

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

TAINÃ OLIVEIRA BONIFÁCIO

Produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* a partir do hidrolisado
celulósico de palha de arroz: avaliação nutricional e desempenho em
biorreator *air-lift*

Lorena

2020

TAINÃ OLIVEIRA BONIFÁCIO

Produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* a partir do hidrolisado
celulósico de palha de arroz: avaliação nutricional e desempenho em
biorreator *air-lift*

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
concentração de Biotecnologia Industrial

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

Versão Corrigida

Lorena

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bonifácio, Tainã Oliveira

Produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* a partir do hidrolisado celulósico de palha de arroz: avaliação nutricional e desempenho em biorreator air lift / Tainã Oliveira Bonifácio; orientadora Inês Conceição Roberto - Versão Corrigida. - Lorena, 2020. 121 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2020

1. *Kluyveromyces marxianus*. 2. Etanol celulósico. 3. Palha de arroz. 4. Suplementação nutricional. 5. Biorreator air-lift. I. Título. II. Roberto, Inês Conceição, orient.

Dedico este trabalho à Deus, Jesus e ao Espírito Santo que me conduziram ao longo desta jornada no mestrado, aos meus pais, Anita e Luiz Carlos e ao meu irmão João Paulo.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo seu infinito amor ao enviar Jesus para me salvar, e o Espírito Santo, por me segurar com seu braço forte, me dar sabedoria, discernimento e conhecimento durante esta jornada! Obrigada SENHOR!

Aos meus pais, Anita O. Santos Bonifácio e Luiz Carlos Bonifácio, que a todo momento do mestrado me apoiaram, incentivaram e me fortaleceram para concluir esta fase. Ao meu irmão João Paulo, pelo amor, carinho e palavras encorajadoras!

A minha orientadora, professora Dra. Inês Conceição Roberto pela orientação, paciência e dedicação.

Aos meus grandes amigos irmãos: Joslaine Dias, Thiago Romanelli, Bruno, pela ajuda constante, pelo suporte e conselhos nos momentos difíceis, pelas risadas, e por tornarem mais alegres meus dias em Lorena! Amo vcs!

Aos meus amigos Jônatas e Diego, pelos momentos de oração e divertidos que partilhei.

A minha amiga e companheira de laboratório: Lina Duran, pela ajuda e incentivo à sempre melhorar!

Às companheiras de laboratório, Mariana e Daiana! Muito obrigada por toda ajuda!

Às amigadas que que cultivei durante o mestrado: Fanny, Verônica, Ana Maria, Sarah, Josman, Lady Patricia, Uirajá, Pedro, Otto. Muito obrigada pela ajuda, apoio nos momentos difíceis, conselhos e momentos alegres partilhados!

Aos funcionários do Departamento de Biotecnologia: Zé-Moreira, Fabrício, Paulinho, “Zé – Cobrinha”, André, Nadir, Isnaldi, e ao professor Júlio César dos Santos, por sempre estarem prontos para ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de mestrado concedida.

*“Quem obtém sabedoria ama-se a si mesmo;
quem acalenta o entendimento prospera”*
Pv 22:12

RESUMO

BONIFÁCIO, T.O. **Produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* a partir do hidrolisado celulósico de palha de arroz: avaliação nutricional e desempenho em biorreator *air-lift***. 2020. 121 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 6860 a partir do hidrolisado celulósico de palha de arroz através da análise nutricional e do desempenho em biorreator *air-lift*. A palha de arroz *in natura* composta por (g/100g): celulose, 36,2; hemicelulose 24,4; lignina total 16,37; cinzas 9,3 foi submetida ao pré-tratamento sequencial alcalino e ácido obtendo-se o hidrolisado hemicelulósico (HH) com 18,3 g/L de xilose e a celulignina composta por (g/100g): celulose, 66,4; hemicelulose 7,68; lignina total, 18,01; cinzas 3,5). Na etapa de hidrólise enzimática da celulignina em reator do tipo moinho de bolas vertical com 20% m/v de sólidos foi obtido um hidrolisado celulósico (HC) contendo $108,8 \pm 2,1$ g/L de glicose. Inicialmente, foi avaliado o crescimento do inóculo de *K. marxianus* nos hidrolisados obtidos e seu impacto na fermentabilidade do hidrolisado celulósico. De acordo com os parâmetros fermentativos de produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$), o inóculo proveniente HC foi o que proporcionou os melhores resultados de fermentação ($Y_{P/S} = 0,43$ g/g e $Q_P = 3,91$ g/L). Posteriormente, foi avaliado o efeito da suplementação nutricional (extrato de levedura, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) do HC sobre o desempenho fermentativo de *K. marxianus*, através de um planejamento experimental 2^4 . Os resultados da análise estatística mostraram que o $(NH_4)_2SO_4$ teve um efeito significativo e positivo sobre os parâmetros $Y_{P/S}$ e Q_P . No entanto, considerando que os valores de $Y_{P/S}$ e Q_P obtidos durante a fermentação do HC apenas suplementado com 1,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ ($Y_{P/S} = 0,41$ g/g e $Q_P = 3,81$ g/L.h) são próximos aos obtidos no HC sem qualquer suplementação ($Y_{P/S} = 0,39$ g/g e $Q_P = 3,78$ g/L.h) optou-se pela utilização do HC sem adição de nutrientes nos ensaios fermentativos em reator *air-lift*. Para avaliar as características de fluidização do reator *air-lift* foi realizado um estudo dos parâmetros hidrodinâmicos incluindo velocidade superficial do gás na região de subida, tempo de mistura, tempo de circulação, velocidade de circulação do líquido, coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}), e retenção gasosa do reator empregando a água como meio (2L) na temperatura de $40 \pm 0,2$ °C. Os experimentos fermentativos em *air-lift* foram conduzidos em hidrolisado celulósico sem adição de nutrientes e em meio semi-definido utilizando glicose como fonte de carbono, nas seguintes condições: $40 \pm 0,2$ °C, (K_{La}) de $4,8 \pm 0,2$ h⁻¹ e concentração celular inicial de $3,5 \pm 0,3$ g/L. Os resultados mostraram que o desempenho fermentativo de *K. marxianus* em HC ($Y_{P/S} = 0,31$ g/g e $Q_P = 1,60$ g/L.h) foi inferior ao observado em meio semi-definido ($Y_{P/S} = 0,44$ g/g e $Q_P = 6,83$ g/L.h), sugerindo o que composição química do hidrolisado, especialmente a presença de inibidores pode ter afetado negativamente o desempenho fermentativo desta cepa. No geral, os resultados obtidos no presente trabalho revelam que o hidrolisado celulósico sem qualquer suplementação nutricional, pode ser empregado na produção de etanol por *K. marxianus*, sendo ainda necessário mais estudos para melhorar os parâmetros do processo. Destaca-se ainda o grande potencial do biorreator *air-lift* para produção de etanol por *K. marxianus* tendo em vista os elevados valores de Q_P e $Y_{P/S}$ obtidos em meio semi-definido nas condições avaliadas.

Palavras-chave: *Kluyveromyces marxianus*. Etanol celulósico. Palha de arroz. Suplementação nutricional. Biorreator *air-lift*.

ABSTRACT

BONIFÁCIO, T.O. **Ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* from rice straw cellulosic hydrolyzate: nutritional assessment and performance in an air-lift bioreactor.** 2020. 121 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

The present work aimed to evaluate the ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 6860 from cellulosic rice straw hydrolyzate through the nutritional analysis and the performance in air-lift bioreactor. In natura rice straw composed of (g / 100g): cellulose, 36.2; hemicellulose 24.4; total lignin 16.37; ash 9.3 was subjected to sequential alkaline and acid pretreatment to obtain hemicellulosic hydrolyzate (HH) with 18.3 g / L of xylose and cellulignin composed of (g / 100g): cellulose, 66.4; hemicellulose 7.68; total lignin, 18.01; ashes 3.5). In the enzymatic hydrolysis step of cellulignin in a vertical ball mill reactor with 20% w / v solids, a cellulosic hydrolyzate (HC) containing 108.8 ± 2.1 g / L of glucose was obtained. Initially, the growth of the *K. marxianus* inoculum in the hydrolysates obtained and its impact on the fermentability of the cellulosic hydrolyzate was evaluated. According to the fermentative parameters of volumetric productivity in ethanol (Q_P) and sugar to ethanol conversion factor ($Y_{P/S}$), the inoculum from HC was the one that provided the best fermentation results ($Y_{P/S} = 0.43$ g / g and $Q_P = 3.91$ g / L). Subsequently, the effect of nutritional supplementation ($(NH_4)_2SO_4$, yeast extract, KH_2PO_4 and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) from HC on the fermentative performance of *K. marxianus* was evaluated, through experimental design 2^4 . The results of the statistical analysis showed that $(NH_4)_2SO_4$ had a significant and positive effect of on $Y_{P/S}$ and Q_P parameters. However, considering that the values of $Y_{P/S}$ and Q_P obtained during the fermentation of HC only supplemented with 1.0 g/L of $(NH_4)_2SO_4$ ($Y_{P/S} = 0.41$ g/g and $Q_P = 3.81$ g/L.h) are close to those obtained in HC without any supplementation ($Y_{P/S} = 0.39$ g / g and $Q_P = 3,78$ g/L.h). Therefore was decided to use HC without adding nutrients in fermentation tests in an air-lift reactor. To evaluate the fluidization characteristics of the air-lift reactor, a study of the hydrodynamic parameters was carried out, including surface gas velocity in the rising region, mixing time, circulation time, liquid circulation speed, volumetric oxygen transfer coefficient (K_{La}), and gaseous retention of the reactor using water as a medium (2 L) at a temperature of 40 ± 0.2 °C. The fermentative experiments in air-lift were conducted in cellulosic hydrolyzate without addition of nutrients and in a semi-defined medium using glucose as a carbon source, under the following conditions: 40 ± 0.2 °C, (K_{La}) 4.8 ± 0.2 h⁻¹ and initial cell concentration of 3.5 ± 0.3 g/L. The results showed that the fermentative performance of *K. marxianus* in HC ($Y_{P/S} = 0.31$ g / g and $Q_P = 1.60$ g / Lh) was lower than that observed in semi-defined medium ($Y_{P/S} = 0.44$ g / g and $Q_P = 6.83$ g / Lh). This suggesting that the chemical composition of the hydrolyzate, especially the presence of inhibitors may have negatively affected the fermentative performance of this strain. In general, the results obtained in the present work reveal that cellulosic hydrolyzate without any nutritional supplementation can be used in the production of ethanol by *K. marxianus*, and further studies are needed to improve the process parameters. Also noteworthy is the great potential of the air-lift bioreactor for ethanol production by *K. marxianus* in view of the high values of Q_P and $Y_{P/S}$ obtained in a semi-defined medium under the conditions evaluated.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*. Cellulosic ethanol. Rice straw. Nutritional supplementation. Bioreactor air-lift.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da parede celular de um material lignocelulósico com seus principais componentes celulose, hemicelulose e lignina.	26
Figura 2 - Mecanismo de ação das celulases	32
Figura 3 - Materiais e etapas envolvidas para produção de etanol.	37
Figura 4 - Configurações de processo para produção de etanol de segunda geração.	38
Figura 5 - Glicólise – fase preparatória e fase de compensação	43
Figura 6 - Conversão do piruvato em etanol e gás carbônico.....	44
Figura 7 - Rendimento teórico obtido na conversão de uma molécula de glicose em etanol.	44
Figura 8 - <i>Air-lift</i> de cilindros concêntricos, onde a injeção de ar ocorre na base do biorreator	50
Figura 9 - Biorreator <i>air-lift</i> com circulação externa.....	51
Figura 10 - (A) Reator moinho de bolas vertical; (B) Ilustração da configuração interna do reator: (1) entrada e (2) saída de água para o controle da temperatura; (3) duto coletor de amostra; (4) compartimento para adição de reagentes; (5) local de saída de gases; (6) motor de agitação; (7) impulsores planos redondos com as esferas.....	56
Figura 11 - Biorreator <i>air-lift</i> Tecnal (TEC-BIO-P 3- AIR-LIFT) e controlador de fermentação BIOSTAT B (B. Braun)	61
Figura 12 - Direcionador de fluxo ascendente do tipo cilíndrico concêntrico – draf tube: A- diâmetro interno; B- Altura do cilindro.	61
Figura 13 - Dispensador de ar tipo cruzeta (48 poros) com suas respectivas medidas.	62
Figura 14 - Entradas localizadas na tampa do reator com suas respectivas especificações.	62
Figura 15 - (A) Medidas do reator <i>air-lift</i> (Tecnal) utilizado nos ensaios fermentativos; (B) Modelo de homogeneização do sistema empregando um direcionador de fluxo ascendente do tipo cilíndrico concêntrico (draf-tube).	63
Figura 16 - A- Palha de arroz <i>in natura</i> colhida no campo; B-palha de arroz <i>in natura</i> após moagem; C- fração sólida (palha de arroz desacetilada) obtida pós tratamento alcalino; D- fração sólida obtida após pré-tratamento alcalino e ácido (celulignina).	74
Figura 17 - Diagrama de balanço de massa: composição da palha de arroz <i>in natura</i> e do material sólido obtido.	75

Figura 18 - Concentração de açúcares no meio durante o processo de hidrólise enzimática da celulignina da palha de arroz.....	80
Figura 19 - A- Massa e volume médio do <i>slurry</i> obtido após processo de sacarificação enzimática (48h); B- massa e volume médio de hidrolisado celulósico obtido.....	81
Figura 20 - Consumo de açúcares e produção de células, xilitol, ácido acético e arabitól de <i>K. marxianus</i> em meio complexo contendo hidrolisado hemicelulósico suplementado com sais e extrato de levedura	87
Figura 21 - Consumo de açúcares e produção de células, etanol, ácido acético e xilitol de <i>K. marxianus</i> em meio complexo contendo hidrolisado hemicelulósico suplementado com sais e extrato de levedura	88
Figura 22 - Desempenho fermentativo de <i>K. marxianus</i> em hidrolisado celulósico utilizando células produzidas em meio contendo hidrolisado hemicelulósico.	90
Figura 23 - Desempenho fermentativo de <i>K. marxianus</i> em hidrolisado celulósico utilizando células produzidas em meio contendo hidrolisado celulósico	91
Figura 24 - O diagrama de Pareto demonstra as estimativas dos efeitos da variação da concentração dos sais e do extrato de levedura sobre fator de conversão de açúcares em etanol por <i>K. marxianus</i> com 90% de confiança.	97
Figura 25 - O diagrama de Pareto demonstra as estimativas dos efeitos da variação da concentração dos sais e do extrato de levedura na produtividade volumétrica em etanol em etanol por <i>K. marxianus</i> com 90% de confiança.	97
Figura 26 - Coeficiente volumétrico de oxigênio (K_{La}) em função da velocidade superficial do gás na região de subida	102
Figura 27 - Valores médios do parâmetro hidrodinâmico tempo de circulação obtidos na temperatura de 40°C utilizando diferentes vazões específicas de ar (0,125-0,5 min ⁻¹) em função da velocidade superficial do gás na região de subida	102
Figura 28 - Valores de velocidade de circulação do líquido obtidos na temperatura de 40°C utilizando diferentes vazões específicas de ar (0,125-0,5 min ⁻¹) em de água destilada (2L) em função da velocidade superficial do gás na região de subida.....	103
Figura 29 – Perfil do tempo de mistura (t_m) em função do aumento da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}) obtidos na temperatura de 40°C utilizando água destilada (2L) como fluido.	104
Figura 30 – Comportamento da retenção gasosa em função do aumento da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}) obtidos na temperatura de 40°C utilizando água destilada (2L) como fluido.....	105

Figura 31 - Perfil do desempenho fermentativo da levedura <i>K. marxianus</i> NRRL-Y 6860 em hidrolisado celulósico no reator <i>air-lift</i>	108
Figura 32 - Quantidade de oxigênio dissolvido (pO_2) e do pH durante a produção de etanol em meio H composto por glicose, sais $[(NH_4)_2SO_4, KH_2PO_4, MgSO_4 \cdot 7H_2O]$ e extrato de levedura à 40°C por <i>K. marxianus</i> em biorreator <i>air-lift</i>	108
Figura 33 - Perfil do desempenho fermentativo da levedura <i>K. marxianus</i> NRRL-Y 6860 no hidrolisado celulósico em reator do tipo <i>air-lift</i>	110
Figura 34 - Valores do pH e da quantidade de oxigênio dissolvida no meio complexo composto por hidrolisado celulósico para a produção de etanol	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Funções fisiológicas dos principais elementos	47
Tabela 2 - Composição dos meios de cultivo complexos utilizados para o crescimento de <i>K. marxianus</i>	57
Tabela 3 - Níveis reais dos fatores	59
Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental para avaliação do efeito da variação nutricional na produção de etanol celulósico, segundo planejamento fatorial completo 2 ⁴ .60	
Tabela 5 - Medidas internas do reator assim como das peças utilizadas no experimento - <i>draft-tube</i> e dispersor de ar tipo cruzeta, altura do meio de fermentação sem aeração do sistema.....	63
Tabela 6 - Condições empregadas para os ensaios fermentativos em meio semi-definido contendo glicose e meio complexo (hidrolisado celulósico).	67
Tabela 7 - Composição química da palha de arroz <i>in natura</i> , desacetilada e celulignina ...	76
Tabela 8 - Composição do licor alcalino e do hidrolisado hemicelulósico em açúcares e compostos fenólicos.....	78
Tabela 9 - Condições empregadas para a hidrólise enzimática da celulignina em reator MBV	79
Tabela 10 - Sacarificação enzimática com alto teor de sólidos empregando a biomassa lignocelulósica, rendimento obtido assim como o tempo, carga enzimática e forma de condução do processo.	83
Tabela 11 - Composição do hidrolisado hemicelulósico em açúcares e compostos fenólicos antes e após ajuste de pH 1,8 (HHO- hidrolisado hemicelulósico original) e 5,0(HHC- hidrolisado hemicelulósico corrigido) para composição do meio de cultivo (MC2).....	84
Tabela 12 - Composição do hidrolisado celulósico (HC) antes e após a diluição para composição do meio de cultivo (MC1).....	85
Tabela 13 - Equações correspondentes aos ajustes lineares dos meios semi-definidos contendo glicose ou xilose como fonte de carbono, sais e extrato de levedura.....	86
Tabela 14 - Parâmetros de crescimento de <i>K.marxianus</i> em meio contendo hidrolisado celulósico ou hemicelulósico.	88
Tabela 15 - Parâmetros fermentativos de <i>K. marxianus</i> em hidrolisado celulósico utilizando o inóculo preparado em meio contendo hidrolisado celulósico (HC) ou hidrolisado hemicelulósico (HH).....	91

Tabela 16 - Níveis reais dos sais utilizados no planejamento experimental do tipo fatorial completo 2^4 , consumo de açúcares (glicose, xilose celobiose e arabinose)	94
Tabela 17 - Análise da variância com o erro total para os principais efeitos e suas interações dos sais e extrato de levedura empregando com variável de resposta o fator de conversão de açúcares em etanol.	98
Tabela 18- Análise da variância com o erro total para os principais efeitos e suas interações dos sais e extrato de levedura empregando com variável de resposta a produtividade volumétrica em etanol.....	98
Tabela 19 - Valores médios dos parâmetros hidrodinâmicos estudados utilizando como fluido água destilada (2L), na temperatura de 40°C no biorreator <i>air-lift</i>	101
Tabela 20 - Parâmetros fermentativos de <i>K. marxianus</i> em hidrolisado celulósico e meio semi-definido	111
Tabela 21 - Parâmetros fermentativos obtidos no presente trabalho e dados presentes na literatura.....	112

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS})	65
Equação 2 - Cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	65
Equação 3 - Velocidade de circulação do líquido	66
Equação 4 - Cálculo da retenção gasosa global	66
Equação 5 - Teor de umidade da biomassa (palha de arroz)	67
Equação 6 - Porcentagem de lignina insolúvel na biomassa	68
Equação 7 - Porcentagem de lignina solúvel na biomassa.....	69
Equação 8 - Porcentagem de celulose na palha de arroz	69
Equação 9 - Porcentagem de xilana e arabinose na palha de arroz.....	69
Equação 10 - Porcentagem de grupos acetil na palha de arroz.....	69
Equação 11 - Cálculo da máxima concentração teórica de glicose obtida a partir da hidrólise enzimática	71
Equação 12 - Rendimento de hidrólise enzimática	71
Equação 13 - Fator de conversão de açúcares em biomassa.....	72
Equação 14 - Fator de conversão de açúcares em etanol	72
Equação 15 - Produtividade volumétrica de etanol	72
Equação 16 - Modelo matemático que descreve a variação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em função da velocidade superficial do gás	101
Equação 17 - Modelo matemático que descreve a valores do tempo de circulação obtidos em função da velocidade superficial do gás	102
Equação 18 - Modelo matemático que descreve a variação da velocidade de circulação do líquido (U_L) em função da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS})	103
Equação 19 - Modelo matemático que descreve o decréscimo do tempo de mistura observado em relação ao incremento da velocidade superficial do gás na região de subida	103
Equação 20 - Modelo matemático que descreve o aumento da retenção gasosa (ϵ_G) em função da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS})	104

LISTA DE ABREVIATURAS

HH	Hidrolisado hemicelulósico
HCO	Hidrolisado hemicelulósico original
HHC	Hidrolisado hemicelulósico corrigido
HC	Hidrolisado celulósico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
5-HMF	5-hidroximetilfurfural

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Palha de arroz.....	24
2.2 Pré-tratamentos	27
2.3 Hidrólise enzimática	32
2.4 Tecnologias para produção de etanol de segunda geração	36
2.5 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	39
2.6 Produção de etanol em biorreator <i>air-lift</i>	49
3 OBJETIVOS	52
3.1 Objetivo geral.....	52
3.2 Objetivos específicos	52
4 METODOLOGIA	53
4.1 Pré-tratamento	54
4.1.1 Matéria-Prima: palha de arroz.....	54
4.1.2 Pré-tratamento alcalino: desacetilação.....	54
4.1.3 Pré-tratamento ácido	55
4.2 Hidrólise enzimática da celulignina: obtenção do hidrolisado celulósico	55
4.3 Fermentação	57
4.3.1 Microrganismo	57
4.3.2 Avaliação do crescimento do inóculo de <i>K. marxianus</i> nos hidrolisados (celulósico ou hemicelulósico) e seu impacto na fermentabilidade do hidrolisado celulósico	57
4.3.3 Avaliação da suplementação nutricional do hidrolisado celulósico na produção de etanol por <i>K. marxianus</i>	59
4.4 Reator <i>air lift</i> : parâmetros hidrodinâmicos e ensaios fermentativos.....	61
4.5 Métodos Analíticos	67
4.5.1 Determinação do teor de umidade da palha de arroz	67

4.5.2 Caracterização do material lignocelulósico	68
4.5.3 Determinação da curva de calibração da <i>Kluyveromyces marxianus</i>	70
4.5.4 Determinação dos teores de açúcares, ácido acético e etanol.....	70
4.5.5 Determinação de compostos fenólicos	71
4.6 Metodologia para análise dos resultados	71
4.6.1 Determinação do rendimento de hidrólise enzimática.....	71
4.6.2 Determinação dos parâmetros fermentativos.....	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.1 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico e celulignina de palha de arroz a partir da combinação dos pré-tratamentos álcali seguido por ácido diluído	73
5.2 Obtenção do hidrolisado celulósico: hidrólise enzimática da celulignina da palha de arroz	79
5.3 Avaliação do crescimento do inóculo de <i>K. marxianus</i> nos hidrolisados (celulósico ou hemicelulósico) e seu impacto na fermentabilidade do hidrolisado celulósico.....	84
5.4 Avaliação da suplementação nutricional do hidrolisado celulósico na produção de etanol por <i>K. marxianus</i>	93
5.5 Reator <i>air-lift</i>	100
5.5.1 Parâmetros hidrodinâmicos.....	100
5.5.2 Fermentação em reator <i>air-lift</i>	106
6 CONCLUSÕES.....	113
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	114
REFERÊNCIAS.....	115

1 INTRODUÇÃO

No século 21, entre os assuntos de importância global, está a diminuição da utilização dos combustíveis fósseis no setor de transporte, provenientes do petróleo, os quais constituem uma fonte não renovável de energia e contribuem na emissão do dióxido de carbono, um dos principais gases causadores do efeito estufa. Nesse sentido, pesquisas vem sendo desenvolvidas para o emprego de fontes renováveis de energia para suprir todos os setores da sociedade, almejando a produção de energia de forma sustentável.

