. 203-228. 1982.

DRAKE, D. J.; NADER, G.; FORERO, L. Feeding rice straw to cattle, **Agricultural and Natural Resources Publications**, Oakland, University of California, n. 8079, p. 1-18, 2002.

DOMÍNGUEZ-ESCRIBÀ, L.; PORCAR, M. Rice straw management: the big waste. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, p. 154-159, 2010.

DRISSEN, R.E.T; MAAS, R.H.W.; VAN DER MAAREL, M.J.E. C.; KABEL, M.A.; SCHOLS, H.A.; TRAMPER, J.; BEEFTINK, H.H. A generic model for glucose production from various cellulose sources by a commercial cellulase complex. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, p. 419-429, 2007.

DRISSEN, R.E.T; MAAS, R.H.W; TRAMPER, J.; BEEFTINK, H.H. Modelling ethanol production from cellulose: separate hydrolysis and fermentation versus simultaneous saccharification and fermentation. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 27, p. 27-35, 2009.

DUFF, S.J.B.; MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v.55, p. 1-33. 1996.

FONSECA, G.G.; GOMBERT, A.K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C. Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **FEMS Yeast Research**, v.7, p. 422-435, 2007.

FONSECA, G.G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339-54, 2008.

GARCÍA-APARICIO, M.P.; OLIVA, J.M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; NEGRO, M.J. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Fuel**, v. 90, p. 1.624–1.630, 2011.

GASPAR, M.; KALMAN, G.; RECZEY, K. Corn fibre as a raw material for hemicellulose and ethanol production. **Process Biochemistry**, v.42, p. 1.135–1.139, 2007.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v.59, p. 257-268, 1987.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4.775-4.800, 2010.

GOLDSTEIN, I.S. **Organic chemicals from Biomass**. Boca Raton: CRC Press, 1981. p. 309.

GREGG, D.J.; SADDLER, J.N. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. **Biotechnology and Bioengineering**, v.51, p. 375–383, 1996.

HAMELINCK, C.N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass Bioenergy**, v.28, p. 384–410, 2005.

HSU, T.-C.; GUO, G.-L.; CHEN, W.-H.; HWANG, W.-S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4907-13, 2010.

HUGHES, D.B.; TUDROSZEN, N.J.; MOYE, C.J. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**, v. 6, n.1, p. 1-6, 1984.

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

KADAM, K.L.; FORREST, L.H.; JACOBSON, W.A. Rice straw a lignocellulosic resource: collecting, processing, transportation, and environmental aspects. **Biomass and Bioenergy**, v.18, p. 369-389, 2000.

KARIMI, K., EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M.J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p. 138–144, 2006.

KIERS, J.; ZEEMAN, A.M.; LUTTIK, M.; THIELE, C.; CASTRILLO, J.I.; STEENSMA, H.Y.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. **Yeast**, v. 14, p. 459-469, 1998.

KIM, S.B.; YUM, D.M.; PARK, S.C. Step-change variation of acid concentration in a percolation reactor for hydrolysis of hardwood hemicellulose. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 289- 294, 2000.

KIM, S.; DALE, B.E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass Bioenergy**, v. 26, p. 361–375, 2004.

KIM, T.H.; LEE, Y.Y. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, p. 81– 92, 2007.

KRISHNA, S.H.; REDDY, T.J.; CHOWDARY, G.V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 193-196, 2001.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 1, p. 11, 2009.

KO, J.K.; BAK, J.S.; JUNG, M.W.; LEE, H.J.; CHOI, I.-G.; KIM, T.; KIM, K. Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 19, p. 4.374-80, 2009.

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 3713–3729, 2009.

KUMAR, R.; WYMAN, C.E. Access of cellulase to cellulose and lignin for poplar solids produced by leading pretreatment technologies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 3, p. 807-819, 2009.

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

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, p. 627-642, 2006.

LLORENTE, B.; MALPERTUY, A.; BLANDIN, G.; ARTIGUENAVE, F.; WINCKER, P.; DUJON, B. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. **FEBS Letters**, v. 487, p. 71–75, 2000.

LU, Y.; CHENG, Y.-F.; HE, X.-P.; GUO, X.-N.; ZHANG, B.-R. Improvement of robustness and ethanol production of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* under co-stress of heat and inhibitors. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 111, n. 6, p. 682-686, 2011.

LYND, L.R.; CUSHMAN, J.H.; NICHOLS, R.J.; WYMAN, C.E. Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science**, v. 251, p. 1.318-1.323, 1991.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; NILVEBRANT, N.-O.; JÖNSSON, L.J. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 699-716, 2002.

MARZIALETTI, T.; VALENZUELA OLARTE, M.B.; SIEVERS, C.; HOSKINS, T.J.C.; AGRAWAL, P.K.; JONES, C.W. Dilute acid hydrolysis of loblolly line: a comprehensive approach. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 7.131-7.140, 2008.

MDIC (Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior). Álcool combustível. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=2&menu=999>>. Acesso em: 07 nov. 2011.

MERICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 4, p. 976-89, 2007.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, N. Growing expectations: new technology could turn fuel into a bump crop. **Science News Online**, v. 168, p. 209-24, 2005.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 1-10, 2004.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Evaluation of nutrient supplementation to charcoal-treated and untreated rice straw hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p. 497-502, 2005.

MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.M.F.; ROBERTO, I.C. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Cellulose**, v. 15, n. 5, p. 711-721, 2008a.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A.; ROBERTO, I, C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology** v. 43, p. 124-129, 2008b.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute acid hydrolysis of sugar cane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 49-58, 2002.