No setor de transporte como alternativa ao uso dos derivados de petróleo têm-se o etanol, que pode ser obtido a partir da biomassa lignocelulósica, especialmente os resíduos agroindustriais, que não competem com a produção de alimentos e apresentam em sua composição açúcares que podem ser bioconvertidos em etanol. A palha de arroz é um dos resíduos mais abundantes da atividade agrícola no mundo, sendo este um material lignocelulósico com potencial para a produção de bioetanol.

A palha de arroz é constituída principalmente pelos polissacarídeos de celulose e hemicelulose e a macromolécula de lignina. Para a produção de etanol a partir deste material é necessário a obtenção dos monômeros de açúcares presentes nas frações de celulose e hemicelulose, este processo envolve as seguintes etapas de: 1) pré-tratamento, 2) hidrólise (sacarificação) enzimática, 3) fermentação e 4) destilação.

O pré-tratamento pode ser classificado em químico, físico e biológico, e têm como objetivo reduzir a recalcitrância do material lignocelulósico, característica que dificulta a obtenção dos monômeros de açúcares dos polissacarídeos. A escolha do tipo de tratamento e/ou associação dos mesmos deve levar em conta as características físico químicas do material, pois cada pré-tratamento vai impactar de forma diferente na estrutura e composição da biomassa, podendo diminuir ou aumentar a quantidade de açúcares obtidos no final do processamento. Estudos sobre a palha de arroz têm demonstrado que a combinação dos pré-tratamentos alcalino e ácido proporciona bons rendimentos tanto na recuperação de açúcares presentes na hemicelulose como da celulose (hidrólise enzimática).

No processo de sacarificação enzimática a celulose presente na celulignina é despolimerizada a seus monômeros estruturais (glicose) através da ação sinérgica de enzimas celulolíticas (exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidade) produzindo um licor contendo glicose (hidrolisado celulósico). Um dos desafios desta etapa é operar com um alto teor de

sólidos insolúveis visando a obtenção de um hidrolisado com alta concentração de glicose, desta forma pode-se obter no caldo fermentado uma alta concentração de etanol facilitando a extração deste bioproduto e reduzindo, por consequência o custo da etapa de destilação.

Estudos revelam que o uso do teor de sólidos insolúveis superior a 10% (m/v) no processo de sacarificação enzimática acarreta no incremento da viscosidade do meio, dificultando a homogeneização do sistema. Algumas soluções estão sendo propostas para contornar este problema, como o uso de um reator do tipo moinho de bolas – não convencional, empregando um teor de 24%(m/v) de sólidos insolúveis para a hidrólise enzimática da palha de arroz por Castro, Mussatto e Roberto (2017) no qual obteve-se um licor com alta concentração de glicose.

A etapa de fermentação é um processo *in vivo*, portanto, deve fornecer condições ótimas para que o microrganismo cresça e gere o produto de interesse. A obtenção de etanol via fermentação pode ser realizada por leveduras, dentre elas a mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, outras leveduras não convencionais como a *Kluyveromyces marxianus* que tem despertado o interesse industrial por sua capacidade de crescer e fermentar com bons rendimentos em temperaturas superiores a 40°C, assimilar diferentes açúcares além de tolerar altas concentrações de etanol no meio de cultivo.

Um dos fatores que deve ser avaliado para a condução de um processo fermentativo em hidrolisado celulósico é a composição nutricional do meio que pode variar de acordo com o tipo de microrganismo. O excesso de nutrientes pode encarecer o bioprocessos, a falta de nutrientes, entretanto, pode limitar o crescimento celular e obtenção de etanol, logo, um estudo da composição nutricional do meio de cultivo torna-se necessário para maximizar a quantidade de etanol.

Além das condições nutricionais a avaliação dos parâmetros fermentativos são importantes para definir as condições operacionais do bioprocessos. De posse destes dados, é possível otimizar o processo e escolher de forma adequada o tipo de reator a ser utilizado. Para produção de etanol têm-se utilizado reatores como: coluna de bolhas e tanques agitados, mas existem outras configurações de reatores com potencial para o estudo da produção de etanol, como o reator *air-lift*.

O aproveitamento dos materiais lignocelulósicos para a obtenção de produtos de produtos de interesse industrial é uma das linhas de pesquisas conduzidas pelo Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP). Dentro deste

contexto este trabalho teve como objetivo avaliar a necessidade de suplementação nutricional do hidrolisado celulósico para produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 6860 e o desempenho fermentativo desta levedura em biorreator *air-lift*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Palha de arroz

A palha de arroz é um dos resíduos lignocelulósicos mais abundantes da atividade agrícola, sendo um subproduto gerado no campo após a colheita do grão, um dos principais cereais consumidos no mundo. No Brasil, estima-se a obtenção de 10,6 milhões de toneladas de arroz para a Safra 2019/20 (CONAB, 2019), uma vez que para cada quilograma deste grão colhido é gerado de 1 a 1,5 quilograma de palha, pode-se esperar a produção de 10,6 a 15,9 milhões de toneladas deste subproduto nesta safra.

A palha de arroz é classificada como gramínea, sendo composta basicamente pelas macromoléculas de celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1). A interação entre estes componentes confere a este material uma característica recalcitrante (CHEN *et al.*, 2011). A celulose é um polissacarídeo constituído por cadeias lineares compostas por moléculas de glicose unidas por ligações do tipo β -1,4. Os resíduos de glicose, têm rotação de 180°C em relação uns aos outros originando como unidade repetitiva deste polissacarídeo a celobiose. As cadeias lineares de glucana (celulose), se caracterizam por serem relativamente inflexíveis, e se assemelham a uma fita que interage umas com as outras através de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals formando as microfibrilas, que são estruturas semelhantes a um “fio” caracterizadas pela cristalinidade, alta resistência à tração e insolubilidade (SOREK, *et al.*, 2014). As microfibrilas de celulose podem formar regiões amorfas durante sua síntese, regiões não organizadas, que normalmente estão revestidas por hemicelulose as quais se unem à sua superfície por meio de ligações de hidrogênio (SOREK, *et al.*, 2014).

As hemiceluloses são cadeias curtas de polissacarídeos heterogêneos que podem ser lineares ou ramificados que diferem amplamente na composição entre tecidos e espécies vegetais. A cadeia principal desta macromolécula pode ser formada por pentoses (D-xilose e L-arabinose) e hexoses (D-manose, D- glicose e D-galactose) podendo conter ramificações de resíduos glicosil (SINGH; MISHRA, 1995; SOREK *et al.*, 2014).

Na palha de arroz, o principal componente das hemiceluloses são as xilanas. Nelas a cadeia principal é constituída por unidades de xilose, unidas por ligações do tipo β (1,4) os principais grupos das ramificações são: arabinosil, xilosil ou ácidos glucurônicos. Este

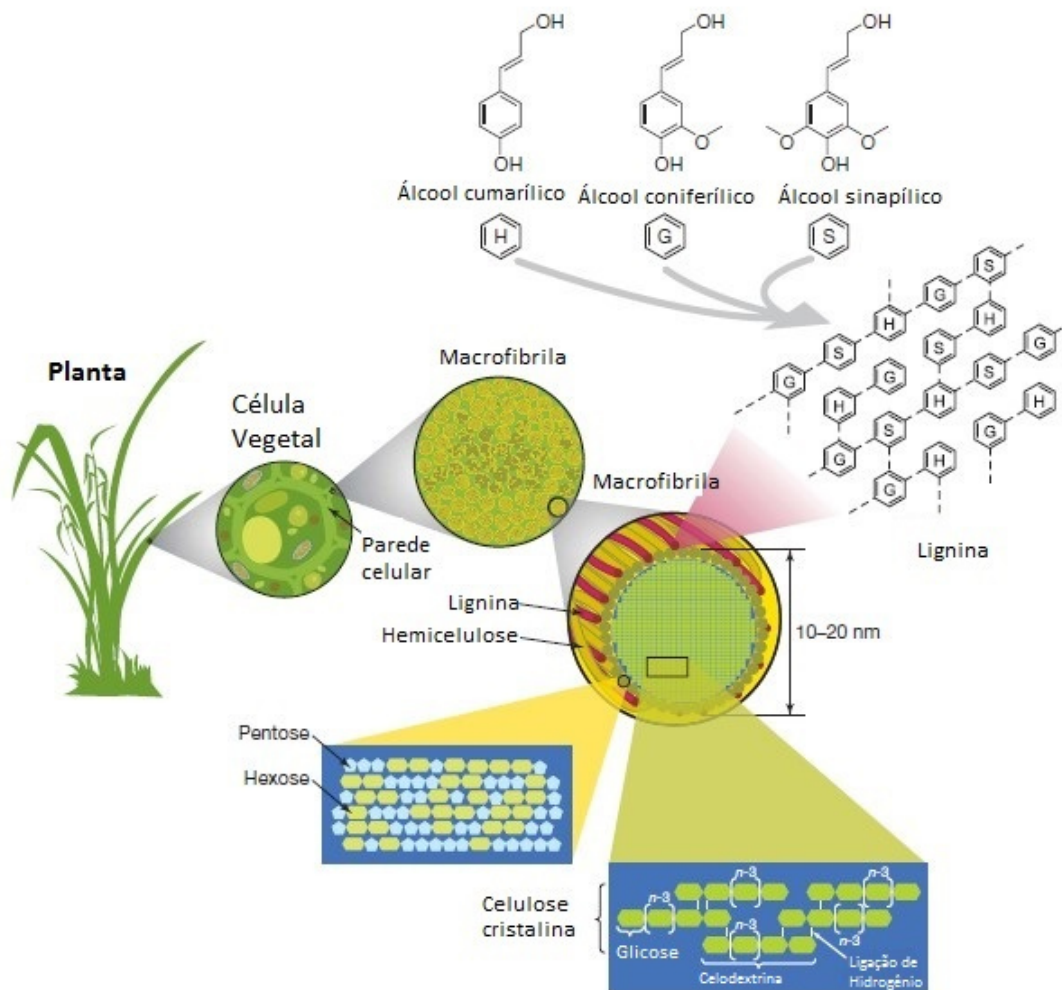
polissacarídeo contribui para a rigidez e flexibilidade da parede celular, pode ser considerado um agente de ligação cruzada pois as cadeias de hemicelulose se ligam as fibras de celulose, lignina, proteínas da parede celular, pectinas e polissacarídeos não estruturais através de interações covalentes e não covalentes (SINGH; MISHRA, 1995; SOREK *et al.*, 2014).

A lignina é um polímero amorfo e irregular composto por monômeros fenil-propano. Durante o crescimento do vegetal as unidades monoméricas da lignina (álcoois hidroxicinâmílicos: p-cumarílico, coniferílico e sinapílico) são secretadas durante a formação da parede celular em formação, estes monômeros se infiltram na matriz polissacarídica e se polimerizam pelo processo de radicais livres que leva a uma estrutura randômica. Como resultado esta estrutura forma uma barreira de proteção rígida em volta dos polissacarídeos que permite a formação de tecidos específicos para o transporte de água, dá suporte para o crescimento vertical, e previne a invasão patogênica na planta (SINGH; MISHRA, 1995; SOREK *et al.*, 2014).

De acordo com a literatura a palha de arroz pode apresentar em sua composição (%): 28-36 de celulose, 23-28 de hemicelulose, 12-14 de lignina e 14-20 de cinzas. As variações na quantidade destes componentes ocorrem pois a composição bioquímica da biomassa lignocelulósica é influenciada pelo tipo de solo, sazonalidade climática, região de plantio e o tempo de colheita (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2018; STAYAFTIKA; MATSUMURA, 2018). A composição desta matéria prima obtida na região de Canas (SP-BRA) foi determinada por Castro et al (2017) sendo os valores de (% m/m): 35,3±0,2 para a celulose, 23,8 ±0,4 hemicelulose, 13,1±0,7 de lignina insolúvel em ácido, 4,4±0,2 lignina solúvel em ácido e um teor de cinzas de 11,3±0,1.

Stayaftika e Matsumura. (2018) descrevem que a palha de arroz por apresentar um alto teor de celulose e de hemicelulose os quais podem ser hidrolisados em açúcares fermentescíveis, constitui uma matéria-prima com potencial para ser utilizada na produção de bioetanol.

Figura 1 - Estrutura da parede celular de um material lignocelulósico com seus principais componentes celulose, hemicelulose e lignina.



Fonte: Adaptado de Rubin (2008).

Para ser utilizada como matéria-prima para produção de bioetanol é necessário que este material seja submetido a algumas etapas de pré-tratamento (físico, químico ou a combinação de ambos) que normalmente são sucedidas por uma hidrólise enzimática, para solubilização dos açúcares monoméricos. As etapas de pré-tratamento visam diminuir a recalcitrância da biomassa lignocelulósica aumentando a área superficial dos polissacarídeos para a atuação de enzimas, desta forma a quantidade de monômeros de celulose e hemicelulose obtidos será maximizada (LI; ZHENG, 2018).

2.2 Pré-tratamentos

As características físico-químicas de um material lignocelulósico variam de acordo com o tipo de matéria-prima, por isso a escolha de um pré-tratamento deve levar em conta as propriedades do mesmo. As metodologias utilizadas para o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos podem ser classificadas em: biológicas, físicas, químicas e físico-químicas. A escolha de um ou a associação destes métodos deverá levar em conta o posterior uso do licor e/ou do resíduo sólido obtido no final do processo, isto porque cada metodologia proporciona uma mudança na estrutura da biomassa lignocelulósica, acarretando um grande impacto em termos de recuperação dos açúcares presentes na celulose e hemicelulose, toxicidade dos hidrolisados, eficiência de hidrólise enzimática e fermentação, assim como na demanda energética e no tratamento da água residual do processo (BINOD, *et al.*, 2010; CASTRO *et al.*, 2017; SUBHEDAR; GOGATE, 2014).

O pré-tratamento biológico se baseia na utilização de agentes biológicos, como os fungos de podridão parda e branca. Estes microrganismos secretam enzimas que degradam principalmente as macromoléculas de lignina e de hemicelulose, expondo a celulose presente no material lignocelulósico. Este procedimento oferece como vantagem o baixo uso de energia, ausência de uso de reagentes químicos e condições ambientais brandas. Entretanto, o tempo elevado de pré-tratamento frente às outras tecnologias limita seu uso. (SUN; CHEN, 2002).

Taniguchi *et al.* (2005) realizaram o pré tratamento biológico na palha de arroz empregando o fungo de decomposição branca: *Pleurotus ostreatus*. O experimento ocorreu por 72 dias e a palha utilizada nos ensaios continha 60% de água, no tempo 60 dias os autores observaram que ao comparar as porcentagens iniciais de lignina, celulose e hemicelulose na biomassa o fungo degradou seletivamente a lignina de ácido insolúvel (Klason) (41%) sendo os teores de celulose 83% e de hemicelulose 52%. Como conclusão os autores observaram que apesar do longo tempo, este fungo foi capaz de degradar a lignina e a hemicelulose seletivamente, e preservar as fração de celulose desta biomassa.

O tratamento físico da biomassa lignocelulósica compreende processos de trituração mecânica do material, estes proporcionam a redução no tamanho de partícula e na cristalinidade dos mesmos. Como consequência desta técnica, ocorre um aumento na

superfície de contato e porosidade da matéria prima, além disso ocorre a redução do grau de polimerização da celulose (ALVIRA *et al.*, 2010; BINOD, *et al.*, 2010).

A utilização de pré-tratamentos químicos podem empregar: bases, ácidos e solventes orgânicos (ALVIRA *et al.*, 2010). O emprego de uma etapa alcalina para tratar a biomassa lignocelulósica, segundo Carvalheiro, Duarte e Gírio (2008) causa uma solubilização efetiva da lignina e uma baixa solubilização da hemicelulose e celulose se comparado com processos hidrotérmicos ou ácidos. Neste tipo de pré-tratamento podem ser utilizados hidróxido de sódio, de cálcio, de potássio e de amônia. O hidróxido sódio causa a intumescência da fibra, aumentando a superfície interna da celulose e diminuindo seu grau de polimerização e de cristalinidade, como consequência ocorre a ruptura da estrutura da lignina, comparando este pré-tratamentos que empregam ácido ou reagentes oxidativos, o uso de base têm se mostrado mais efetivo para remoção das ligações ester entre lignina, hemicelulose e celulose evitando a fragmentação do polímero de hemicelulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Cheng *et al.* (2010) realizaram um pré-tratamento alcalino na palha de arroz moída (2 mm) empregando hidróxido de sódio. O experimento foi realizado na temperatura de 55°C nas cargas de 0, 2 e 4 g de NaOH /g de biomassa variando o tempo de reação de 1-3h. A composição inicial da palha de arroz *in natura* (% m/m): 36,32 celulose, 61,85 carboidratos, 3,53 lignina ácido solúvel, 14,07 lignina ácido insolúvel (17,6 lignina) e o teor de cinzas 18,01. Os autores verificaram que a maior carga e tempo de reação (4g NaOH/g biomassa - 3 h) promoveu a maior remoção de lignina 23%(m/m).

O emprego de ácidos para o tratamento da biomassa lignocelulósica visa, principalmente, à solubilização da fração hemicelulósica, fazendo com que a celulose fique mais acessível a atuação de enzimas (ZHU *et al.*, 2008). A utilização de ácido deve ser conduzida com cautela, pois a exposição do material lignocelulósico a soluções ácidas concentradas por um longo período de tempo e/ou à altas temperaturas pode favorecer a degradação de açúcares em furfural e hidróxi-metil-furfural, diminuindo a concentração de açúcares no licor obtido (hidrolisado hemicelulósico). Estes compostos têm um potencial efeito inibitório no metabolismo do microrganismo durante a etapa fermentativa para obtenção de bioprodutos como o etanol (HSU *et al.*, 2010, SAHA *et al.*, 2005).

Um estudo de Hsu *et al.* (2010) através do pré-tratamento com ácido sulfúrico na palha de arroz *in natura*, avaliou o efeito da remoção da hemicelulose na sacarificação enzimática do material pré-tratado. Os autores observaram uma correlação linear entre a

diminuição da hemicelulose (80-96%) na fração sólida pré-tratada e o rendimento de hidrólise enzimática. Segundo Hsu, Guo e Hwang (2010) uma explicação para este resultado, é que o desprendimento da xilana e a reestruturação da lignina no material pode ter resultado na maior exposição da estrutura da celulose levando a uma maior acessibilidade das enzimas celulolíticas a esta macromolécula.

O uso de solventes orgânicos como: metanol, etanol, acetona, etileno glicol é realizado por uma técnica denominada de “organosolv” que pode utilizar misturas destes solventes tendo como objetivo a solubilização da lignina. O uso desta técnica segundo Zhao, Cheng e Liu (2009) proporciona como vantagem a obtenção da lignina relativamente pura, praticamente inalterada, um subproduto de alto valor agregado além das macromoléculas de celulose e hemicelulose. Isto se torna interessante num contexto de biorrefinaria em que se considera a utilização de todos os componentes da biomassa.

O pré-tratamento empregando solventes orgânicos foi realizado por Amiri, Karimi e Zilouei (2014) em palha de arroz inicialmente composta por (% g/g): $49,2 \pm 1,2$ glucana, $29,2 \pm 1,4$ xilana, $3,5 \pm 0,2$ arabinana, $0,7 \pm 0,1$ lignina ácido solúvel, $16,3 \pm 1,3$ lignina ácido insolúvel e $6,7 \pm 0,2$ de cinzas. A palha foi moída ($833-177 \mu\text{m}$) e misturada com uma solução 75% (v/v) contendo etanol na proporção sólido:líquido de 1:8, como catalisador foi utilizado ácido sulfúrico 1% (g/g de palha). A reação ocorreu sob alta pressão em reator do tipo tanque agitado (500 mL) na temperatura de 150 ou 180°C por 30 ou 60 minutos. Os autores verificaram que a maior remoção de lignina ocorreu na temperatura de 180°C no maior tempo de reação 60 min (60%) obtendo uma palha pré-tratada contendo (% g/g): $62,2 \pm 1,2$ glucana, $22,4 \pm 0,6$ xilana, $1,9 \pm 0,4$ arabinana, $1,3 \pm 0,1$ lignina ácido solúvel e $9,8 \pm 0,2$ lignina ácido insolúvel e $7,5 \pm 0,2$ de cinzas, com uma recuperação de sólidos de $66,9 \pm 1,0\%$ (g/g).

Dentre os pré-tratamentos físico-químicos pode-se citar: a explosão a vapor com SO₂, o uso de água líquida quente, explosão da fibra com amônia (AFEX). A explosão a vapor com SO₂ é uma metodologia amplamente aplicada na biomassa lignocelulósica. Nesta técnica a matéria-prima é sujeita a altas pressões de vapor, e logo após despressurizada. O efeito mecânico é a separação das fibras causada pela variação súbita da pressão. Em altas temperaturas ocorre a auto-hidrólise, ou seja, forma-se ácido acético a partir dos grupos acetil presentes na estrutura da biomassa. A água também atua como um ácido em altas temperaturas. Neste pré-tratamento ocorre uma solubilização e hidrólise parcial da hemicelulose, e a lignina é parte redistribuída e parte removida (PAN *et al.*, 2005). Além

disso, de acordo com Alvira *et al.*, (2010) uma das consequências da explosão a vapor com SO₂ é a formação de produtos de degradação do açúcar como furfural e 5-hidroximetil-furfural e além da produção de ácidos fracos e compostos fenólicos provenientes da lignina que podem afetar na etapa de hidrólise e de fermentação.

No AFEX (Expansão da fibra em amônia) a biomassa é submetida a amônia anidra líquida em alta temperatura e alta pressão. Este método faz com que todos os componentes da biomassa permaneçam na fração sólida (BINOD *et al.*, 2010). Para avaliar o efeito mecânico do tratamento AFEX com amônia na estrutura da palha de arroz Blümmel *et al.* (2018), realizaram a hidrólise enzimática do material *in natura* e após o pré-tratamento. Partículas de 2-5 cm de palha de arroz foram colocadas em cestos (teor de umidade 20-25%) e inseridas em reator do tipo tubo com leito embalado, a reação ocorreu em cinco etapas 1) pré-vapor (90-100°C); 2) carregamento com amônia (1 Kg de amônia por Kg de biomassa, temperatura no topo do reator 40-45°C, na base 100-110°C, pressão de 1,4 M Pa); 3) imersão (30 min, 35-45°C); 4) despressurização e 5) faixa de vapor. A hidrólise enzimática foi realizada em frasco erlenmeyer (1/2,8L), sob agitação (150 rpm) à 50°C por 72h empregando um coquetel contendo celulase e hemicelulose 50:50, na carga de 20mg de enzima por grama de celulose utilizando um teor de 5% de sólidos. Os autores observaram que na palha *in natura* atingiu-se 31% do rendimento teórico de hidrólise da celulose e 10% da hemicelulose, em contrapartida após o pré-tratamento o resultado foi de 87% para ambas macromoléculas, demonstrando que este pré-tratamento é eficaz na recuperação dos monômeros de açúcares presentes nas macromoléculas de celulose e hemicelulose.

Um outro tipo de tratamento é o hidrotérmico que emprega água, este líquido sob alta pressão e temperatura pode penetrar na biomassa hidratando a celulose, e, removendo a lignina e hemicelulose, aumentando desta forma a área superficial e a acessibilidade da macromolécula de celulose às enzimas celulolíticas (CHANDRA; TAKEUCHI; HASEGAWA, 2012). Stayaftika e Matsumura (2018) realizam o tratamento hidrotérmico com água quente deionizada na palha de arroz (< 500 µm) composta por (% g/g): 55,0 hemicelulose, 28,0 celulose, 11,0 lignina e 6,0 cinzas em reator do tipo tanque agitado. O experimento foi realizado utilizando 10g de biomassa e 80 mL de água deionizada por 30 minutos sob agitação (600 rpm) nas temperaturas de 150, 150,180, 200,230 e 250°C. Os autores observaram que para todas as temperaturas utilizadas durante o experimento somente o pré-tratamento hidrotérmico não foi capaz de solubilizar a celulose presente na palha de arroz, no entanto após o pré-tratamento a celulose presente no material se tornou mais

acessível às enzimas celulolíticas sendo o melhor resultado de hidrólise enzimática obtido no material resultante do emprego desta técnica à 180°C.

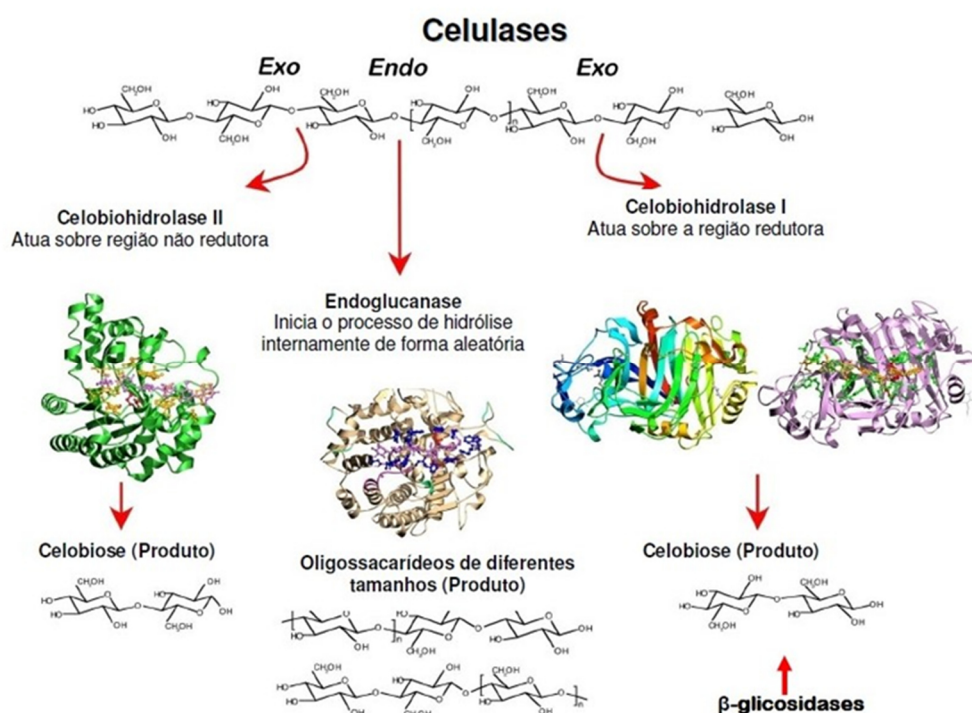
A combinação de técnicas de pré-tratamentos têm sido empregadas para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática, por exemplo, Subhedar e Gogate (2014), utilizaram o ultrassom concomitantemente ao tratamento alcalino na palha de arroz para intensificar o processo de deslignificação deste material. A técnica do ultrassom em meio aquoso gera a cavitação que produz condições de alta temperatura, pressão, e alta força de cisalhamento. A decomposição da molécula de água em radicais livres por causa da cavitação, auxilia na clivagem das ligações da rede formada entre a lignina e xilana. A irradiação ultrassônica causa a homólise da ligação lignina-carboidrato, liberando lignina. Esta pode ser uma solução para algumas limitações metodologia alcalina como tempo relativamente longo de pré-tratamento e o consumo de mais álcali para uma alta taxa de deslignificação.

Para incrementar a recuperação dos monômeros de açúcares na palha de arroz da hemicelulose e celulose e diminuir a quantidade de inibidores presentes no hidrolisado, Castro *et al.*, (2017) estudaram a utilização de uma etapa alcalina branda (desacetilação) variando a concentração de NaOH (20 – 80 mg de NaOH /g de biomassa) em diferentes temperaturas (50°C-70°C) seguida por um tratamento com ácido diluído com H₂SO₄ (0,5-1,5 % p/v) com os tempos de reação variando de 30-90 minutos. A etapa alcalina teve como objetivo principal a remoção dos grupos acetil, os quais estão presentes na estrutura da biomassa sendo solubilizados durante a hidrólise ácida atuando como inibidor na etapa de fermentação do hidrolisado hemicelulósico para produção de etanol por leveduras. Os autores verificaram que a melhor condição de tratamento alcalino foi a 70°C, com 80mg NaOH/g de biomassa, no qual houve a remoção de 98,8% de grupos acetil, 42,7% de lignina e 59,4% de cinzas com uma baixa perda de glucana (1,2%) e de hemicelulose (7,7%). Além de grupos acetil, esta etapa removeu uma quantidade significativa de lignina e cinzas, que também proporciona uma melhor eficiência na hidrólise enzimática da celulose. A melhor condição na etapa ácida (121°C, 1,0% p/v de H₂SO₄ por 85 min) apresentou uma eficiência de hidrólise de 75,9% da hemicelulose com baixa concentração de ácido acético e compostos fenólicos.

2.3 Hidrólise enzimática

A hidrólise da celulose em açúcares fermentescíveis compreende a ação sinérgica das enzimas: endoglucanases, exoglucanases (celobiohidrolases) e β -glicosidases, que atuam em diferentes pontos da cadeia deste polissacarídeo (Figura 2). As endoglucanases iniciam o processo de hidrólise clivando internamente a macromolécula de celulose em partes randômicas, expondo pontas redutoras e não redutoras deste polissacarídeo. As celobiohidrolases atuam nestas pontas redutoras e não redutoras expostas, liberando celo-oligossacarídeos e unidades de celobiose. Por fim, as β -glicosidases clivam o dissacarídeo de celobiose liberando duas moléculas de glicose (SOREK *et al.*, 2014; SRIVASTAVA *et al.*, 2018).

Figura 2 - Mecanismo de ação das celulases



Fonte: SANTANA (2010).

Algumas celulases são compostas por dois domínios, um responsável pela ligação ao substrato (DLS) e outro que abriga o sítio ativo (domínio catalítico – DC). O domínio de ligação do substrato está associado a adsorção da enzima ao substrato por meio de ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e/ou interações hidrofóbicas. Já o sítio ativo têm por

função hidrolisar partes específicas da cadeia polissacarídea (MARTINS; RABELO; COSTA, 2005).

A composição físico-química e estrutural dos materiais lignocelulósicos, formada pela interação das macromoléculas de celulose, hemicelulose e lignina, dificultam o acesso das celulasas ao polissacarídeo de celulose (MANSFIELD; MOONEY, SADDLER, 1999). A lignina na biomassa lignocelulósica é responsável pela rigidez, integridade e previne o inchamento destes materiais, logo a composição desta macromolécula assim como sua distribuição na biomassa constitui o fator de maior impacto na recalcitrância destes materiais à hidrólise enzimática das moléculas de carboidratos (celulose e hemicelulose). Como consequência disso, o processo de deslignificação pode melhorar o rendimento de hidrólise enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Um estudo realizado por Ahmed *et al.* (2016) avaliou o efeito da remoção da lignina na palha de arroz através do pré-tratamento com persulfato de potássio na hidrólise enzimática. Foram realizados ensaios de pré-tratamento na proporção sólido: líquido de 1:10, variando o tempo de reação (0,5 – 3 h), temperatura (80-140°C) e concentração do persulfato de potássio (5-100 mM). O material sólido resultante de cada ensaio foi submetido à hidrólise enzimática empregando 5% de sólidos utilizando o coquetel enzimático Cellic C-Tec (Novozymes) na carga enzimática de 25,2 FPU/g de biomassa, na temperatura de 50°C, à 200 rpm por 72h. Os autores verificaram que o pré-tratamento à 120°C, 75 mM de persulfato de potássio por 2h promoveu a maior remoção da lignina da palha de arroz (10,15%) assim como o maior incremento de rendimento da hidrólise enzimática da celulose de 32% (palha *in natura*) para 91% (palha após o pré-tratamento). A razão para a melhora da hidrólise pela remoção da lignina pode estar atrelado a uma melhor superfície e acessibilidade das enzimas celulolíticas à celulose, pelo aumento do número de poros no material após a remoção da lignina (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Além da lignina a hemicelulose presente na biomassa lignocelulósica também pode prejudicar na etapa de hidrólise enzimática da celulose, uma vez que esta macromolécula envolve as fibras de celulose, atuando como uma barreira física, protegendo-a da ação enzimática. Hsu *et al.* (2010) avaliaram a hidrólise enzimática da palha de arroz pré-tratada com ácido sulfúrico. O tratamento ocorreu sob diferentes condições de: temperatura (160,180 e 190°C), concentração de ácido (0,5-1,0%) e tempo de reação (1-25 min). O sólido obtido de cada ensaio foi submetido à hidrólise enzimática utilizando um teor de 2% de sólidos em tampão acetato de sódio (pH 4,8) empregando as enzimas: Celluclast na carga de

10 FPU/g de biomassa seca e Novozyme 188 na carga de 15 IU/ g de biomassa, as hidrólises foram realizadas em frascos erlenmeyers (250/50 mL) sob agitação (100 rpm) por 72 h. Os autores observaram uma correlação linear da remoção de xilose (faixa de 80-96%) com o rendimento de hidrólise enzimática (quantidade máxima de 25g de glicose para 100g de biomassa seca) obtido a partir da biomassa após o pré-tratamento. Em geral, o pré-tratamento ácido hidrolisa principalmente a xilana que envolve a celulose e a lignina ácido solúvel. Logo desprendimento da xilana e a reestruturação da lignina no material pode ter resultado na maior exposição da estrutura da celulose levando a uma maior acessibilidade das enzimas celulolíticas a esta macromolécula.

A sílica presente no material lignocelulósico pode atuar negativamente na hidrólise da celulose adsorvendo as enzimas celulolíticas por interações eletrostáticas e/ou ligações de hidrogênio. Isto foi demonstrado por um estudo de Taluker, Goh e Pua (2017), que conduziram testes de hidrólise enzimática (coquetel celulolítico Cellic CTec2) em celulose cristalina (Avicel PH-101) na presença e na ausência de pó de sílica amorfa, que é a forma comumente encontrada nos materiais lignocelulósicos. Os autores observaram que a hidrólise da celulose (concentração enzimática de 11 FPU/g avicel, 50 °C, em tampão acetato 50 mM pH 5,0 e 10 mg/ mL de sílica) foi reduzida de 52% para 32% em 120h, na presença de sílica.

Uma alta conversão dos polissacarídeos de celulose e de hemicelulose em seus respectivos monômeros é necessária para que a produção de biocombustíveis a partir da biomassa lignocelulósica seja viável economicamente, um dos motivos reside na necessidade da obtenção de uma alta concentração de etanol durante o processo fermentativo para um baixo consumo energético na etapa de destilação (LI; ZHENG, 2018; RAMACHANDRIYA *et al.*, 2013). Kristensen, Felby e Jørgensen (2009), relatam que para alcançar uma alta concentração de açúcares no hidrolisado celulósico é necessário a realização da hidrólise enzimática com um alto teor de sólidos. No entanto, a utilização de uma carga de sólidos maior que 10% (m/v) limita a transferência de massa e de calor do sistema devido ao incremento da viscosidade do mesmo dificultando a mistura do meio reacional.

A dificuldade de homogeneização do sistema contendo um alto teor de sólidos foi verificado por Ramachandriya *et al.* (2013) que avaliaram o rendimento da hidrólise enzimática do cedro oriental (*Juniperus virginiana L.*) pré-tratado com bissulfito ácido nos

teores de sólidos (m/m): 16 e 20 % na presença e ausência de 20 esferas de aço inoxidável (6,5 mm). Os testes foram realizados em frascos sob agitação de 250 rpm, a 50°C, utilizando a enzima Accelerase^R (Genencor) na carga de 46 FPU/g de glucana, no período de 144h. Os autores verificaram que o aumento do teor de sólido proporcionou o incremento da concentração de glicose no hidrolisado celulósico, o uso das esferas para as concentrações de sólido de 16 e 20 % (m/m) acarretou no aumento do rendimento de hidrólise de 78 para 84% na carga de 20% e uma concentração máxima de glicose de 126 g/L.

Para produzir um licor com alto teor de glicose os autores Hodge *et al.*, (2009) realizaram um estudo para realização da sacarificação enzimática com alto teor de sólidos (25% m/m) da palha de milho em reator do tipo tanque agitado. Os autores verificaram que utilizando teores maiores de 15% (m/m) de palha no reator (Bioflo 3000, New Brunswick – 7L), a taxa de transferência de massa e de calor do meio reacional ficou prejudicada, logo para garantir uma homogeneização adequada do sistema com o teor final de sólidos de 25 % (m/m) a hidrólise enzimática foi realizada em batelada alimentada, sendo a principal vantagem desta técnica é a simulação no reator uma concentração de sólidos menor, uma vez que a adição de palha é realizado conforme ocorre a hidrólise da celulose, desta maneira estende -se a capacidade operacional do reator sem prejudicar o desempenho do mesmo. A palha de milho foi pré-tradada com ácido sendo sua composição final (% g/g): 53,2 celulose, 31,7 lignina, 7 hemicelulose, 7 cinzas, 3,7 proteínas e 1,1 acetado, para o processo de sacarificação foi utilizado o coquetel enzimático Spezyme CP (Genencor Internacional) na carga de 10,7 FPU/g de celulose. O experimento ocorreu em reator tipo tanque agitado (400 rpm) à 45°C utilizando tampão citrato de sódio (pH 4,8), em batelada alimentada sob formas de alimentação no reator. Na primeira (F1) a reação iniciou-se com 12% (m/m) de palha sendo a alimentação iniciada com este teor e aumentando até 15% (m/m) até atingir em 216h o teor de sólidos insolúveis de 25% (m/m). Na segunda (F2) o teor de palha inicial foi de 15% (m/m) sendo a alimentação do reator realizada com o mesmo teor de palha (15 % m/m) até a concentração final de sólido insolúvel no reator atingir 25% (m/m), o tempo dispendido para atingir este teor de palha foi 120h. Para a alimentação utilizou-se palha de milho e enzima na proporção 10,7 FPU/ g de celulose, de acordo com o teor de sólido empregado. Os autores observaram que as reações de sacarificação empregando ambos modelos de alimentação atingiram uma conversão de aproximadamente 80% da celulose, proporcionando uma concentração de glicose na fase líquida maior que 130 g/L. O modelo

de alimentação F1 demonstrou uma taxa de sacarificação menor que F2 isto foi atribuído por Hodge *et al.* (2009) ao longo tempo dispendido para a alimentação (216 h).

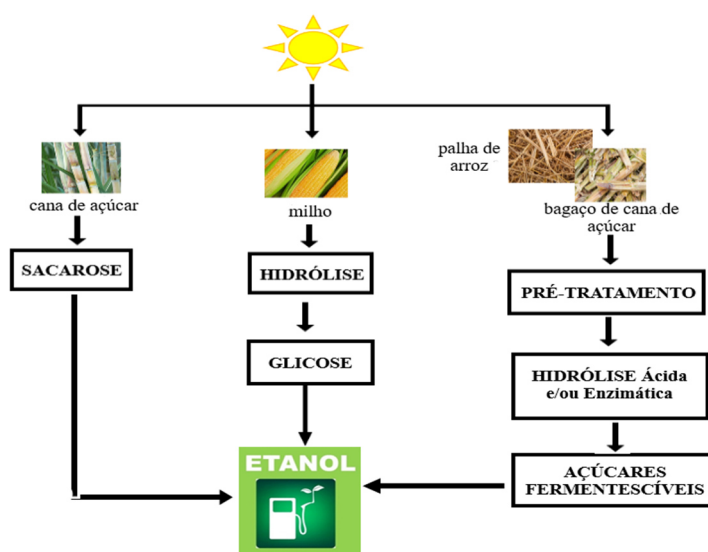
2.4 Tecnologias para produção de etanol de segunda geração

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos têm sido uma alternativa a demanda crescente de energia nos setores industriais e doméstico em consequência ao aumento da população e bens de consumo. Os maiores produtores mundiais de etanol no ano de 2018 foram os Estados Unidos com 16,1 bilhões de galões seguido pelo Brasil com 7,95 bilhões de galões (FU *et al.*, 2019; GARCIA, 2019).

A matéria prima mais utilizada para a produção de etanol no Brasil é a cana de açúcar seguida pelo milho, nos EUA o milho, no entanto como estes produtos agrícolas também são empregados para fins alimentícios questões têm sido levantadas quanto as consequências do incremento de produção deste biocombustível como a diminuição da quantidade de alimentos disponível para consumo assim como da área plantada para produção destes e outros produtos de origem vegetal (KARAGOZ, BILL, OZKAN, 2019; PANDIYAN *et al.*, 2019).

O bioetanol produzido a partir de materiais compostos por sacarose (cana de açúcar, beterraba, sorgo), amido (milho, trigo, mandioca, cevada) é comumente denominado de primeira geração. Quando a obtenção deste biocombustível ocorre por meio da biomassa lignocelulósica que compreende resíduos da agricultura (i.e bagaço de cana de açúcar, palha de arroz, de trigo, de milho), *switchgrass*, alfafa e a biomassa florestal (madeira dura e mole), este é denominado de segunda geração (Figura 3) (TOOR *et al.*, 2020, KARAGOZ, BILL, OZKAN, 2019).

Figura 3 - Materiais e etapas envolvidas para produção de etanol.



Fonte: Modificado TOOR *et al.* (2020).

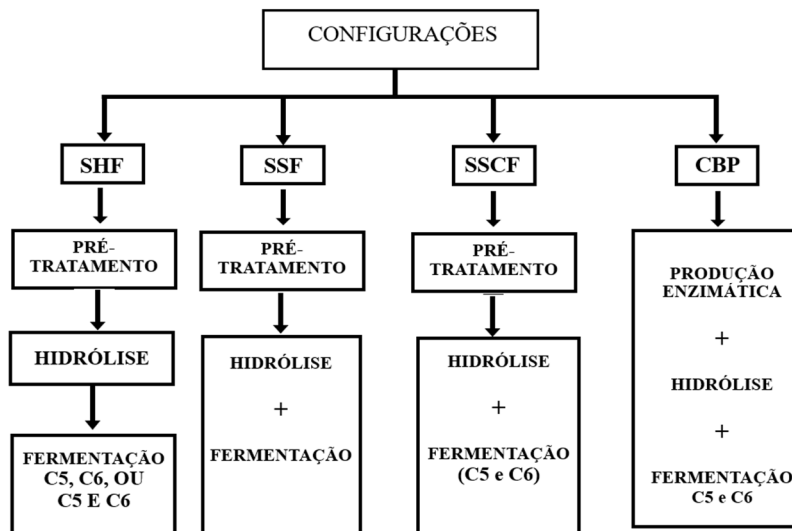
O uso de resíduos agrícolas para produção de etanol têm despertado o interesse devido sua grande disponibilidade e da composição destes materiais ser basicamente as macromoléculas de lignina e dos polissacarídeos de celulose e hemicelulose que uma vez convertidos em seus monômeros de açúcares podem ser utilizados em processos fermentativos para obtenção deste biocombustível (TOOR *et al.*, 2020).

A bioconversão dos materiais lignocelulósicos em etanol envolve basicamente três etapas, iniciando pela hidrólise da celulose e hemicelulose para obtenção dos monômeros de açúcares presentes nestas frações: glicose (celulose) e xilose (hemicelulose), seguido por uma etapa de fermentação empregando os licores contendo glicose, xilose ou ambos açúcares para produção de etanol encerrando o processo com a destilação e purificação deste bioproduto (TOOR *et al.*, 2020, ALVIRA *et al.*, 2010).

Dentre as configurações de processo para obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos pode-se citar (Figura 4): (1) hidrólise e fermentação em separado (SHF – *Separate Hydrolysis and Fermentation*), (2) sacarificação e fermentação simultânea (SSF – *Simultaneous Saccharification and Fermentation*), (3) sacarificação e co-fermentação simultânea (SSCF – *Simultaneous Saccharification and Co-fermentation*) e (4) processo consolidado de produção, que envolve a combinação dos eventos biológicos: produção de enzimas sacarolíticas, conversão das macromoléculas de celulose e hemicelulose em glicose

e xilose respectivamente, fermentação destes açúcares para produção de etanol (CBP-*Consolidate bioprocess*)

Figura 4 - Configurações de processo para produção de etanol de segunda geração.