NGYUEN, Q.A.; TUCKER, M.P.; KELLER, F.; BEATY, D.; CONNORS, K.M.; HEDÍ, F. Dilute acid hydrolysis of softwoods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 133-142, 1999.

NIGAM, J.N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17-27, 2001.

NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 52-68, 2011.

ÖHGREN, K.; RUDOLF, A; GALBE, M.; ZACCHI, G. Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, p. 863-869, 2006.

ÖHGREN, K. VEHEMAANPERÄ, J. SIIKA-AHO, M.; GALBE, M., VIKARI, L.; ZACCHI, G. High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 607-613, 2007.

OLIVA, J.M; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; NEGRO, M.J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 141-153, 2003.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, p. 1-14, 2008.

PANAGIOTOU, G.; OLSSON, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 250-258, 2007.

PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 38, p.53-87, 1989.

PEREIRA, F.B.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A; DOMINGUES, L. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 130-136, 2011.

PESSANI, N.K.; ATIYEH, H.K.; WILKINS, M.R.; BELLMER, D.D.; BANAT, I.M. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: The effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10618-10624, 2011.

PESSOA-JR, A.; ROBERTO, I.C.; MENOSSI, M.; SANTOS, R.R.; FILHO, S.O.; PENNA, T.C., Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 59-70, 2005.

PISKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICO, A.; COMPAGNO, C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, v. 22, p. 183–186, 2006.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H.C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Conservation and Recycling**, v. 50, p. 1-39, 2007.

PRYOR, S.W.; NAHAR, N. Deficiency of cellulase activity measurements for enzyme evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 6, p. 1737-50, 2010.

RFA (Renewable Fuel Association). Global ethanol production to reach 88.7 billion litres in 2011. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/news/entry/global-ethanolproduction-to-reach-88.7-billion-litres-in-2011/>> Acesso em: 09 nov. 2011.

ROBERTO, I.C.; MUSSATTO, S.I.; RODRIGUES, R. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v.17, p. 171-176, 2003.

ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol: effect of pH and nitrogen source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57, n. 4, p. 339-347, 1996.

ROCHA, G.J.M. **Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio**. 2000. 136 p. Tese (Doutorado) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

ROLLIN, J.A; ZHU, Z.; SATHITSUKSANO, N.; ZHANG, Y.-H.P. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 1, p. 22-30, 2011.

ROSA, F.M.; SÁ-CORREIA, I. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 23–27, 1992.

RODRUSSAMEE, N.; LERTWATTANASAKUL, N.; HIRATA, K.; SUPRAYOGI; LIMTONG, S.; KOSAKA, T.; YAMADA, M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1.573-1.586, 2010.

ROUWENHORST, R.J.; VISSER, L.E.; VAN DER BAAN, A.A.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1.131–1.137, 1988.

RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, p. 841-845, 2008.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU, Y.V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3693-3700, 2005.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SASSNER, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, n. 5, p. 422-430, 2008.

SINGH, D.; NIGAM, P.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; MCHALE, A.P. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations : Part II - Use of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Journal of Microbiology**, v. 14, p. 823-834, 1998.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocateau reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152- 178, 1999.

SOUZA, C.J.A. **Produção de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas do bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras termotolerantes**. 2011. 63f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2011.

SPINDLER, D.D.; WYMAN, C.E.; MOHAGHEGHI, A.; GORHMANN, K. Thermotolerant yeast for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 279-293, 1988.

STEENSMA, H.Y.; DE JONGH, F.C.M.; LINNEKAMP, M. The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeasts: *Kluyveromyces marxianus* and *K. lactis*. **Current Genetics**, v. 14, p. 311–317, 1988.

STEWART, D. Lignin as a base material for materials applications: chemistry, application and economics. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p. 202–207, 2008.

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

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G.. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.53, p. 701–708, 2000.

TARKOV, H., FEIST, W.C. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 197–218, 1969.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 9-10, p. 835-844, 2001.

THOMAZ, D. **Melhoramento das condições de hidratação da levedura seca instantânea de panificação por tratamentos com soluções de aditivos**. 2008. 80f. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Araraquara-SP, 2008.

TOMÁS-PEJÓ, E.; OLIVA, J.M.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. **Fuel**, v. 88, p. 2142-2147, 2009.

VARGA, E.; KLINKE, H.B.; RÉCZEY, K.; THOMSEN, A.B. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 567-74, 2004.

VARGA, E.; SCHIMIDT, A.S.; RÉCZEY, K.; THOMSEN, A.B. Pretreatment of corn stover using wet oxidation to enhance enzymatic digestibility. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 37-50, 2003.

VLASENKO, E.Y.; DING, H.; LABAVITCH, J.M.; SHOEMAKER, S.P. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 109-119, 1997.

YANG, B.; WYMAN, C.E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, p. 26-40, 2008.

YUN, S.-I.; JEONG, C.-S.; CHUNG, D.-K.; CHOI, H.-S. Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 9, p. 2028-2032, 2001.

WINGREN A.; GALBE M.; ZACCHI G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 4, p. 1109-1117, 2003.

WOOD, T.M.; BATH, M.K. In: W.A. Wood and S.T. Kellogg. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87-112, 1998.

WYMAN, C.E.; DALE, B.E.; ELANDER, R.T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M.R.; LEE, Y.Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Renewable Energy**, v. 96, p. 1959-1966, 2005.

WYMAN, C.E.; SPINDLER, D.D.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n. 5, p. 301-307, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Cell walls: structure, biogenesis, and expansion. In: _____ **Plant physiology**. Sunderland; **Sinauer Associates**, c2010. Cap. 15.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.