Fonte: Modificado TOOR, *et al.* (2020)

Dentre as configurações citadas da Figura 4, as que podem empregar o hidrolisado celulósico, composto em maior parte de (hexose- C6) são: a hidrólise e fermentação em separado (SHF) e a hidrólise e fermentação simultânea (SSF) sendo o bioproduto obtido comumente denominado de etanol celulósico. No processo SHF, o microrganismo é inoculado após a etapa de hidrólise. Esta técnica apresenta como vantagem a possibilidade de realizar o processo de sacarificação (hidrólise) e de fermentação em sua condição ideal, a hidrólise 45-50°C e a fermentação a 30°C. Uma das desvantagens desta técnica é que na etapa de hidrólise ocorre a inibição das enzimas celulolíticas pelo produto (glicose e celobiose) (HAMELINCK; VAN HOOIDONK; FAAIJ, 2005).

No processo SSF a hidrólise enzimática da celulose em seus monômeros de glicose ocorre concomitantemente com a fermentação deste açúcar pelo microrganismo em etanol, a vantagem deste processo no consumo contínuo da glicose do meio, um vez que é relatado na literatura o processo de inibição das enzimas celulolíticas pelo produto (HAMELINCK; VAN HOOIDONK; FAAIJ, 2005). Uma desvantagem desta etapa é que a hidrólise pode ocorrer em uma temperatura menor que a ideal, pois sua escolha depende microrganismo empregado no processo.

Normalmente, o microrganismo utilizado na etapa fermentativa do hidrolisado celulósico é a *Saccharomyces cerevisiae*, porém espécies *Kluyveromyces marxianus* de têm despertado o interesse devido sua capacidade de metabolizar diferentes açúcares em temperaturas elevadas (maiores que 40°C).

2.5 *Kluyveromyces marxianus*

A *K. marxianus* é um fungo unicelular, homolático, pertencente a subclasse dos hemiascomicetos (LANE; MORRISEY, 2011). Este microrganismo foi isolado a partir de uvas por Marx (por isso o nome *marxianus*) e descrito por E. C. Hansen em 1988, pela primeira vez onde recebeu o nome de *Saccharomyces marxianus* (FONSECA *et al.*, 2008). Esta cepa é filogeneticamente semelhante a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Kluyveromyces lactis*. A maior semelhança entre a *K. lactis* e a *K. marxianus* é a capacidade de utilizar a lactose como fonte de carbono, a *S. cerevisiae*, entretanto não é capaz metabolizar este carboidrato (LANE; MORRISEY, 2010).

A característica de metabolizar diferentes açúcares (ie, glicose, lactose, frutose) faz com que esta levedura possa ser encontrada em diversos produtos de uso diário como iogurtes e queijos. Por crescer em diversos habitats e possuir um histórico de associação segura com produtos alimentícios, a *K. marxianus* é reconhecida como GRAS (*Generally Regarded As Safe* – geralmente reconhecida como segura) nos Estados Unidos pelo departamento FDA (*Food and Drug Administration*) e QPS (*Qualified Presumption of Safety*-segurança qualificada presumida) na União Européia (LANE; MORRISEY, 2010). Somando a esta característica está a capacidade de crescer em temperaturas maiores que 52°C, assim como apresentar uma alta taxa de crescimento (FONSECA *et al.*, 2008).

Os autores Fonseca, Carvalho e Gombert (2013) estudaram o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 em diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, xilose ou celobiose) nos meios definidos contendo (g/L): (NH₄)₂SO₄, 5,0 ; KH₂PO₄, 3,0 ; MgSO₄·7H₂O, 0,5 e os elementos traços (mg/L): EDTA, 15; ZnSO₄·7H₂O, 4,5 ; MnCl₂·2H₂O, 0,84 ; CoCl₂·6H₂O, 0,3; CuSO₄·5H₂O, 0,3; Na₂·MoO₄·2H₂O, 0,4; CaCl₂·2H₂O, 4,5; FeSO₄·7H₂O, 3,0; H₃BO₃, 1,0; KI, 0.1. Os experimentos foram realizados utilizando uma das fontes de carbono (hexose ou pentose) na concentração de 10,0 g/L em bioreator Biostat B (*Braun Biotech International*), sob agitação

(de 700 a 1100 rpm) de modo que a concentração de oxigênio dissolvido no meio durante o processo estivesse acima de 60%, nas temperaturas de 30 e 37 °C. Segundo os autores, não foi observado crescimento da cepa em meio contendo xilose ou celobiose a 30°C, nesta temperatura, a máxima velocidade específica de crescimento foi em glicose (μ_{\max} 0,49 h⁻¹) nos demais açúcares (frutose, sacarose, lactose e galactose) o valor médio observado foi 0,41 h⁻¹. Na temperatura de 37°C o maior μ_{\max} ocorreu em glicose, 0,45 h⁻¹, para frutose, sacarose e lactose a velocidade específica de crescimento média foi equivalente a relatada em 30 °C (0,41 h⁻¹), no entanto em galactose os autores relatam uma queda de μ_{\max} para 0,31 h⁻¹.

Rodrussamee *et al.* (2011) avaliaram a habilidade de crescimento de *K. marxianus* a DMKU3-1042 em hexoses e pentoses. Para o estudo do crescimento da cepa, a pré cultura (preparada em meio *YPD* sob agitação -160 rpm à 30°C) foi inoculada em frascos erlenmeyers (300/ 100 mL de meio), sob agitação (160 rpm) nas temperaturas de 30, 40 e 45°C. Os meios utilizados foram compostos por uma fonte de carbono (g/L): 10 extrato de levedura, 20 peptona, 20 de glicose, manose, galactose, xilose ou arabinose. Também foi avaliada a combinação de 20 g/L de glicose com 20 g/L de manose, galactose, xilose ou arabinose. Os autores observaram que nos meios contendo uma fonte de carbono em todas as temperatura testadas a *K. marxianus* DMKU3-1042 foi capaz de metabolizar o açúcar (hexose ou pentose) e produzir biomassa. No entanto, com aumento de temperatura observou-se um decréscimo gradual do crescimento celular desta cepa. Nos testes em que foi utilizada a combinação da glicose com outro açúcar notou-se que à 30°C com exceção da manose que foi consumida simultaneamente, a outra fonte carbono disponível só foi metabolizada após toda glicose ser exaurida do meio. Na temperatura de 40°C e 45°C, não foi observado o consumo de xilose e arabinose pela levedura, mesmo após o esgotamento de toda glicose no meio.

Fisiologicamente as leveduras podem ser classificadas como aeróbias, facultativas ou respiro-fermentativas, a *Kluyveromyces marxianus* assim como a *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura respiro-fermentativa, ou seja, pode produzir energia (ATP) tanto pela via metabólica do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) como pela via fermentativa. Normalmente são classificadas como Crabtree negativa, este efeito Crabtree avalia o comportamento metabólico de um microrganismo exposto a diferentes concentrações de açúcares, mantendo-se a quantidade de oxigênio disponível no meio constante. Denomina-se Crabtree positivo o microrganismo que em alta concentração de açúcar a via metabólica do ácido tricarboxílico é inibida, observando-se no meio produtos da via fermentativa (i.e

etanol). Quando não ocorre inibição do ciclo de Krebs em alta concentração de açúcar o microrganismo é caracterizado como Crabtree negativo. Alguns autores classificam a *K. marxianus* como Crabtree negativa, no entanto há controvérsias, pois há autores que a classifica como Crabtree positiva (LANE; MORRISEY, 2010).

O bioetanol é um produto da via fermentativa, no qual leveduras como a *K. marxianus* em condições onde há baixas concentrações ou ausência de oxigênio, açúcares como a glicose, são catabolizados a moléculas com menor energia potencial (i. e, etanol) e parte da energia liberada no processo é armazenada pela célula na molécula de ATP (NELSON; COX, 2011).

Devido sua capacidade de assimilar diferentes carboidratos, Das *et al.*, (2016) avaliaram a produção de etanol por *K. marxianus* NCIM 3217 a partir da lactose. Para o estudo foi utilizado pó de soro de leite e o meio empregado apresentou a seguinte composição (g/L): lactose, 150; extrato de malte, 3; extrato de levedura, 3; peptona, 5; sulfato de amônia, 2; dihidrogênio ortofosfato de potássio, 1. A fermentação foi conduzida em frasco erlenmeyer, à 35°C, sob agitação (100 rpm) por 72h, sendo a concentração de células inicial de aproximadamente 3 g/L. Os resultados revelaram que esta cepa *K. marxianus* NCIM 3217 foi capaz metabolizar a lactose do meio (72h), sendo observado a máxima produção de etanol 43,71 g/L e biomassa 6,02 g/L em 68h.

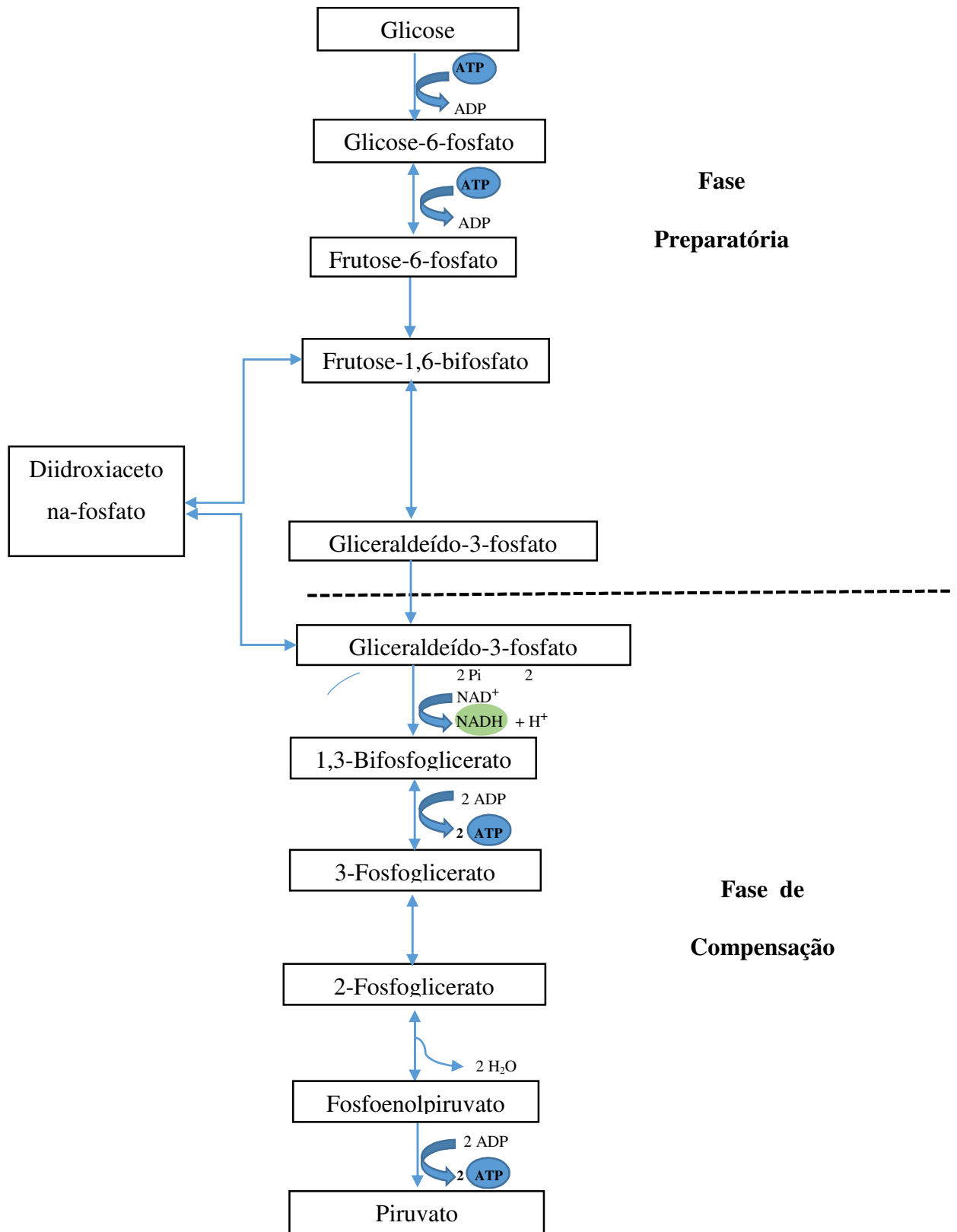
Nitiyon *et al.* (2016) avaliaram a cepa termotolerante *K. marxianus* BUNL-21 em termos de conversão da xilose em etanol. A fermentação foi realizada em frascos erlenmeyers (100/30 mL de meio) em meio contendo (g/L): 10, extrato de levedura, 20, peptona, 20 de xilose, na temperatura de 30 ou 37°C, sob agitação (160 rpm). Para o estudo do efeito dos inibidores foi empregada a concentração de 10mM de HMF ou furfural no meio descrito anteriormente. Os autores verificaram que o consumo de xilose ocorreu mais rapidamente à 37°C (36h) do que à 30°C (48h), porém houve um decréscimo na concentração de etanol no meio com o aumento da temperatura (30°C- 2,9 g/L e 37°C-2,6 g/L), ao final da fermentação foi observada uma alta concentração de ácido acético sendo 8,1 e 7,8 g/L para 30 e 37°C, respectivamente. Nitiyon *et al.* (2016), sugerem que a alta produção de ácido acético pode ter influenciado na baixa concentração de etanol obtida.

A produção de etanol celulósico por *K. marxianus* ATCC 36907 foi avaliada por De Barros *et al.* (2017) através da técnica de sacarificação e fermentação simultânea, variando a concentração de sólidos, na temperatura de 40°C sob agitação (150 rpm). A biomassa

(bagaço do pseudo fruto de caju) foi sequencialmente pré-tratada com ácido sulfúrico e álcali (NaOH) após estas etapas a maior parte da hemicelulose presente no material *in natura* foi solubilizada (65,8%) durante a hidrólise ácida e cerca de 64,2% da lignina foi removida na etapa alcalina. Para o processo de sacarificação e fermentação simultânea os autores empregaram o teor de sólidos de 7,5 e 15% (m/v) as enzimas utilizadas foram Celluclast 1,5 L e a β -glicosidase na carga de 30 FPU/g de celulose e 60 CBU/g de celulose. Os experimentos foram realizados em frascos (250 mL/ 100 mL de meio) em tampão citrato 50 Mm no pH 4,5- 5,0 em meio suplementado com (g/L): extrato de levedura, 1 e; sulfato de amônio, 1; na temperatura de 40°C sob agitação (150 rpm). A quantidade de células de *K. marxianus* inicial foi de 5 g/L. Os resultados revelaram um incremento na concentração de etanol de 29,4 para 58,7 g/L com o aumento do teor de sólidos, sendo que a maior produtividade volumétrica, 2,34 g/L.h foi obtida empregando 15%(m/v), demonstrando a termotolerância desta cepa e sua característica de tolerar altas concentrações de etanol no meio. Os autores não observaram mudanças significativas da xilose presente no meio, comprovando estudos de Rodrussamee *et al.* (2011) que relatam a repressão causada pela presença de glicose no consumo de xilose por esta cepa.

A rota metabólica para a produção de etanol é composta por duas etapas, na primeira (glicólise) a glicose é catabolizada em uma série de reações químicas a duas moléculas de piruvato, na segunda etapa, o piruvato é convertido em etanol e gás carbônico. A glicólise pode ser dividida em duas fases, inicialmente ocorre o consumo de duas moléculas de ATP e a formação de duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato. Na fase posterior há a formação de quatro moléculas de ATP, duas do cofator reduzido NADH + H⁺ e duas de piruvato (Figura 5) (NELSON; COX, 2011).

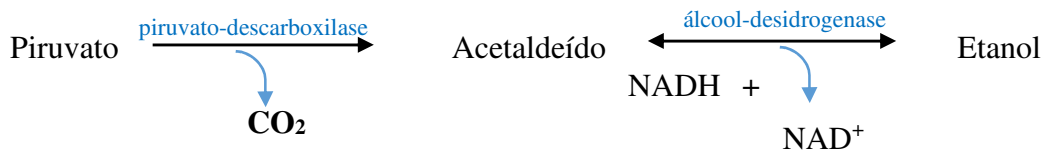
Figura 5 - Glicólise – fase preparatória e fase de compensação



Fonte: Modificada de NELSON; COX (2011)

A glicólise é uma etapa comum em processos aeróbios ou aneróbios. Na ausência de oxigênio na fermentação etanólica a molécula de piruvato é descarboxilada pela enzima piruvato descarboxilase, produzindo gás carbônico e acetaldeído. A molécula de acetaldeído é reduzida a etanol através da álcool desidrogenase, nesta etapa há a regeneração do cofator NAD^+ (Figura 5) (NELSON; COX, 2011).

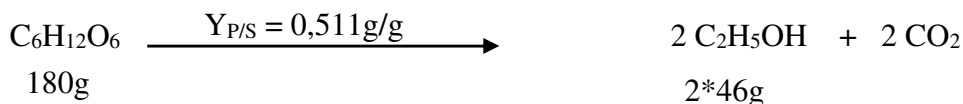
Figura 6 - Conversão do piruvato em etanol e gás carbônico



Fonte: modificada de NELSON; COX (2011).

Estequiometricamente na reação de conversão da glicose em etanol obtém-se o rendimento de 0,511 g/g (Figura 7), mas na prática este valor não é observado, sendo este considerado o rendimento teórico máximo. Isto porque o microrganismo pode gerar no meio fermentativo outros produtos como o glicerol e o ácido acético. Além disso, a glicose pode ser utilizada na via anabólica da célula gerando blocos construtores.

Figura 7 - Rendimento teórico obtido na conversão de uma molécula de glicose em etanol.



Fonte: modificada de NELSON; COX (2011).

Por se tratar de um processo *in vivo*, a produção de etanol por via fermentativa submersa deve disponibilizar no meio de cultivo os nutrientes e minerais necessários para que o microrganismo cresça e sintetize este produto. Arora *et al.* (2017) estudaram a influência das condições nutricionais em meio semissintético para o crescimento e produção de etanol das cepas *K. marxianus* NIRE-K1 e NIRE-K3. Este estudo avaliou o efeito dos nutrientes: extrato de levedura, K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , MgSO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre o bioprocesso através do método estatístico da superfície de resposta. Os experimentos foram conduzidos na temperatura de 45°C e pH de 5,5. A concentração inicial de glicose foi 10 g/L para avaliar o crescimento celular e de 40 g/L para o processo fermentativo. Os autores observaram que aumentando a concentração do extrato de levedura de 1 para 5 g/L e mantendo a concentração dos demais sais em 0,1 g/L a quantidade de biomassa obtida

dobrou (1,6 para 3,2 g/L). Para o processo fermentativo, a maior concentração etanol foi de 17,22 g/L quando utilizado um meio contendo (g/L): extrato de levedura 1,0; MgSO₄, 1,0; e 2,0 dos demais sais.

Os autores Vogel e Todaro (1996) descreveram as funções fisiológicas de alguns elementos na célula (Tabela 1). Segundo Bamforth (2005) os quatro elementos requeridos em maior quantidade são carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, isto porque estes elementos são essenciais para a produção de componentes celulares chave como: carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. O fósforo e enxofre são necessários neste sentido também.

Os elementos traços como ferro, zinco, manganês, molibdênio, cobalto, cobre e cálcio, têm diversas funções na célula como: a síntese de vitaminas, podem atuar como coenzimas para catalisar reações químicas, e como transportadores na parede celular. A quantidade requerida pelas células, normalmente é baixa e podem ser suplementados na própria água utilizada para o preparo do meio. Estes elementos podem contribuir para a produção de metabólicos primários e secundários (VOGEL; TODARO, 1996).

Castro e Roberto (2015), estudando o efeito da suplementação nutricional em hidrolisado celulósico de palha de arroz, para a produção de etanol utilizando a cepa *K. marxianus* NRRL Y-6860 em diferentes estratégias de fermentação SSF (sacarificação e fermentação simultânea) e SHF (sacarificação e fermentação realizadas separadamente), observaram que no meio contendo somente o hidrolisado celulósico, para ambas estratégias de fermentação, SSF e SHF, a concentração de etanol foi semelhante 10g/L. No entanto a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) foi menor no processo SHF do que no SSF, indicando que o efeito dos nutrientes é dependente da forma de condução do processo fermentativo.

Os meios fermentativos contendo hidrolisado (fração líquida contendo os monômeros de glicose e/ou xilose) obtidos a partir da biomassa lignocelulósica podem conter compostos de furano (furfural e hidróxi-metil- furfural- HMF), compostos fenólicos (vanilina, seringualdeído, ácidos ferúlicos), ácido acético, entre outros que são liberados durante o pré-tratamento da biomassa para obtenção dos monômeros de glicose e xilose. A quantidade destes compostos varia de acordo com o tipo de biomassa e das etapas de pré-tratamento realizadas. Durante o processo fermentativo para produção de etanol estas moléculas dependendo da sua concentração e do tipo de microrganismo podem interferir

negativamente no metabolismo microbiano. O furfural e o HMF é formado a partir da desidratação dos monômeros de pentose, e de glicose respectivamente, estes compostos no meio intracelular primeiramente limita o crescimento e reações metabólicas intracelular, eles possuem uma alta reatividade com os ácidos nucleicos e enzimas. Os compostos fenólicos na desestabilização e posterior ruptura da membrana plasmática, o acetato é um produto do metabolismo celular, logo para reduzir sua quantidade no meio intracelular evitando efeitos negativos como desestabilização do potencial de pH da transmembrana, alteração da pressão de turgor e inibição da síntese de etanol (AKINOSHO *et al.*, 2015).

Um estudo realizado por Sandoval –Nuñez *et al.* (2018) comparou a produtividade de etanol das cepas de *Kluyveromyces marxianus* OFF1 e *Saccharomyces cerevisiae* RED (comercial) a partir dos hidrolisados de bagaço de cana de açúcar e de palha de trigo sem suplementação nutricional. Ambas biomassas foram pré-tratadas com ácido sulfúrico e as enzimas (HTec2 e CTec2- Novozyme) sendo a concentração dos hidrolisado de bagaço de cana de açúcar (g/L): glicose, 7,64; xilose, 8,38, arabinose, 2,43; HMF, 0,04; furfural, 0,10; vanilina, 0,13; e ácido acético, 2,00. O hidrolisado obtido a partir da palha de trigo continha (g/L): glicose, 6,07; xilose, 6,36, arabinose, 2,09; HMF, 0,57; furfural, 0,25; vanilina, 0,26; e ácido acético, 1,78. A fermentação foi realizada em frasco erlenmeyer 250 mL contendo 50 mL do hidrolisado de palha de trigo ou de bagaço de cana de açúcar, no pH 4,5, sob agitação (100 rpm), à 30°C. A maior quantidade de etanol foi produzida por *Kluyveromyces marxianus* OFF1 (9,0 g/L) no hidrolisado de bagaço de cana de açúcar, com uma produtividade volumétrica (Q_P) de 0,292 g/L.h no meio contendo *S. cerevisiae* RED obteve-se 4,8 g/L sendo $Q_P = 0,167$ g/L.h. No hidrolisado de palha de trigo os autores verificaram que houve uma baixa produção de etanol por ambas leveduras, sendo o maior valor de 3,1 g/L obtido por *K. marxianus* OFF1. Segundo Sandoval –Nuñez *et al.* (2018) a baixa concentração de etanol obtida no hidrolisado de palha de trigo pode ser devido ao efeito inibitório das altas concentrações do composto fenólico (vanilina), dos derivados do furano (furfural e HMF) e do ácido acético que estudos demostram que o primeiro efeito destes compostos é a desestabilização ou ruptura da membrana celular, assim como alteração na proporção de lípido - proteína na mesma (AKINOSHO *et al.*, 2015).

Tabela 1 - Funções fisiológicas dos principais elementos

Elemento	Símbolo	Função fisiológica
Hidrogênio	H	Constituinte da água e moléculas orgânicas da célula
Carbono	C	Constituinte de moléculas orgânicas das células
Nitrogênio	N	Constituinte de proteínas, ácidos nucleicos e coenzimas
Oxigênio	O	Constituinte da água e moléculas orgânicas da célula, acceptor final de elétrons em processos aeróbios
Sódio	Na	Principal cátion extracelular
Magnésio	Mg	Cofator inorgânico para reações com muitas enzimas
Fósforo	P	Constituinte de fosfolipídeos, coenzimas e ácidos nucleicos
Enxofre	S	Constituinte dos aminoácidos:cistina, cisteína e metionina, assim como de algumas coenzimas
Cloro	Cl	Principal ânion intra e extracelular
Potássio	P	Principal cátion intracelular, cofator de algumas enzimas
Cálcio	Ca	Importante cátion celular, cofator de algumas enzimas
Manganês	Mn	Este cátion atua como cofator inorgânico
Ferro	Fe	Constituinte dos citocromos e outras proteínas heme ou não-heme, além de ser cofator de algumas enzimas
Cobalto	Co	Constituinte da vitamina B ₁₂ e derivados de coenzimas
Cobre	Cu	Constituinte inorgânico de enzimas
Zinco	Zn	Constituinte inorgânico de enzimas
Molibdênio	Mo	Constituinte inorgânico de enzimas

Fonte: Tabela modificada extraída de Vogel; Todaro (1996).

Além da composição nutricional, as condições de temperatura, pH e oxigênio dissolvido e os produtos liberados no meio durante o processo fermentativo, podem influenciar na via metabólica de um microrganismo (VOGEL; TODARO, 1996). Um estudo realizado por Fu *et al.* (2019), avaliou o efeito ao stress causado pela temperatura (30 e 45°C) e potenciais inibidores (etanol, ácido acético e glicerol) obtidos durante a fermentação de

glicose à etanol por *K. marxianus* DMKU3 – 1042. Os experimentos foram realizados em frascos erlenmeyers 100 mL contendo 30mL do meio contendo (g/L): extrato de levedura, 20; peptona,20, glicose, 180; sulfato de amônio 0,6; fosfato monopotássico, 0,15; sob agitação de 100 rpm, por 40h. Os autores verificaram que na temperatura de 30 e 45°C o consumo de glicose e a produção de etanol (~46 g/L) por *K. marxianus* DMKU3 foi semelhante durante as primeiras 16 h de fermentação, no entanto à 45°C após este período a fermentação prosseguiu com aproximadamente 60 g/L de glicose no meio até o final do processo. Fu et al, (2019) observaram que à 45°C em 16h havia em torno de 1,0 g/L de ácido acético e 4,5 g/L de glicerol no meio, na temperatura de 30°C não havia ácido acético e sendo concentração de glicerol ~3,6 g/L, durante o processo também foi acompanhado o pH, sendo 4,8 o valor inicial à 45°C observou-se uma queda mais acentuada, apresentando o valor 4,2 no tempo de 16h. Na temperatura de 30°C foi observado o consumo de toda glicose no meio em aproximadamente 28h, sendo a maior concentração de etanol observada neste período (~79,8g/L). A conclusão deste trabalho foi que na temperatura de 45°C esta cepa produziu mais rapidamente ácido acético e glicerol, logo uma vez atingida no meio a concentração destes subprodutos capaz de inibir a conversão de glicose em etanol (aproximadamente 16h) houve a estagnação destes compostos no meio de fermentação.

Nos processos fermentativos para produção de etanol é requerido baixas concentrações de oxigênio dissolvido no meio, principalmente nos estágios iniciais da fermentação. Isto porque o oxigênio é necessário para a biossíntese de esteróis e ácidos graxos insaturados que são componentes essenciais da membrana plasmática. O etanol produzido durante a fermentação é difundido passivamente para o meio extracelular, sendo a membrana plasmática um dos primeiros alvos da toxicidade deste bioproduto. O aumento da concentração de etanol proporciona um aumento da fluidez da membrana acarretando no rompimento estrutural da mesma. Uma das respostas fisiológicas das leveduras para se adaptar a altas concentrações de etanol pode ser a nível da manutenção da estrutura da membrana plasmática, a *S. cerevisiae*, por exemplo, responde ao etanol aumentando a proporção de ácidos graxos e esteróis na membrana plasmática, além disso ela também acumula trealose, um dissacarídeo que ajuda estabilizar a membrana (QUEROL; FLEET, 2006; VERACHTERT; MOT, 1990).

A avaliação dos parâmetros fermentativos são importantes para definir as condições operacionais do bioprocesso. De posse destes dados, é possível otimizar o processo e escolher de forma adequada o tipo de reator a ser utilizado. Para produção de etanol têm-se

utilizado reatores como: coluna de bolhas e tanques agitados, mas existem outras configurações de reatores com potencial para o estudo da produção de etanol, como o reator *air-lift*.

2.6 Produção de etanol em biorreator *air-lift*

Os biorreatores do tipo tanque agitado ou STR (*Stirred tank reactor*) a homogeneização do meio é realizada por impelidores conectados a um eixo giratório central, a aeração, entretanto, ocorre pela injeção de ar no fundo do vaso de reação. Devido ao grande uso destes reatores na indústria, eles são comumente denominados de reatores convencionais (CERRI, 2009).

A produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 neste tipo de biorreator foi realizada por Tavares *et al.* (2019) utilizando glicose comercial (aproximadamente 90 g/L), empregando o K_{La} de $0,2 \text{ h}^{-1}$, sob agitação de 300 rpm à 40°C , por 24h. No final do processo os autores observaram a concentração de 36,2 g/L de etanol no caldo fermentado.

Dasgupta *et al.* (2017) produziram etanol celulósico em reator do tipo tanque agitado (0,025 vvm, 200 rpm, 45°C , 24h) a partir de *Kluyveromyces marxianus* IPE453 utilizando como matéria prima o bagaço de cana de açúcar. Iniciando a fermentação com 45g/L de glicose no hidrolisado, os autores obtiveram um fator de conversão de açúcares em etanol de 0,44 g/g e uma produtividade volumétrica de 0,9 g/L.h.

O etanol é um produto obtido sob condições de microaerobiose, um estudo realizado por Telli-Okur e Eken-Saraçoğlu (2006) avaliou o efeito da concentração de oxigênio na produção de etanol por *Pichia stipidis* em hidrolisado hemicelulósico do bagaço da casca de semente de girassol em reator do tipo tanque agitado. As fermentações ocorreram sob agitação (100 rpm), a 30°C , variando a velocidade específica de ar (Φ_e) de 0 a $7,99 \text{ min}^{-1}$, utilizando a concentração inicial de xilose de 35g/L. Os autores observaram a máxima concentração de etanol (9,66 g/L) com Φ_e de $2,88 \text{ min}^{-1}$, não foi verificado a produção de etanol por esta levedura em anaerobiose ($\Phi=0 \text{ min}^{-1}$), no entanto o aumento da aeração (valores acima de $\Phi_e = 2,88 \text{ min}^{-1}$) acarretou na diminuição da concentração de etanol observada no caldo fermentado.

Além dos reatores do tipo STR, cuja a agitação e aeração do meio reacional ocorrem por sistemas diferentes, existem os reatores em que o sistema de aeração e agitação é realizado pela injeção de gás no meio reacional, estes reatores são denominados pneumáticos. Entre as vantagens deste tipo de reator (pneumático) em relação ao tanque agitado pode-se citar: a não utilização de partes mecânicas móveis para agitação que acarreta na redução do gasto energético e do risco de contaminação, pois facilita a limpeza e esterilização destes equipamentos, além disso a construção e operação deste biorreator é simples, fazendo com que a manutenção deste equipamento seja mais fácil e barata (DRANDEV; PENEV; KARAMANEV, 2016; MAJEED; BÉKÁSSY-MOLNÁR, 1995).

Os biorreatores do tipo *air-lift*, são pneumáticos, e podem ser classificados de acordo com o tipo de circulação do fluido (circulação interna ou circulação externa). Os de circulação interna são constituídos de uma única coluna que acarreta na formação de duas zonas de escoamento distintas. Um zona de escoamento ascendente do fluido, podendo ser chamada de região de subida (*riser*) e outra onde o fluido escoar no sentido vertical para baixo, região de descida (*downcomer*). Um exemplo de *air-lift* com circulação interna é o *air-lift* com tubos concêntricos (Figura 8) (MAJEED; BÉKÁSSY-MOLNÁR, 1995; PEDRINI, 1997).

Nos *air-lifts* com circulação interna o fluxo de ar é injetado na base do bioreator, no interior do tubo (*riser*) o movimento ascendente do gás promove o deslocamento do meio reacional no mesmo sentido. No topo do reator, parte do gás se desprende do meio, este, parcialmente degaseificado retorna para a base do mesmo. Na base do biorreator, o meio reacional descendente encontra-se com a corrente ascendente do gás que está sendo injetado no sistema, sendo novamente carregado por ela. Desta forma, ocorre a homogeneização do meio reacional, pois a circulação interna é contínua (ALEKSIEVA; PEEVA, 2000; MAJEED; BÉKÁSSY-MOLNÁR, 1995).

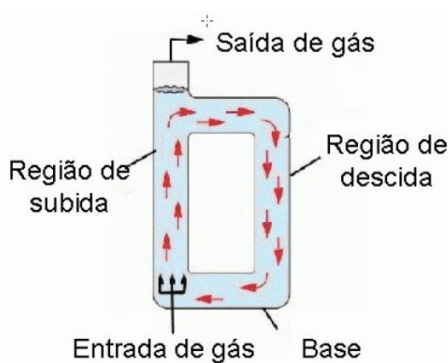
Figura 8 - *Air-lift* de cilindros concêntricos, onde a injeção de ar ocorre na base do biorreator



F

Nos biorreatores do tipo *air-lift* com circulação externa as regiões com escoamento ascendente (*riser*) e descendente (*downcomer*) do meio reacional são conectadas por seções horizontais perto do topo e da base do reator produzindo desta forma a recirculação do líquido (Figura 9) (MAJEED; BÉKÁSSY-MOLNÁR, 1995; CHISTI, 1989).

Figura 9 - Biorreator *air-lift* com circulação externa.



Fonte: CERRI (2009).

Como a agitação e aeração nos biorreatores pneumáticos, como coluna de bolhas e *air-lift*, são realizadas pela injeção de gás, estes dispõem de um menor gasto de energia quando comparados com os biorreatores convencionais nos quais a agitação é mecânica. Dentre as vantagens dos biorreatores pneumáticos se destaca a não utilização de partes mecânicas móveis para agitação que acarreta na redução do risco de contaminação, pois facilita a limpeza e esterilização destes equipamentos, além disso a construção e operação deste biorreator é simples, fazendo com que a manutenção deste equipamento seja mais fácil e barata (DRANDEV; PENEV; KARAMANEV, 2016; MAJEED; BÉKÁSSY-MOLNÁR, 1995).

No biorreator *air-lift* como o sistema de homogeneização do meio reacional e aeração é realizada através da injeção de ar no vaso para a utilização destes reatores em processos fermentativos e garantir a mistura das fases sólida, líquida e gasosa no interior da cuba pode se estudar os parâmetros hidrodinâmicos como: velocidade superficial do gás, a retenção gasosa, velocidade superficial do líquido, tempo de mistura e tempo de circulação (CHISTI, 1989).

Lennartsson, Niklasson, Taherzadeh (2011) estudaram a produção de etanol pelo fungo *Mucor indicus* a partir de hidrolisado de madeira de abeto, composto principalmente por glicose (20 g/L) e xilose (10 g/L) em biorreator *air-lift* com circulação externa com capacidade de 26 L. A fermentação foi realizada no volume de 20-21L, utilizando a vazão

específica de ar de 0,15 vvm, à 32 °C, com a concentração inicial de 20 g/L de glicose e 10 g/L de xilose por 36h. Os autores observaram a concentração máxima de etanol de aproximadamente 11,5 g/L com 16h de fermentação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

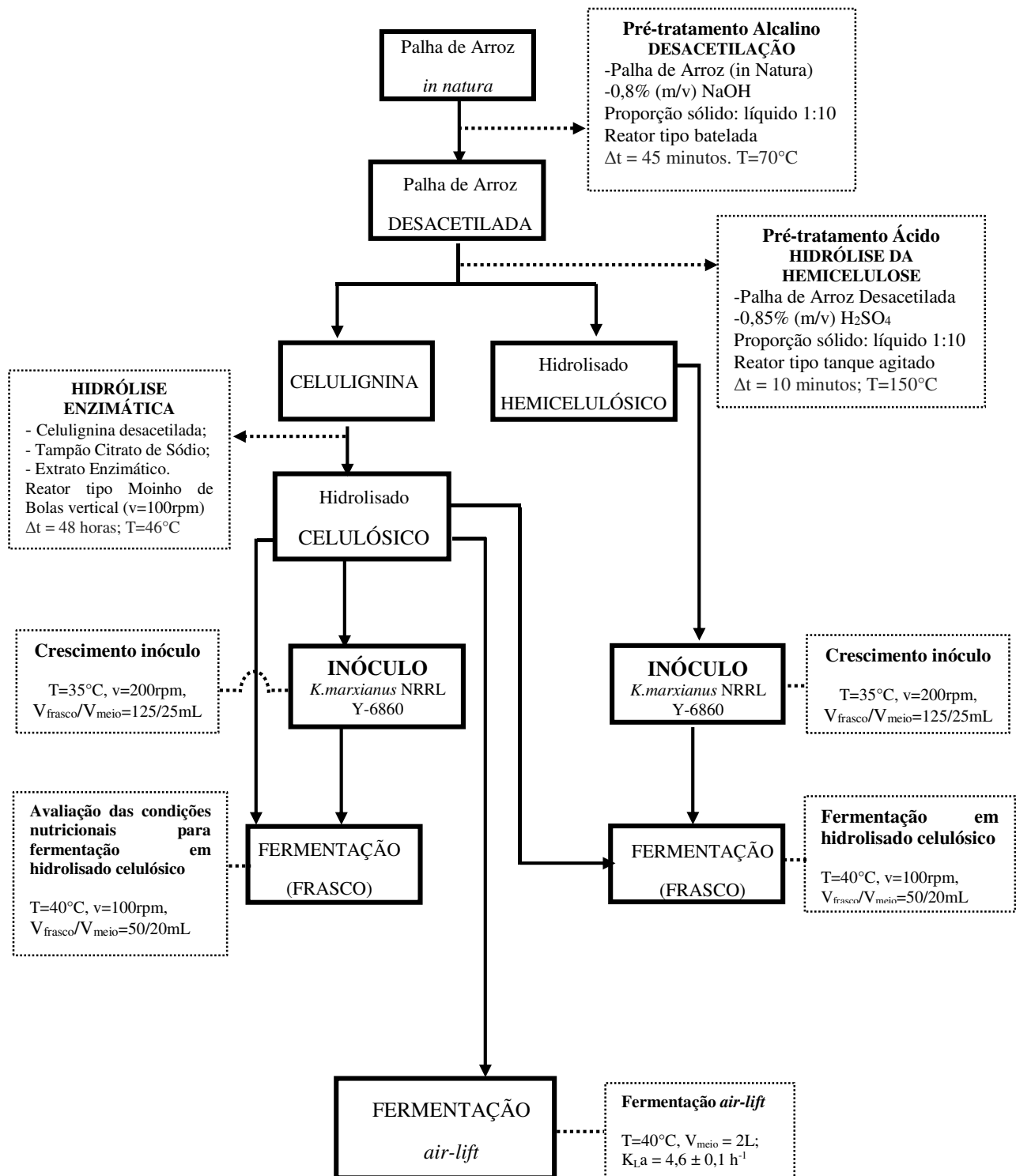
O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* a partir do hidrolisado celulósico da palha de arroz, com ênfase na suplementação nutricional e desempenho em biorreator pneumático do tipo *air-lift*.

3.2 Objetivos específicos

- Obtenção do hidrolisado hemicelulósico e celulignina da palha de arroz empregando a combinação de pré-tratamentos álcali e ácido sob condições previamente estabelecidas.
- Obtenção do hidrolisado celulósico a partir da celulignina da palha de arroz por via enzimática com alto teor de sólidos - 20 % (m/v) em batelada alimentada no reator não convencional do tipo moinho de bolas vertical sob condições previamente definidas.
- Avaliar o crescimento do inóculo de *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico ou celulósico e seu impacto na fermentabilidade do hidrolisado celulósico.
- Avaliar o efeito da suplementação nutricional do hidrolisado celulósico na produção de etanol por *K. marxianus*.
- Avaliar o perfil fermentativo da levedura *K. marxianus* em reator *air-lift* empregando meio semi-definido contendo glicose como fonte de carbono e do hidrolisado celulósico nas condições nutricionais previamente definidas.

4 METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentação I do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP). Abaixo segue um fluxograma da metodologia desenvolvida neste trabalho.



4.1 Pré-tratamento

4.1.1 Matéria-Prima: palha de arroz.

A palha de arroz utilizada no presente estudo foi cedida por produtores da região de Lorena/SP, em seguida, seca ao sol e moída em moinho de martelo, pesada, ensacada e estocada até a realização dos pré-tratamentos e hidrólise enzimática.

4.1.2 Pré-tratamento alcalino: desacetilação

Para o tratamento alcalino foi utilizada a metodologia definida por Castro et. al. (2017) na qual a palha de arroz in natura foi incubada à 70°C por 45 minutos em solução de NaOH 0,8% (m/v) na proporção sólido: líquido de 1:10 correspondendo a 80 mg de NaOH para cada 1 g de biomassa, o principal objetivo desta etapa foi a remoção dos grupos acetil desta biomassa. A reação ocorreu em reator de 50L com 40L de volume útil, aquecido através de uma resistência elétrica, na velocidade de agitação de 2 rpm, com rotação sobre o próprio eixo. A massa de palha seca utilizada foi 3,34 Kg, o volume de água 33,4L; deste total desconta-se a massa de água presente na palha *in natura* (0,36L), e, 7L foram utilizados para preparar uma solução concentrada de NaOH ($m_{\text{NaOH}}=267,2\text{g}$). Primeiro, introduziu-se a palha in natura no reator, pela abertura superior. Depois 16L de água de torneira, seguida pela solução de hidróxido de sódio (7L), por fim o restante da água até completar os 33,04L. No final da reação, o reator foi arrefecido até temperatura ambiente (aproximadamente 108 minutos), e o licor foi separado da fração sólida por filtração utilizando-se um funil de alumínio como suporte e pano de algodão como filtro. O material sólido foi separado em porções ($\pm 200\text{g}$) colocado em baldes, e lavado com água de torneira com posterior filtração em peneira de 48 mesh com poros de 0,297 mm. Durante a lavagem foi verificado o pH da água de lavagem através de fitas de medição, até que o pH do líquido descartado atingisse o 6,5. A quantidade de água necessária para neutralizar o material foi de aproximadamente 17 L para cada 200g, portanto para lavar toda a palha foi gasto em média 283,9 L de água, para remoção do excesso de NaOH do material sólido. Posteriormente, o material sólido lavado foi seco ao sol até atingir o teor de 10% de umidade e armazenado em saco plástico. O material sólido foi caracterizado pela quantidade de celulignina, hemicelulose, lignina e cinzas.

4.1.3 Pré-tratamento ácido

Na segunda etapa do pré-tratamento a palha de arroz desacetilada (fração sólida – item 4.1.2) foi submetida a hidrólise ácida, com o ácido sulfúrico diluído empregando a metodologia definida por Ferreira (2018), na qual utilizou-se uma solução 0,85% (m/v) de H_2SO_4 na proporção sólido: líquido de 1:10 que corresponde a 0,85 mg de ácido sulfúrico para cada 1 g de palha de arroz desacetilada à 150°C por 10 min. Esta etapa foi realizada em reator tipo tanque agitado de ácido inoxidável com 50L e volume útil de 40L, sob agitação mecânica. A massa de palha desacetilada utilizada foi de 3,30 Kg, o volume de água de 33,0L, deste total desconta-se a quantidade de água presente no material (0,30L), e 7L foram empregados para o preparo uma solução concentrada de H_2SO_4 ($m_{H_2SO_4} = 280,5$ g). Primeiro, introduziu-se a palha desacetilada no reator, pela abertura superior, posteriormente 16L de água de torneira, seguida pela solução de ácido sulfúrico(7L), por fim o restante da água até completar os 33,0 L. No final da reação, o reator foi arrefecido até temperatura ambiente (aproximadamente 3h), e o licor foi separado da fração sólida por filtração utilizando-se um funil de alumínio como suporte e pano de algodão como filtro. O material sólido, denominado de celulignina foi separado em porções (± 300 g) colocado em baldes, e lavado com água de torneira com posterior filtração em peneira de 48 mesh com poros de 0,297 mm. Durante a lavagem foi verificado o pH da água de lavagem através de fitas de medição, até que o pH do líquido descartado atingisse o 6,5. A quantidade de água necessária para neutralizar o material foi de aproximadamente 25 L para cada 300g, portanto para lavar toda a palha foi gasto em média 275 L de água, para remoção do excesso de H_2SO_4 do material sólido. Posteriormente a celulignina, foi seca ao sol até atingir uma umidade aproximada de 10%., caracterizada e a fração líquida obtida neste processo (hidrolisado hemicelulósico), foi caracterizada quanto ao teor de açúcares e fenólicos por HPLC.

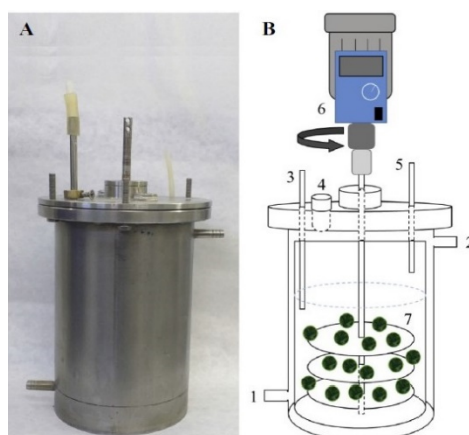
4.2 Hidrólise enzimática da celulignina: obtenção do hidrolisado celulósico

A fração sólida obtida após o pré-tratamento ácido (celulignina) (item 4.1.3) foi submetida à hidrólise enzimática, em reator moinho de bolas vertical empregando 30 esferas de vidro no total (Figura 10), previamente autoclavados à 121°C por 20 minutos à 1,0 atm. O experimento foi realizado em batelada alimentada conforme definido por Castro, Mussatto e Roberto (2017) empregando um teor de sólidos total de 20% (m/v), iniciando com a alimentação do reator com 16 % (m/v) de celulignina sob agitação (50 rpm) por 2h, visando a dispersão do material no interior do vaso sob temperatura ambiente. Em seguida, a

temperatura do reator foi ajustada para 46°C e foi adicionado o tampão citrato de sódio 50 mM (pH 5,2 ±0,2) sob agitação de 100 rpm, quando o sistema atingiu 46°C introduziu-se no reator o extrato enzimático Cellubrix e β-glicosidase, na proporção de 1:3 respectivamente. A carga enzimática de Cellubrix foi 21,5 FPU por grama de celulose, e β-glicosidase de 64 UI/g de celulose, como a Cellubrix contém 38 UI de β-glicosidase foi acrescentado 26,5 UI de β-glicosidase (Novozyme 188). Após 10h de reação foi adicionado ao meio reacional 4% (m/v) de celulignina, totalizando o teor de sólidos de 20% (m/v), a hidrólise enzimática foi realizada por 48h, durante este período para acompanhar a liberação da glicose presente na celulose, foram coletadas amostras de 2 mL, desnaturadas (10 min na temperatura de 100°C), centrifugadas à 4500 rpm por 5 min sendo a fração líquida armazenada à 4°C para posterior análise quanto o teor de glicose. No final das 48 horas, a fração líquida (hidrolisado celulósico) foi separada por centrifugação (4800 rpm por 40 min - Thermo scientific-HEBRAEUS MEGAFUGE 16R), obtendo-se um volume aproximado de 300 ±10 mL por batelada. O hidrolisado celulósico foi armazenado em garrafa de plástico, aquecido em banho maria à 100°C (para desativar as enzimas), avaliado quanto ao teor de glicose (HPLC) e armazenado no freezer para posterior utilização na etapa de preparo de inóculo e fermentação.

Foram realizadas um total de 10 bateladas, o hidrolisado obtido nas três primeiras bateladas foi homogeneizado e utilizado no preparo do inóculo e planejamento experimental (fermentação). O restante foi homogeneizado e empregado na etapa de fermentação em reator *air-lift*.

Figura 10 - (A) Reator moinho de bolas vertical; (B) Ilustração da configuração interna do reator: (1) entrada e (2) saída de água para o controle da temperatura; (3) duto coletor de amostra; (4) compartimento para adição de reagentes; (5) local de saída de gases; (6) motor de agitação; (7) impulsores planos redondos com as esferas.



4.3 Fermentação

4.3.1 Microrganismo

No presente estudo foi utilizado a estirpe termotolerante *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y 6860, obtida da Coleção de culturas ARS, Peoria –IL, EUA. Esta estirpe foi selecionada por Castro (2013) por ser uma boa produtora de etanol, a partir de glicose. A cultura será mantida em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinados e conservada a 4°C.

4.3.2 Avaliação do crescimento do inóculo de *K. marxianus* nos hidrolisados (celulósico ou hemicelulósico) e seu impacto na fermentabilidade do hidrolisado celulósico

Nesta etapa foi avaliado o perfil de crescimento da levedura *K. marxianus* em meios de cultivo preparados com hidrolisado celulósico ou hemicelulósico, suplementado com sais e extrato de levedura (Tabela 2). A concentração do hidrolisado celulósico foi ajustada para 30 g/L, entretanto a concentração máxima de xilose obtida foi 22g/L no hidrolisado hemicelulósico a partir da hidrólise ácida, as quantidades dos sais e do extrato de levedura utilizadas foram descritas por Castro (2013).

Tabela 2 - Composição dos meios de cultivo complexos utilizados para o crescimento de *K. marxianus*.

Meio de Cultura	Composição	Concentração (g/L)
MC1	Hidrolisado celulósico (glicose)	30
	(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
MC2	Hidrolisado hemicelulósico (xilose)	20
	(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

.Fonte: Arquivo Pessoal

Para o preparo do meio de cultivo, soluções concentradas de cada sal e do extrato de levedura foram elaboradas separadamente e esterilizadas na temperatura de 121°C por 20 minutos. Os hidrolisados celulósico e hemicelulósico não foram autoclavados (foi verificado em microscópio que o meio estava apropriado sem contaminação). O pH do hidrolisado hemicelulósico apresentou o valor de 1,89 sendo ajustado para 5,0 com NaOH 10 M, posteriormente centrifugado (4700 rpm por 10 min - Thermo scientific-HEBRAEUS MEGAFUGE 16R) e a fração líquida utilizada para composição do meio MC2. A concentração desejada de cada nutriente no meio de cultura foi obtida pela mistura asséptica dos mesmos em proporções apropriadas.

O inóculo foi preparado por meio da transferência de alçadas de células recém repicadas em meio contendo ágar e extrato de malte, para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada esterilizada. A suspensão foi homogeneizada e avaliada quanto absorvância em espectrofotômetro (Thermo scientific-GENESYS 10S UV-Vis) no comprimento de onda de 600nm (D.O₆₀₀), quando a D.O₆₀₀ atingiu 0,7 unidades, alíquotas de 1 mL desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de um dos meios complexos descritos na Tabela 2.

Em seguida, os frascos foram incubados em agitador rotatório na velocidade de 200 rpm, à 35 °C, até o consumo total do açúcar disponível no meio. Ao final do crescimento, as células obtidas no hidrolisado celulósico e hemicelulósico foram centrifugadas (4700 rpm por 10 min - Thermo scientific-HEBRAEUS MEGAFUGE 16R), posteriormente lavadas duas vezes com água destilada e centrifugadas (4700 rpm por 10 min) e os *pellets* obtidos de cada hidrolisado foram utilizados para inocular a fermentação em hidrolisado celulósico.

Os ensaios fermentativos foram realizados em frascos erlenmeyers de 50 mL com 20 mL de meio composto por (g/L): glicose (hidrolisado celulósico), 100; (NH₄)₂SO₄, 1,0; KH₂PO₄, 1,5; MgSO₄.7H₂O, 0,1; extrato de levedura, 3,0, utilizando 5 g/L de inóculo, sob agitação rotatória (100 rpm - Tecnal TE-420) na temperatura de 40°C.

Para o preparo do meio de cultivo, soluções concentradas de cada sal e do extrato de levedura foram elaboradas separadamente e esterilizadas na temperatura de 121°C por 20 minutos, já o hidrolisado celulósico não foi autoclavado. A concentração desejada de cada nutriente no meio de cultura foi obtida pela mistura asséptica dos mesmos em proporções apropriadas.

Amostras foram retiradas durante o cultivo para observar o crescimento celular ($D.O_{600}$), consumo de açúcares pela levedura e produção de etanol.

4.3.3 Avaliação da suplementação nutricional do hidrolisado celulósico na produção de etanol por *K. marxianus*

Nesta etapa foi analisado o desempenho fermentativo da *K. marxianus* no hidrolisado celulósico em diferentes condições nutricionais. Para este estudo foi utilizado o planejamento experimental 2^4 (Tabelas 4 e 5), em que diferentes concentrações de sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$), fosfato de potássio diácido (KH_2PO_4), sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e do extrato de levedura foram empregadas.

Tabela 3 - Níveis reais dos fatores

FATORES	NÍVEIS CODIFICADOS		
	-1	0	+1
	NÍVEIS REAIS		
$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	0,00	0,50	1,00
KH_2PO_4 (g/L)	0,00	0,75	1,50
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (g/L)	0,00	0,05	0,10
EL (g/L)	0,00	1,50	3,00

EL-Extrato de Levedura;

Fonte: Arquivo Pessoal.

Tabela 4 - Matriz do planejamento experimental para avaliação do efeito da variação nutricional na produção de etanol celulósico, segundo planejamento fatorial completo 2⁴.

ENSAIO	NÍVEL DA VARIÁVEIS			
	(NH ₄) ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	EL
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0

EL – Extrato de Levedura.

Fonte: Arquivo Pessoal

Os experimentos foram conduzidos em frascos de 50mL com volume de meio de 20mL em agitador rotatório (Tecnal TE-420) a 100 rpm, na temperatura de 40°C por 12h. Foi retirado uma amostra inicial e final (12h) dos meios de fermentação para avaliar o consumo de açúcares, produção de etanol e de biomassa.

Os parâmetros fermentativos: produtividade volumétrica de etanol (Q_P), fator de conversão da glicose em etanol (Y_{PS}), foram avaliados nesta etapa. A análise dos resultados obtidos nesta etapa implicou na escolha do meio contendo hidrolisado celulósico para a etapa de fermentação em reator do tipo *air-lift* com volume útil de 2,5L.

4.4 Reator *air-lift*: parâmetros hidrodinâmicos e ensaios fermentativos

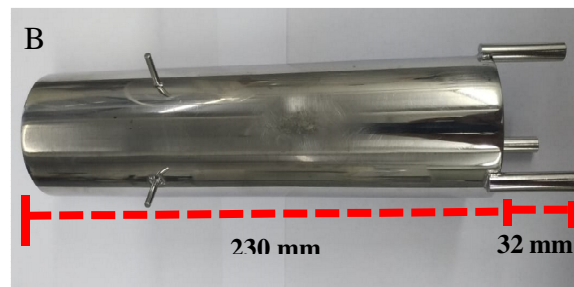
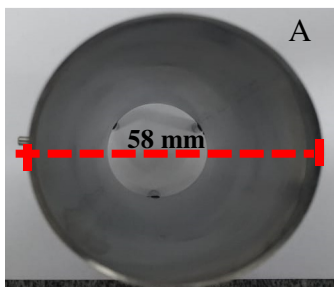
O biorreator utilizado nos ensaios fermentativos foi o *air-lift* com circulação interna da Tecnal (TEC-BIO-P 3- AIR-LIFT), capacidade total de 3L e volume útil de 2,5L o equipamento utilizado para controlar o pH, pO₂, e temperatura durante a fermentação foi o *B. Braun Biotech International Biostat B* (Figura 11). Os equipamentos móveis empregados no interior do vaso durante as fermentações foram um direcionador de fluxo ascendente do tipo cilíndrico concêntrico (draft –tube – Figura 12) e um dispersor de ar contendo tubos perfurados de aço inoxidável do tipo cruzeta (Figura 13).

Figura 11 - Biorreator *air-lift* Tecnal (TEC-BIO-P 3- AIR-LIFT) e controlador de fermentação BIOSTAT B (B. Braun)



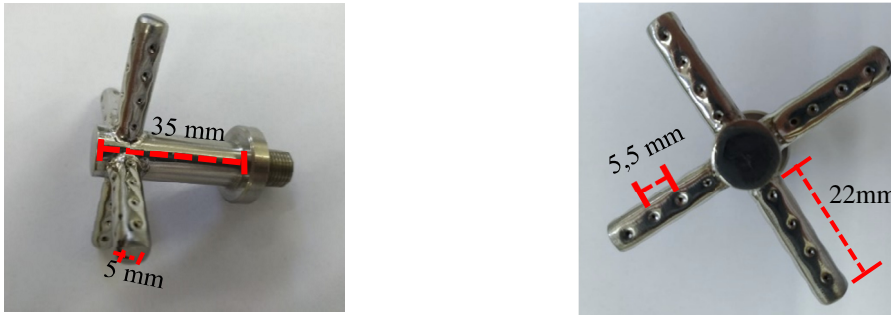
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 12 - Direcionador de fluxo ascendente do tipo cilíndrico concêntrico – draft tube: A- diâmetro interno; B- Altura do cilindro.



Fonte: Arquivo pessoal

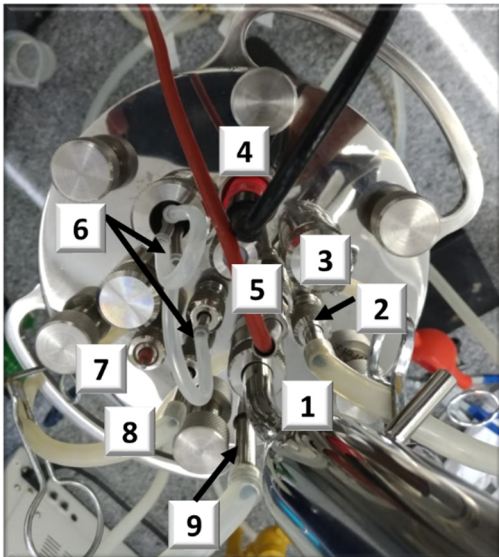
Figura 13 - Dispensador de ar tipo cruzeta (48 poros) com suas respectivas medidas.



Fonte: Arquivo pessoal.

As portas de entrada localizadas no topo (tampa) do reator se encontram na Figura 14.

Figura 14 - Entradas localizadas na tampa do reator com suas respectivas especificações.

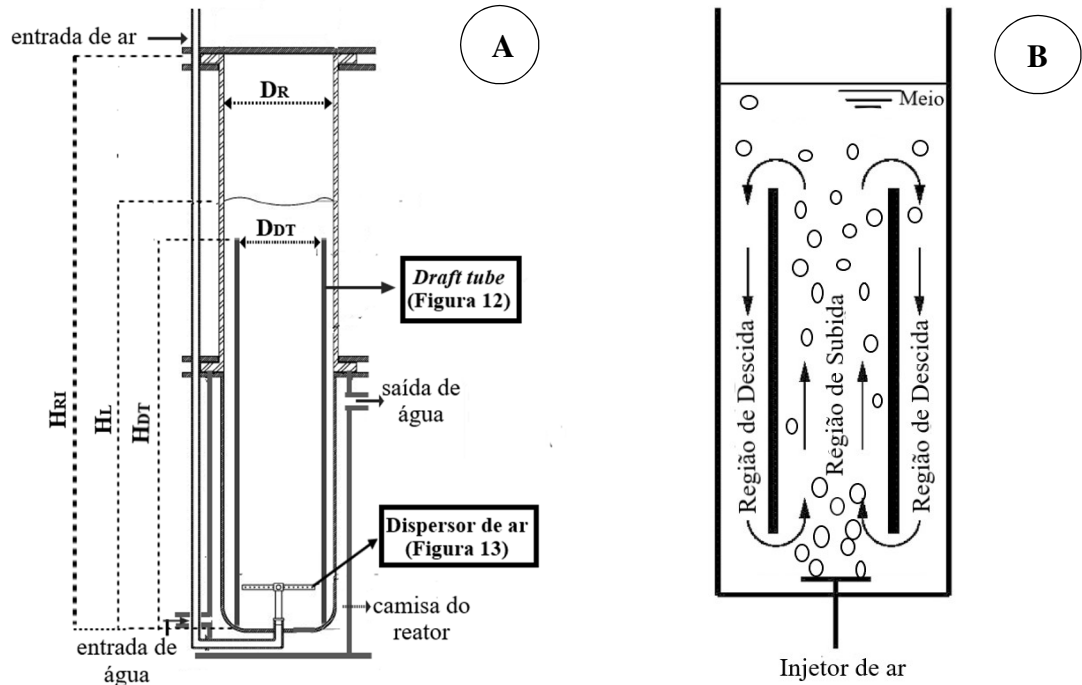


- 1- Condensador
- 2- Exaustor de gás
- 3- Sensor de oxigênio dissolvido
- 4-Sendor de pH
- 5- Sensor de temperatura
- 6- Bomba: ácido/base/ antiespumante
- 7-Sensor de espuma
- 8-Amostrador
- 9- Entrada de gás

Fonte: Arquivo pessoal

As medidas do reator *air-lift* utilizado nos ensaios fermentativos assim como o modelo de homogeneização do sistema estão descritos na Figura 15 e Tabela 5.

Figura 15 - (A) Medidas do reator *air-lift* (Tecnal) utilizado nos ensaios fermentativos; (B) Modelo de homogeneização do sistema empregando um direcionador de fluxo ascendente do tipo cilíndrico concêntrico (*draft-tube*).



Fonte: A-Modificado Thomasi; Cerri; Badino, (2010); B- Arquivo pessoal

Tabela 5 - Medidas internas do reator assim como das peças utilizadas no experimento - *draft-tube* e dispersor de ar tipo cruzeta, altura do meio de fermentação sem aeração do sistema

Medidas do reator	(mm)
Altura total do reator interna (até a tampa):	440
Diâmetro interno do reator (D_R)	96
Distância da base do vaso até o dispersor	35
Dispersor do tipo cruzeta com 48 poros	22 *
<i>Draft tube</i> - diâmetro interno D_{DT}	58
<i>Draft tube</i> – altura total descontando os “pés”	230
Altura total do <i>Draft tube</i> (H_{DT})	262
Espessura da parede do <i>Draft-tube</i>	1
Altura interna até a marca de 2L (H_L):	300

(Continua)

(Conclusão)

Medidas do reator	(mm)
Altura interna até a extremidade superior do <i>draf-tube</i>:	262
Diferença da medida do volume de 2L com a altura do total interna do reator:	142
Diferença da medida do volume de 2L até a extremidade do <i>draf-tube</i>:	38
Área da seção transversal de descida do fluido (downcomer) A_D	$4,6 \cdot 10^3$
Área da seção transversal de subida do fluido (riser) A_R	$2,64 \cdot 10^3$
A_D / A_R	1,74
D_{DT} / D_R	0,60
H_L / D_R	3,13

Fonte: Arquivo Pessoal

Em reatores pneumáticos como o *air-lift*, a homogeneização do sistema é realizada através da aeração do meio, portanto para garantir a transferência de massa e calor no interior do vaso de reação foi realizado o estudo na temperatura de 40°C, empregando água destilada (2L) nas vazões específicas de ar ($vvm \cdot \text{min}^{-1}$): 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 dos parâmetros hidrodinâmicos: velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$), tempo de circulação (t_c), velocidade de circulação do líquido (U_L), tempo de mistura (t_m) e retenção gasosa (ϵ_G).

As condições definidas de temperatura e o volume de líquido para a avaliação dos parâmetros hidrodinâmicos foram as condições que seriam empregadas na etapa de fermentação, sendo a temperatura utilizada no planejamento experimental. As vazões específicas de ar (Φ_e) utilizadas foram escolhidas de acordo com o produto almejado durante o processo fermentativo, etanol, que é obtido em condições de baixa concentração de oxigênio, logo baixas Φ_e foram empregadas no presente estudo.

A velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}) é uma variável independente neste tipo de reator, sendo obtida pelo cálculo da razão entre a vazão volumétrica de alimentação do gás (Q_G) e a área da seção transversal de subida (A_S)-Equação 1 (CHISTI, 1989).

Equação 1 - Velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}).

$$U_{GS} = \frac{Q_G}{A_S}$$

Onde U_{GS} -velocidade superficial do gás na região de subida; Q_G - é a vazão volumétrica de alimentação do gás (m^3/s) e A_S - área da seção transversal de subida do gás (m^2).

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) foi obtido pelo método dinâmico tradicional, onde o oxigênio foi desorvido da água através do borbulhamento de nitrogênio no meio líquido. Após a concentração de oxigênio indicar zero, o fluxo de nitrogênio foi interrompido, iniciando a aeração do meio líquido com ar sob vazão conhecida. Para calibrar o equipamento sempre que havia a introdução de uma nova vazão, era necessário que a concentração de saturação de oxigênio estabilizasse e indicar que o valor máximo lido pelo equipamento indicava os 100%. Posteriormente, ocorria novamente a desorção de oxigênio no meio líquido com a inserção de nitrogênio no sistema, seguindo as etapas descritas anteriormente, na segunda etapa os valores da concentração de oxigênio no meio foram armazenados ao longo do tempo.

As medidas foram realizadas em triplicata e a regressão linear dos dados obtidos (Equação 2) do tempo (hora) e concentração de oxigênio correspondente, fornece uma reta, na qual a inclinação (a) indica o valor do K_{La} em h^{-1} :

Equação 2 - Cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C_S}\right) = K_{La} \cdot t$$

Onde: C - concentração de oxigênio em um determinado tempo; C_S – concentração de oxigênio na saturação (100%); K_{La} - coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio; t - tempo (hora).

O tempo de circulação, t_c , significa o tempo médio gasto para que um volume de controle realize uma circulação completa pelo biorreator. A obtenção desta variável foi realizada pelo método descrito por Vasconcelos *et al.*(2003), em que partícula esférica 1 g.cm^{-3} foi inserida no biorreator nas vazões específicas de ar - Φ_e ($vvm \cdot \text{min}^{-1}$): 0,125; 0,250;

0,375 e 0,5 e cronometrado o tempo de cada volta desta partícula. Foram realizadas 10 medidas para cada Φ_e , sendo a, média destas medidas considerada o tempo de circulação.

O cálculo da velocidade de circulação do líquido (U_L) foi realizado pela Equação 3 (CERRI, 2009), em que se mede o tempo gasto por um volume de controle para dar uma volta completa no interior do vaso:

Equação 3 - Velocidade de circulação do líquido

$$U_L = \frac{x_c}{t_c}$$

Onde: x_c – caminho percorrido por um elemento com volume de fluido; t_c - tempo médio de circulação para uma volta completa.

O tempo de mistura, t_m , é o tempo necessário para que uma substância apresente a mesma concentração no reator. Sua detecção foi realizada através de um ensaio tipo pulso de pH, no qual o volume de 4 mL de ácido sulfúrico foi injetado através de uma pipeta graduada no topo do reator na região de mistura do vaso (com fluxo direcionado no interior do *draft-tube*) contendo uma solução de NaOH 2M. O t_m foi o tempo necessário para que o pH inicial de 12 unidades atingisse o valor de aproximadamente 3,9.

A retenção gasosa global (ε_G) representa o tempo de residência da fração gasosa no líquido durante a aeração do sistema. Esta variável foi determinada pela técnica de expansão de volume, na qual foi realizada três medidas visuais do líquido não aerado (h_L) e da altura da dispersão gás-líquido (h_D) com o sistema aerado, o cálculo deste parâmetro foi determinado pela Equação 4.

Equação 4 - Cálculo da retenção gasosa global

$$\varepsilon_G = \frac{h_D - h_L}{h_D}$$

Onde: h_L é a altura do líquido não aerado, h_D – altura do líquido sob aeração, ε_G – retenção gasosa global.

A partir do estudo dos parâmetros hidrodinâmicos no biorreator *air-lift* foram realizados dois ensaios fermentativos para produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* neste reator, em meio complexo contendo somente hidrolisado celulósico e meio semi-

definido composto por (g/L): glicose, 100; 1,0 (NH₄)₂SO₄, 1,0; KH₂PO₄, 1,5; MgSO₄.7H₂O, 0,1; extrato de levedura 3, definido por Ferreira, (2013) nas condições descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições empregadas para os ensaios fermentativos em meio semi-definido contendo glicose e meio complexo (hidrolisado celulósico).

Condições:	Meio semi-definido	Hidrolisado celulósico
Temperatura (°C)	40	40
Volume de trabalho (L)	2,1	2
vvm (min⁻¹)	0,250	0,5
K_{La} (h⁻¹)	4,71	4,68
Inóculo (g/L)	3,15	3,74
pH_{inicial}	5,0	4,75

Fonte: Arquivo pessoal

4.5 Métodos Analíticos

4.5.1 Determinação do teor de umidade da palha de arroz

O teor de umidade da palha de arroz in natura e deste material após as etapas de desacetilação e de tratamento ácido, foi determinado na balança analítica provida de aquecimento por infravermelho (IV2000 – GEHAKA). Aproximadamente 1g de amostra foi colocada na balança até obtenção de peso constante. A umidade foi determinada pela diferença entre a massa inicial e final (obtida após o aquecimento), de acordo com a Equação (5):

Equação 5 - Teor de umidade da biomassa (palha de arroz)

$$\text{Teor de umidade (\% m/m)}: \frac{m_i - m_f}{m_i}$$

Onde: m_i - massa inicial da amostra e m_f - massa da amostra após o aquecimento.

4.5.2 Caracterização do material lignocelulósico

A palha *in natura* e os materiais sólidos obtidos após o pré-tratamento alcalino (palha desacetilada) e de ácido diluído (celulignina), foram caracterizados quimicamente de acordo com a metodologia padrão do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) (SLUITER *et al.*, 2012).

A palha *in natura* contém extrativos que por conterem anéis aromáticos podem interferir na quantificação da lignina do material, por isso há a necessidade de realizar a extração da palha *in natura* utilizando água e etanol 96% como solvente. Aproximadamente 1g deste material (massa seca) foi armazenado em saquinhos de papel filtro, colocados em equipamento Softflex, onde foi realizado três ciclos como cada solvente. Posteriormente os saquinhos foram secos a 30°C, pesados e através da diferença entre a massa inicial e final foi obtido a quantidade de extrativos da amostra.

Para a caracterização do material, 0,3 g (massa seca) dos materiais: palha de arroz sem extrativos, palha desacetilada e celulignina, foi pesado em tubos de ensaio, sendo posteriormente armazenados em banho-maria a 30°C onde foi adicionado em cada tubo 3 mL de H₂SO₄ (72% p/p). A reação ocorreu por 1h em banho-maria e a cada 10 min o conteúdo foi homogeneizado com bastão de vidro. Após este período, ao conteúdo do tubo de ensaio foi adicionado 10 mL de água destilada e a mistura foi transferida para um erlenmeyer de 250 mL, a esta mistura foi adicionado 74 mL de água destilada. Estes frascos foram autoclavados a 121°C durante 1h para que todos os oligômeros presentes no material fossem hidrolisados. Ao fim desta etapa, o conteúdo de cada erlenmeyer foi filtrado em cadinho de vidro previamente seco em estufa de 105°C por 24h e pesados, o resíduo sólido do filtro foi lavado com água destilada até que a água de lavagem estivesse transparente (volume de 40 mL aproximadamente). O filtro de vidro junto com o resíduo sólido lavado foram armazenados na estufa de 105°C no período de 24h e pesados posteriormente para a quantificação da lignina insolúvel (Equação 6):

Equação 6 - Porcentagem de lignina insolúvel na biomassa

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

Onde: m_R - massa do resíduo de lignina (g); m_c - massa de cinzas após calcinação (g) e m_A - massa da amostra seca (g).

O líquido resultante da filtração do conteúdo dos erlenmeyers foi transferido para balões de 100 mL, alíquotas 1 mL de cada balão foi transferido para balões de 25 mL para a leitura da absorbância no espectrofotômetro (Hitachi U-1800) no comprimento de onda de 205 nm para determinação da lignina solúvel de acordo com a Equação (7):

Equação 7 - Porcentagem de lignina solúvel na biomassa

$$\text{Lignina solúvel (\% m/m)} = \frac{d \times A_{205} \times V_f}{C_o \times \epsilon \times m_A} \times 100$$

Onde: A_{205} – absorbância da amostra a 205 nm; d- fator de diluição da amostra; V_f - volume de amostra filtrada e avolumada em balão volumétrico (L); ϵ – absorvidade da lignina a 205 nm (105 L/g.cm); C_o – caminho óptico da cubeta (1 cm); m_A - massa da amostra seca de palha de arroz (g).

Alíquotas do conteúdo restante nos balões de 100 mL foram filtradas em filtro de membrana com ajuda de uma seringa de vidro e analisadas por meio de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para verificação do conteúdo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético. Os dados resultantes foram utilizados para o cálculo da porcentagem de celulose, hemicelulose e grupos acetil de acordo com as Equações (8, 9, 10).

Equação 8 - Porcentagem de celulose na palha de arroz

$$\text{Celulose (\% m/m)} = \frac{C_{gli} \times V_f \times F_C}{m_A} \times 100$$

Equação 9 - Porcentagem de xilana e arabinose na palha de arroz

$$\text{Xilana (\% m/m)} = \frac{C_{xil} \times V_f \times F_C}{m_A} \times 100$$

$$\text{Arabinose (\% m/m)} = \frac{C_{ara} \times V_f \times F_C}{m_A} \times 100$$

Equação 10 - Porcentagem de grupos acetil na palha de arroz

$$\text{Grupos acetil (\% m/m)} = \frac{C_{acetil} \times V_f \times F_C}{m_A} \times 100$$

Onde F_C - fator de conversão (0,9 de glicose para celulose, 0,88 de xilose para xilana 0,88 de arabinosil para arabinose e 0,72 de ácido acético para acetato); C_{gli} , C_{xil} , C_{acetil} (concentração em g/L de glicose, xilose, arabinose e ácido acético); m_A - massa da palha de arroz seca (g).

4.5.3 Determinação da curva de calibração da *Kluyveromyces marxianus*

Para determinar a curva de calibração o crescimento de *K. marxianus* foi realizado em meio de cultivo contendo como fonte de carbono glicose ou xilose sintética, os sais: $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ sendo utilizado como suplemento o extrato de levedura. Neste método correlaciona-se a densidade óptica a 600 nm (turbidimetria) em espectrofotômetro (Thermo scientific-GENESYS 10S UV-Vis) com o peso seco das células por regressão linear. Após o cultivo da levedura (o experimento foi realizado em triplicata) conforme o item 4.3.2.1, o volume de cada erlenmeyer foi centrifugado a 4200 rpm (Thermo scientific-HEBRAEUS MEGAFUGE 16R) por 15 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com água esterilizada e centrifugadas novamente por duas vezes. As células foram ressuspensas a 25 mL. Alíquotas da suspensão celular resultante foram diluídas em diferentes concentrações para obtenção de absorbâncias na faixa de 0,1 a 0,6 a 600 nm. Para obtenção do peso seco, alíquotas 3 mL de cada suspensão celular foram colocadas em cadinhos previamente secos em estufa de 105°C até peso constante e tarados. Os cadinhos com as amostras foram incubados em estufa de 105°C por 24h.

4.5.4 Determinação dos teores de 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 equipamento Waters com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300x 7,8 mm) com ácido sulfúrico 0,01N como eluente no fluxo de 0,6 mL/min, na temperatura de 45°C e volume de amostra de 20 μ L.

4.5.6 Determinação de compostos fenólicos

As concentrações dos compostos fenólicos foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em equipamento Waters com detector de UV coluna WATERS C18 5 μ m (300x3,9 mm), temperatura 25°C utilizando como eluente acetonitrila e água na proporção de 1:9 com 1% de ácido acético no fluxo de 0,8 mL/min e volume de amostra 20 μ L.

4.6 Metodologia para análise dos resultados

4.6.1 Determinação do rendimento de hidrólise enzimática

O cálculo da máxima concentração teórica de glicose que poderia ser obtida no hidrolisado celulósico considerando a conversão de toda celulose presente na celulignina da palha de arroz foi estimada pela Equação 11. O rendimento de hidrólise enzimática ($R_{\text{hidrólise}}(\%)$) foi determinado pela razão entre a concentração de glicose obtida pela concentração teórica Equação 12.

Equação 11 - Cálculo da máxima concentração teórica de glicose obtida a partir da hidrólise enzimática

$$C_{GLI \text{ teórica}} = T_{\text{sólidos}} \times T_{\text{celulose}} \times Fc$$

Equação 12 - Rendimento de hidrólise enzimática

$$R_{HIDRÓLISE}(\%) = \frac{C_{gli}}{C_{GLI \text{ teórica}}} \times 100$$

Onde: $C_{GLI \text{ teórica}}$ - concentração máxima de glicose teórica (g/L) ; $T_{\text{sólidos}}$ - teor de celulignina utilizada na hidrólise enzimática (g/L); T_{celulose} (g celulose/ g de celulignina); Fc -Fator de conversão de celulose em glicose (1,11); C_{gli} - concentração de glicose (g/L).

4.6.2 Determinação dos parâmetros fermentativos

Para avaliar o crescimento da levedura *K. marxianus* nos hidrolisados hemicelulósico e celulósico assim como a produção de etanol celulósico por esta cepa foi calculado: conversão de açúcares (hexose e/ou pentose) em biomassa ($Y_{X/S}$) (Equação 13), conversão de açúcares (hexose e/ou pentose) em etanol ($Y_{P/S}$) (Equação 14); produtividade volumétrica de etanol (Q_P) (Equação 15).

Equação 13 - Fator de conversão de açúcares em biomassa

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}$$

Equação 14 - Fator de conversão de açúcares em etanol

$$Y_{P/S} = \frac{C_{Ef} - C_{Ei}}{S_i - S_f}$$

Equação 15 - Produtividade volumétrica de etanol

$$Q_P = \frac{C_{Ef} - C_{Ei}}{t_f}$$

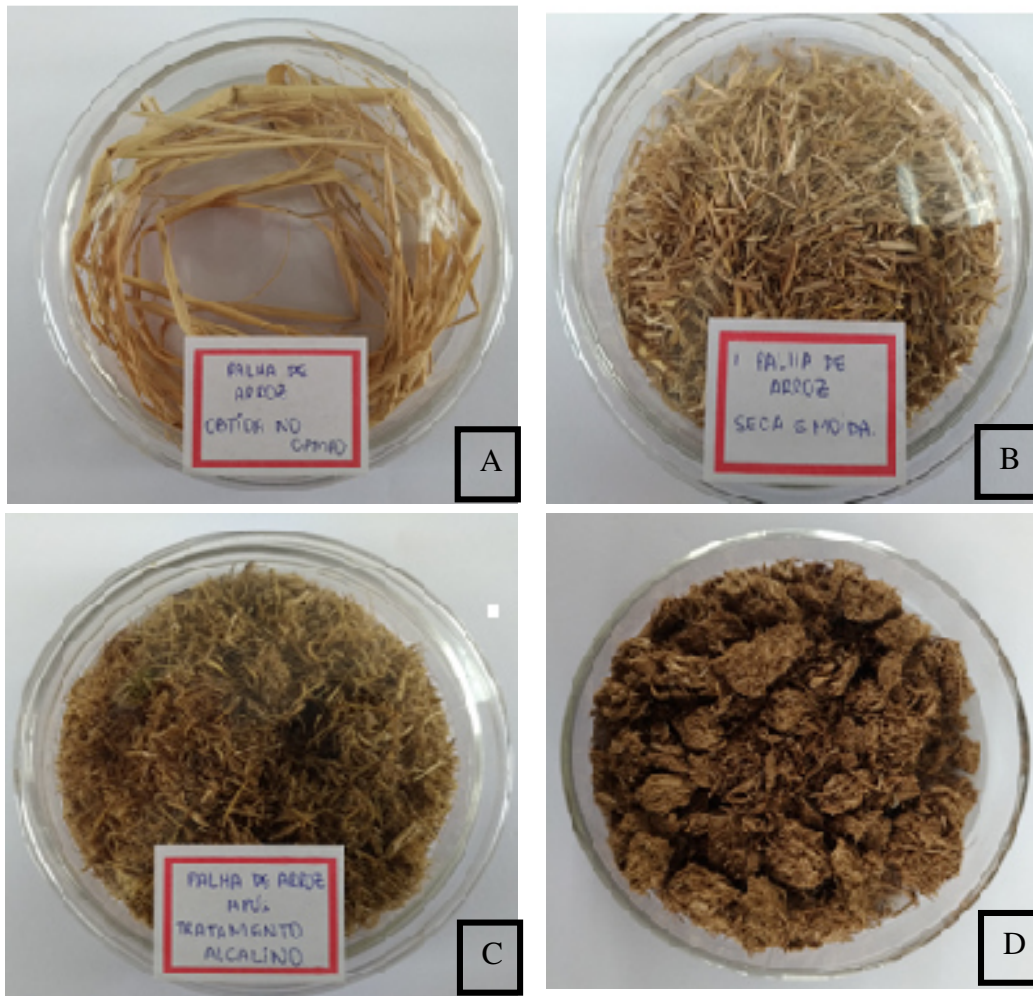
Onde: $Y_{X/S}$ – fator de conversão de açúcares (hexose e/ou pentose) em biomassa (g/g); $Y_{P/S}$ – fator de conversão de açúcares (hexose e/ou pentose) em etanol (g/g); Q_P – produtividade volumétrica de etanol (g/L.h); X_i – concentração inicial de biomassa (g/L); X_f – concentração final de biomassa (g/L); S_i – concentração inicial de açúcares (hexose e/ou pentose) (g/L); S_f – concentração final de açúcares (hexose e/ou pentose) (g/L); C_{Ei} – concentração inicial de etanol (g/L); C_{Ef} – concentração final de etanol (g/L); S_i – concentração inicial de açúcares (hexose e/ou pentose) (g/L); t_f – tempo final de fermentação (h).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico e celulignina de palha de arroz a partir da combinação dos pré-tratamentos álcali seguido por ácido diluído

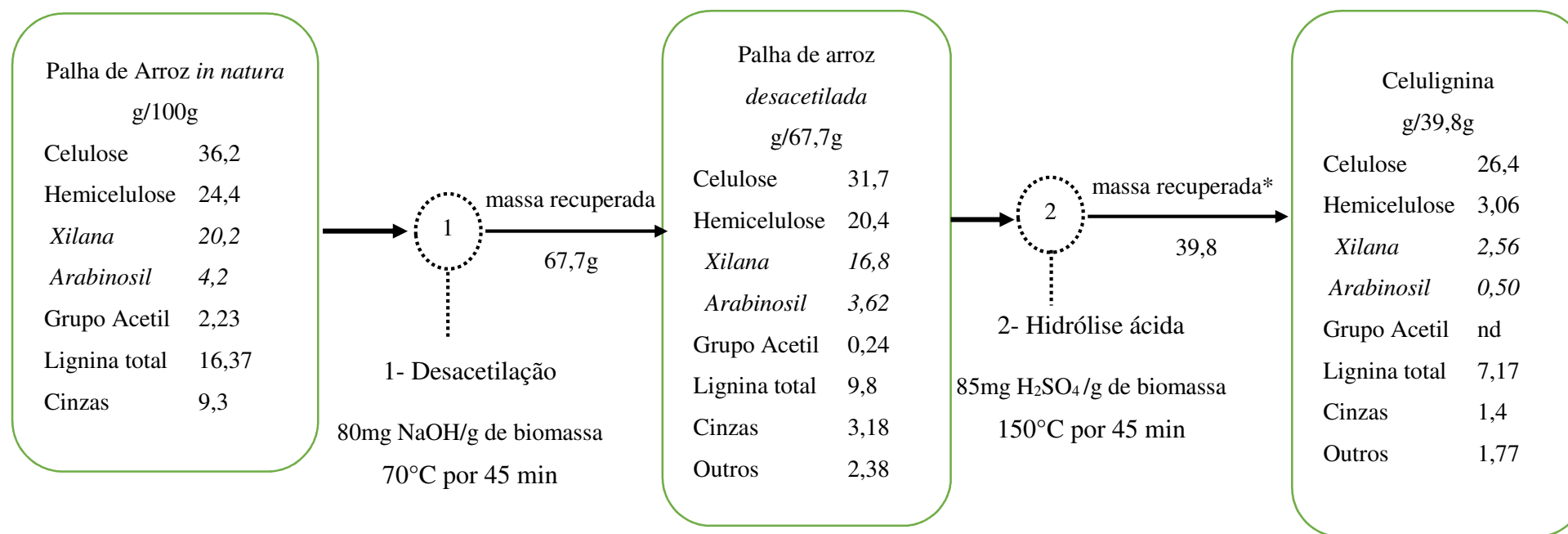
A Figura 16 mostra o aspecto da palha de arroz *in natura* antes e após moagem, assim como a fração sólida obtida após o pré-tratamento alcalino (palha desacetilada) e ácido (celulignina). A quantidade em massa recuperada e composição química da palha de arroz obtida após cada etapa de pré-tratamento se encontra na Figura 17 e Tabela 7, respectivamente. A composição da palha de arroz *in natura* foi determinada com base na metodologia padrão do *National Renewable Energy Laboratory* (SLUITER *et al.*, 2012) os valores obtidos para as frações (% m/m): celulose (36,2), hemicelulose (23,3), lignina insolúvel em ácido (12,74), lignina solúvel em ácido (3,63) e cinzas (9,3) são próximos aos valores encontrados por Castro *et al.*, 2017 para a palha de arroz *in natura* colhida na região de Canas(SP) (% m/m): 35,3 para a celulose, 23,8 hemicelulose, 13,1 de lignina insolúvel em ácido, 4,4 lignina solúvel em ácido e um teor de cinzas de $11,3 \pm 0,1$. Os autores Rastogi e Shrivastava (2017) reportam a composição de algumas matérias primas, incluindo da palha de arroz *in natura* (% m/m): 28-36 celulose, 23-28 hemicelulose, 12-14 lignina e o teor de cinzas varia de 14-20. Os teores de lignina e cinzas observados no presente estudo foram maior e menor respectivamente do que a faixa reportada pelos autores. Isto pode ter ocorrido devido fatores sazonais, como clima e o solo os quais podem influenciar na composição de um material lignocelulósico.

Figura 16 - A- Palha de arroz *in natura* colhida no campo; B-palha de arroz *in natura* após moagem; C- fração sólida (palha de arroz desacetilada) obtida pós tratamento alcalino; D- fração sólida obtida após pré-tratamento alcalino e ácido (celulignina).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 17 - Diagrama de balanço de massa: composição da palha de arroz in natura e do material sólido obtido.



*massa de celulignina recuperada considerando os 100g iniciais de palha de arroz.

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 7 - Composição química da palha de arroz *in natura*, desacetilada e celulignina

Componentes	Composição (% m/m)		
	<i>In natura</i>	Desacetilada	Celulignina
Celulose	36,2 ± 0,4	46,8 ± 0,12	66,4 ± 1,7
Hemicelulose	24,4 ± 0,4	30,15 ± 0,5	7,68 ± 0,06
Xilana	20,2 ± 0,7	24,8 ± 0,7	6,42 ± 0,06
Arabinosil	4,2 ± 0,3	5,35 ± 0,4	1,26 ± 0,06
Grupo Acetil	2,23 ± 0,12	0,36 ± 0,1	nd
Lignina total	16,37 ± 0,20	14,53 ± 0,86	18,01 ± 0,23
Lignina insolúvel	12,74 ± 0,11	12,1 ± 0,9	17,23 ± 0,14
Lignina solúvel	3,63 ± 0,15	2,43 ± 0,05	1,3 ± 0,1
Cinzas	9,3 ± 0,1	4,7 ± 0,35	3,5 ± 0,15
Extrativos	11,05 ± 1,66	nd	nd
Total	99,55	96,54	95,59

nd - não detectado.

Fonte: Arquivo pessoal

Inicialmente foi realizado um tratamento alcalino brando (etapa de desacetilação) na palha *in natura* empregando NaOH 80mg/g de biomassa, a 70°C por 45 min. O principal objetivo desta etapa foi a remoção dos grupos acetil, os quais normalmente são solubilizados na fração hemicelulósica após a hidrólise ácida e atuam como inibidor na etapa de fermentação do hidrolisado hemicelulósico para produção de etanol por leveduras (CASTRO *et al.*, 2017; AKINOSHO *et al.*, 2015). Além disso, o pré-tratamento com álcali pode hidrolisar ligações do tipo éster e glicosídicas na parede celular dos materiais lignocelulósicos, acarretando na alteração estrutural da lignina e redução do complexo lignina-hemicelulose, proporcionando um aumento na porosidade e da área superficial da fração sólida obtida após o tratamento (WU, *et al.*, 2017; CHENG *et al.*, 2010). De acordo com a Figura 17, após a etapa de desacetilação ocorreu a remoção de 89,2% de grupos acetil, 65,6% de cinzas, 40,1% de lignina, em relação as frações dos polissacarídeos 12,4% de celulose e 16,4% de hemicelulose foram removidas. Estes dados estão próximos ao

observados por Castro *et al.* (2017) na literatura, que após realizar a etapa de desacetilação da palha *in natura* nas condições empregadas no presente estudo, observaram a remoção de 86,5 % dos grupos acetil, 60,4 % de cinzas, 34 % de lignina, 15,1% de celulose e 16,8% de hemicelulose. Cheng *et al.* (2010) realizaram um pré-tratamento alcalino na palha de arroz *in natura* (40 mg de NaOH/ g de biomassa à 55°C, 3h) os autores observaram uma menor remoção de 23,1% de lignina em relação ao presente trabalho, que pode ter ocorrido pela baixa quantidade de álcali. Esta hipótese pode ser corroborada pelo estudo de Castro *et al.*, (2017) que verificaram que a baixa concentração de álcali mesmo com o aumento da temperatura proporcionou uma menor remoção de lignina na palha de arroz *in natura*. Em relação a quantidade de celulose do material pré-tratado Cheng *et al.* (2010) observaram uma perda de 9,7% desta macromolécula, um valor próximo ao do presente estudo (12,4%). Wu *et al.* (2017) utilizando a combinação do ultrassom com o tratamento álcali (200 mg de NaOH/g de palha de arroz, 50°C por 1h) removeu 57, 5% da lignina, no entanto houve uma alta perda da hemicelulose, aproximadamente 50%, um valor 3 vezes superior que o obtido no presente trabalho.

Ainda de acordo com a Figura 17, nota-se que após a etapa de hidrólise ácida ocorreu a remoção de 85% de hemicelulose, 68,5% de lignina ácido solúvel e 56,2% de cinzas presentes na palha de arroz desacetilada. A diminuição destes componentes proporcionou a obtenção da celulignina com um alto teor de celulose (66,4 %) e lignina (18%) como mostra a Tabela 7. Um estudo de Hsu *et al.* (2010) através do pré-tratamento com ácido sulfúrico na palha de arroz *in natura*, avaliou o efeito da remoção da hemicelulose na sacarificação enzimática do material pré-tratado. Os autores observaram uma correlação linear entre a diminuição da hemicelulose (80-96%) na fração sólida pré-tratada e o rendimento de hidrólise enzimática. Além da hemicelulose, segundo a literatura, a remoção de lignina também têm um efeito positivo no rendimento de hidrólise da celulose, isto foi demonstrado por Ahmed *et al.*, (2016) em que a remoção de 10,15% da lignina da palha de arroz *in natura* promoveu o aumento de 32 para 91% no rendimento de hidrólise enzimática. No presente estudo ocorreu a remoção de 87,5% de hemicelulose e 56,2% de lignina total da palha *in natura*. A diminuição do teor destas macromoléculas na celulignina deve favorecer o processo de sacarificação uma vez que segundo Hsu *et al.* (2010) o desprendimento da xilana e a reestruturação da lignina da fração pré-tratada proporciona uma maior exposição da celulose do material levando a uma maior acessibilidade das enzimas celulolíticas a esta macromolécula.

A baixa quantidade de cinzas na celulignina, 3,5%, também deve favorecer o processo de sacarificação da celulose. Isto porque Talukder, Goh e Puah (2017) através de testes de hidrólise enzimática (coquetel celulolítico Cellic CTec2) em celulose cristalina (Avicel PH-101) na presença e na ausência de pó de sílica amorfa, observaram o incremento de 32 para 52% no rendimento de hidrólise da celulose. De acordo com os autores, a sílica presente na biomassa lignocelulósica atua negativamente durante a hidrólise da celulose adsorvendo as enzimas celulolíticas por interações eletrostáticas e/ou ligações de hidrogênio.

A Tabela 8 mostra a composição do licor alcalino e do hidrolisado hemicelulósico obtidos após a etapa de desacetilação e pré-tratamento ácido, respectivamente. Nota-se que o rendimento de hidrólise da ácida foi de 80% e a concentração de hidróxi-metil furfural (HMF) 0,22 g/L furfural 0,04 g/L e ácido acético de 0,13 g/L neste trabalho. Hsu *et al.*, (2010) observaram que acima de 85% de rendimento de hidrólise ácida uma alta concentração de ácido acético, HMF e furfural, 1,3, 0,1 e 1,5 g/L, respectivamente. Estes compostos são inibidores em processos fermentativos (AKINOSHO *et al.*, 2015).

Tabela 8 - Composição do licor alcalino e do hidrolisado hemicelulósico em açúcares e compostos fenólicos

Licor alcalino		Hidrolisado hemicelulósico	
Componentes	Concentração (g/L)	Componentes	Concentração (g/L)
Xilose	1,24	Xilose	18,27
Glicose	2,30	Arabinose	4,02
Celobiose	1,19	Glicose	5,76
Arabinose	0,19	Celobiose	1,19
Ácido acético	2,54	Ácido acético	0,130
Ácido furóico	0,1	5-HMF	0,22
Pirocatecol	0,2	Furfural	0,04
Álcool vanilil	0,04	Álcool vanilil	0,21
Ácido furóico	-	Ácido furóico	0,34
Ácido gálico	-	Ácido gálico	0,11
Vanilina	0,002	Vanilina	0,07
Ácido p-cumárico	0,3	Ácido p-cumárico	0,18
Ácido ferúlico	0,2	Ácido ferúlico	0,13

Fonte: Arquivo pessoal

5.2 Obtenção do hidrolisado celulósico: hidrólise enzimática da celulignina da palha de arroz

A sacarificação enzimática da celulignina obtida a partir da hidrólise com sulfúrico diluído (0,85% m/v H₂SO₄, a 150°C por 10 min) da palha de arroz desacetilada (conforme item 5.1) foi realizada em reator não convencional do tipo moinho de bolas vertical (MBV) em batelada alimentada empregando um teor de celulignina de 20 % (m/v) que corresponde aproximadamente 18 % (m/m), nas condições descritas na Tabela 9, utilizando as enzimas Cellubrix (21,5 FPU por grama de celulose) e β-glicosidase (64 UI/g de celulose).

Tabela 9 - Condições empregadas para a hidrólise enzimática da celulignina em reator MBV

Variáveis	Valores
Agitação (rpm)	100
Temperatura (°C)	46
Tempo (h)	48
Volume de trabalho (mL)	500
Teor de sólidos (celulignina) (% m/v)	20

Fonte: Arquivo pessoal

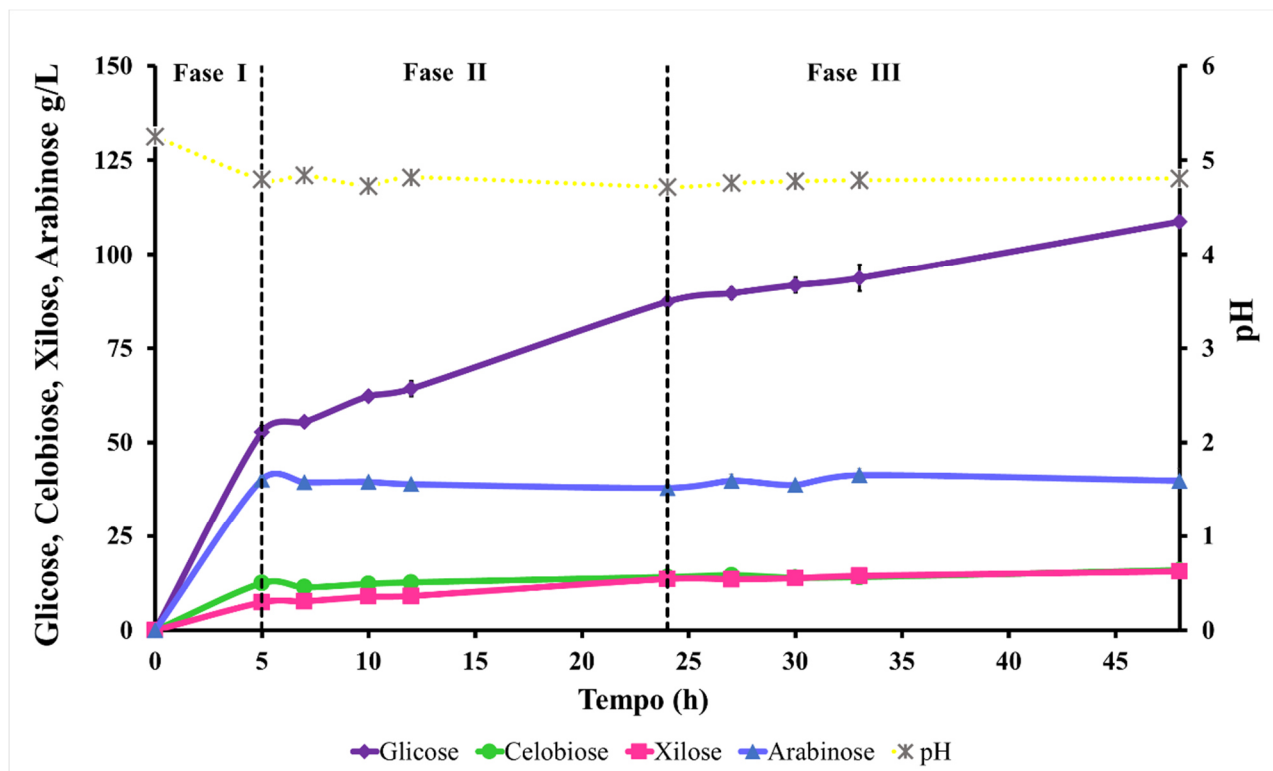
A partir do teor de celulose presente na celulignina mostrado na Tabela 7 (66,4 % m/m) e do teor de sólidos empregado na hidrólise enzimática 20 % m/v, pode-se inferir que a máxima concentração de glicose a ser obtida no hidrolisado celulósico é 147,4 g/L, conforme a Equação 11.

$$C_{GLI\ teórica} = T_{sólidos} \times T_{celulose} \times Fc = 200 \times \frac{66,4}{100} \times 1,11 = 147,4\ g/L$$

Onde: C_{GLI teórica}- concentração máxima de glicose teórica (g/L); T_{sólidos}- teor de celulignina utilizada na hidrólise enzimática (g/L); T_{celulose} (g celulose/ g de celulignina); Fc -Fator de conversão de celulose em glicose (1,11 g/g).

Nesta etapa de sacarificação enzimática, foram coletadas amostras durante o processo de para acompanhar a concentração de açúcares (glicose, celobiose, xilose e arabinose) (g/L) e o pH do meio reacional. A Figura 18 mostra o perfil de liberação de açúcares e o pH com o tempo.

Figura 18 - Concentração de açúcares no meio durante o processo de hidrólise enzimática da celulignina da palha de arroz.



Fonte: Arquivo pessoal

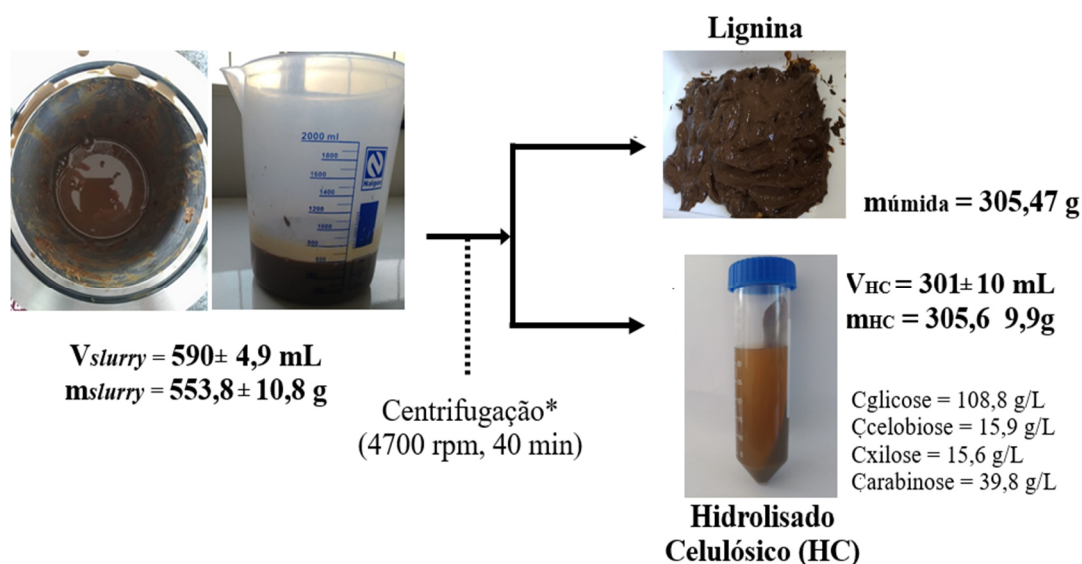
De acordo com a Figura 18, pode ser observado que a taxa de liberação de açúcares (T_L) foi maior durante as 5h iniciais, sendo (g/L.h): para celobiose 2,5; xilose, 1,5; arabinose, 8; glicose 10,5. Após este período nota-se que a concentração de celobiose e arabinose foi praticamente constante no hidrolisado, a alta concentração de arabinose observada durante a hidrólise enzimática (~39,5 g/L) é devido a presença deste açúcar no complexo celulolítico da Cellubrix (CASTRO *et al.*, 2017). Para a xilose, foi observado uma queda na sua taxa de liberação para 0,2 g/L.h, até aproximadamente 20h. No período de 24h até 48h nota-se que a concentração deste açúcar ficou constante no hidrolisado.

Em relação a taxa de liberação de glicose pode se observar três fases distintas, a primeira em 5h com 10,5 g/L.h, a segunda fase começando após 5 h, em que ocorre um declínio na taxa de liberação de glicose até 1,82 g/L.h em 24 h. Após este período, ocorre terceira fase, alcançando uma TL de 0,89 g/L.h em 48 h. Li, Zhang e Angelidaki (2009) ao realizarem a hidrólise enzimática com teor de 10 % (m/m) de palha de colza pré-tratada hidrotermicamente (0,11 g Celluclast 1.5L/ g celulose e 0,05 g β - glicosidase/g de celulose, 52°C, em frasco Erlenmeyer, pH 5,0 por 24 h) observaram um declínio na taxa de liberação de glicose no meio de 2,65 vezes após 6 h de reação. Segundo os autores a queda da

produtividade pode ser atribuída à inibição das enzimas (enzimas celulolíticas) pelo produto (glicose). Esta hipótese foi corroborada por Qin *et al.* (2013), que através da hidrólise enzimática da palha de milho pré-tratada com amônia (teor de 6% glucana (m/m) utilizando as enzimas: Accellerase 1500 – 60 FPU/ g de glucana e Novozyme 188 – 30 CBU/ g de celulose, frasco Erlenmeyer, 50°C, 200 rpm por 168 h) observou após 24 h uma taxa de liberação de glicose praticamente constante.

A Figura 19 mostra os valores médios de massa e volume do *slurry* obtido com o término do processo de sacarificação (48 h) assim como a massa úmida da fração sólida (lignina) e do hidrolisado celulósico obtido após sua centrifugação.

Figura 19 - A- Massa e volume médio do *slurry* obtido após processo de sacarificação enzimática (48h); B- massa e volume médio de hidrolisado celulósico obtido.



*Centrífuga: Thermo scientific-HEBRAEUS MEGAFUGE 16R

Fonte: Arquivo pessoal

A concentração de glicose obtida após 48 h de hidrólise enzimática da celulignina da palha de arroz foi 108,8 ± 2,1 g/L, o rendimento médio de hidrólise (73,8%) foi calculado conforme a Equação 12 (item 4.6.1).

$$R_{HIDRÓLISE}(\%) = \frac{C_{gli}}{C_{GLI\ teórica}} \times 100 = \frac{108,8}{147,4} \times 100 = 73,8\%$$

A Tabela 10 apresenta o rendimento de hidrólise calculado através da quantidade de glicose liberada no meio deste trabalho e de outros autores, os quais empregaram um alto teor de sólidos (superior a 18% m/m). É possível observar na Tabela 12 que os rendimentos

de hidrólise variaram de 56,6% a 84%, e que o rendimento observado no presente trabalho (73,8%) se encontra dentro dos valores encontrados na literatura. Nota-se ainda que o tempo de hidrólise obtido neste estudo foi inferior ao observado pelos autores com rendimento superior a 80%.

Tabela 10 - Sacarificação enzimática com alto teor de sólidos empregando a biomassa lignocelulósica, rendimento obtido assim como o tempo, carga enzimática e forma de condução do processo.

Biomassa	Teor de sólidos	Carga enzimática/ g celulose	Frasco/ Reator	CP* Agitação (rpm) T (°C)	Tempo (h)	RH	Autor
Celulignina de palha de arroz	18 % (m/m)	29,5 FPU (Cellubrix e β -glicosidase proporção 1:3)	Reator moinho de bolas vertical com 30 esferas de vidro	Batelada* alimentada 100 rpm 46°C	48h	73,8	Presente trabalho
Cedro oriental (pré-tratado com bissulfito ácido)	20 % (m/m)	46 FPU Accelerase ^R (Genencor)	Frasco erlenmeyer com 20 esferas de aço inoxidável	Batelada 250 rpm 50°C	144	84	RAMACHANDRIYA <i>et al.</i> (2013)
Palha de milho pré-tratada com ácido	25% (m/m)	10,7 FPU Spezyme CP (Genencor)	Reator tipo tanque agitado	Batelada alimentada** 400 rpm 45°C	120	80	HODGE <i>et al.</i> (2009)
Palha de milho pré-tratada com ácido	25% (m/m)	10,7 FPU Spezyme CP (Genencor)	Reator tipo tanque agitado	Batelada alimentada*** 400 rpm 45°C	216	80	HODGE <i>et al.</i> (2009)
Bagaço de cana de açúcar prétratado com peróxido de hidrogênio alcalino	18*% (m/m)	15 FPU -Cellulase** 25 CBU - β – glicosidase	Reator tipo tanque agitado	Batelada alimentada 150 rpm 50°C	48	56,6	MARTINS; RABELO; COSTA, 2015

Onde : CP- modo de condução do processo de hidrólise enzimática, T- temperatura(°C), R_H – rendimento de hidrólise enzimática considerando somente a quantidade de glicose obtida.** Cellulase *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Sigma–Aldrich), β – glicosidase (Sigma–Aldrich).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3 Avaliação do crescimento do inóculo de *K. marxianus* nos hidrolisados (celulósico ou hemicelulósico) e seu impacto na fermentabilidade do hidrolisado celulósico

Nesta etapa foi avaliado o perfil de crescimento da levedura *K. marxianus* em meios de cultivo preparados com hidrolisado celulósico ou hemicelulósico de palha de arroz (item 5.2 e 5.1, respectivamente), suplementado com extrato de levedura e os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, conforme descrito no item 4.3.2, na temperatura de 35°C. Para utilização do hidrolisado hemicelulósico na formulação do meio de cultivo foi necessário reajustar o pH de 1,89 para 5,0. A Tabela 11 apresenta a composição deste hidrolisado quanto a concentração açúcares e seus produtos de degradação (furfural e hidróxi-metil furfural-5-HMF) e compostos fenólicos, antes e após a alteração do pH.

Tabela 11 - Composição do hidrolisado hemicelulósico em açúcares e compostos fenólicos antes e após ajuste de pH 1,8 (HHO- hidrolisado hemicelulósico original) e 5,0(HHC- hidrolisado hemicelulósico corrigido) para composição do meio de cultivo (MC2).

Hidrolisado Hemicelulósico			
Componentes (g/L)	HHO	HHC	% ΔV
	pH 1,89	pH 5,0	
Xilose	18,27	21,52	15
Arabinose	4,11	5,32	20
Glicose	5,82	8,63	12
Celobiose	1,19	1,2	6
Ácido acético	0,11	nd	90
5-HMF	0,22	0,22	0
Furfural	0,04	0,03	10
Álcool vanilil	0,21	nd	100
Ácido furóico	0,34	nd	100
Ácido gálico	0,11	0,06	50
Vanilina	0,07	0,06	10
Ácido p-cumárico	0,18	0,15	12
Ácido ferúlico	0,13	0,08	40

* nd – não detectado; ΔV - variação da concentração dos componentes.

Fonte: Arquivo pessoal

A Tabela 11 mostra que após a alteração do pH ocorreu um aumento na concentração de açúcares e uma diminuição na concentração de compostos fenólicos. Não foi necessário ajustar o meio contendo hidrolisado celulósico, pois este apresentou pH 5,1 os componentes em açúcares e compostos fenólicos do hidrolisado celulósico antes e após a diluição para composição do meio de cultivo se encontra na Tabela 12.

Tabela 12 - Composição do hidrolisado celulósico (HC) antes e após a diluição para composição do meio de cultivo (MC1).

Hidrolisado Celulósico		
Componentes	pH 4,5	pH 5,1
	Concentração (g/L)	Concentração (g/L)
Glicose	108,0	33,11
Celobiose	11,2	3,95
Xilose	13,15	4,06
Arabinose	37,72	12,0
Ácido acético	nd	nd
5-HMF	0,01	0,003*
Furfural	0,006	0,002*
Ácidovanilínico	0,04	0,012*
Vanilina	0,007	0,002*
Ácido ferúlico	0,015	0,004*

* nd – não detectado, * valores estimados de acordo com o fator de diluição (3,26)

Fonte: Arquivo pessoal

Pode se observar que há uma concentração baixa concentração de compostos fenólicos no hidrolisado celulósico concentrado (pH = 4,5), após a diluição para composição do meio de cultivo não foi avaliada a concentração de fenólicos, mas com base no fator de diluição (3,26) este valor foi estimado.

Para avaliar o crescimento de *K. marxianus* no meio contendo hidrolisado hemicelulósico ou celulósico foram utilizadas as equações descritas na Tabela 13 obtidas a partir da curva de peso seco realizada em meio semi-definido contendo glicose ou xilose como fonte de carbono (conforme descrito no item 4.5.3 de métodos analíticos).

Tabela 13 - Equações correspondentes aos ajustes lineares dos meios semi-definidos contendo glicose ou xilose como fonte de carbono, sais e extrato de levedura.

Meio de Cultivo	Equação	R ²
Glicose	Abs = 3,4236 X + 0,0029	0,997
Xilose	Abs = 3,1451X – 0,0052	0,999

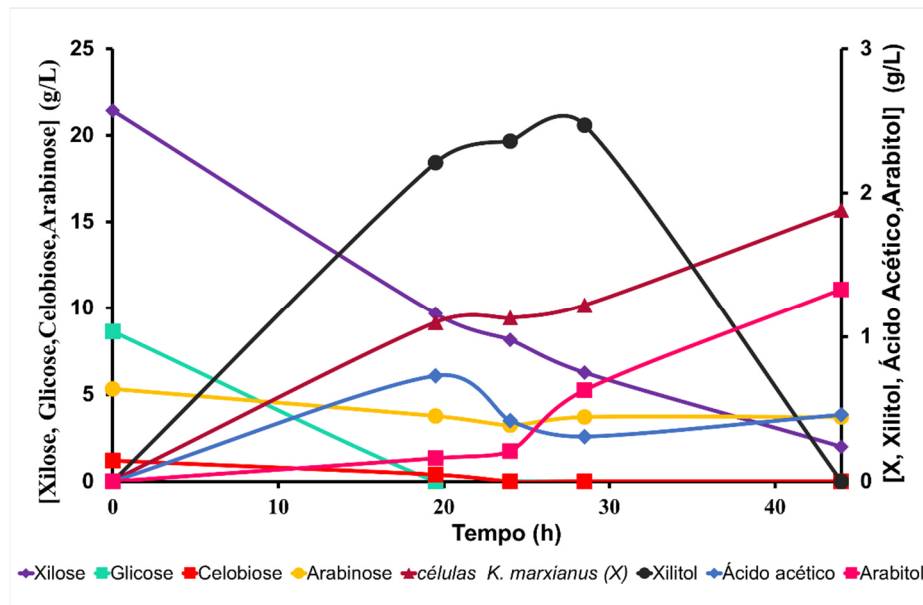
Abs – Absorbância em $\lambda = 600 \text{ nm}$; X – massa celular (g/L)

Fonte: Arquivo Pessoal

O perfil de crescimento de *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico (Figura 20) mostra que ocorreu o consumo simultâneo de glicose e xilose até toda glicose disponível no meio ser exaurida pela levedura, em 20 h. A partir deste momento (20h) até o tempo de 24 h nota-se que a *K. marxianus* não cresceu (dioxia), ainda neste período de dioxia ocorreu a máxima produção de xilitol (2,47 g/L) e de ácido acético (0,73 g/L). Após o tempo de 24 h observa-se que a levedura volta a crescer, consumindo todo xilitol e parte do ácido acético produzido, a concentração celular obtida ao final de 44 h foi 1,9 g/L.

Nitiyon et al (2016) realizaram o cultivo de *K. marxianus* BUNL-21 em meio semi-definido contendo duas fontes de carbono xilose (20g/L) e glicose (2 ou 20g/L) suplementado com extrato de levedura e peptona. Os autores verificaram a cepa de *K. marxianus* BUNL-21 em meio contendo 20g/L de xilose e 2 g/L de glicose metabolizou simultaneamente os dois açúcares conforme observado no presente trabalho, em baixas concentrações de glicose este açúcar não exerce repressão metabólica sobre o consumo de xilose. No meio contendo uma maior concentração de glicose (20 g/L), apesar de ambos açúcares serem consumidos simultaneamente o consumo de glicose ocorreu em 12h. No tempo de 72h de fermentação não foi observado pelos autores o consumo de toda xilose.

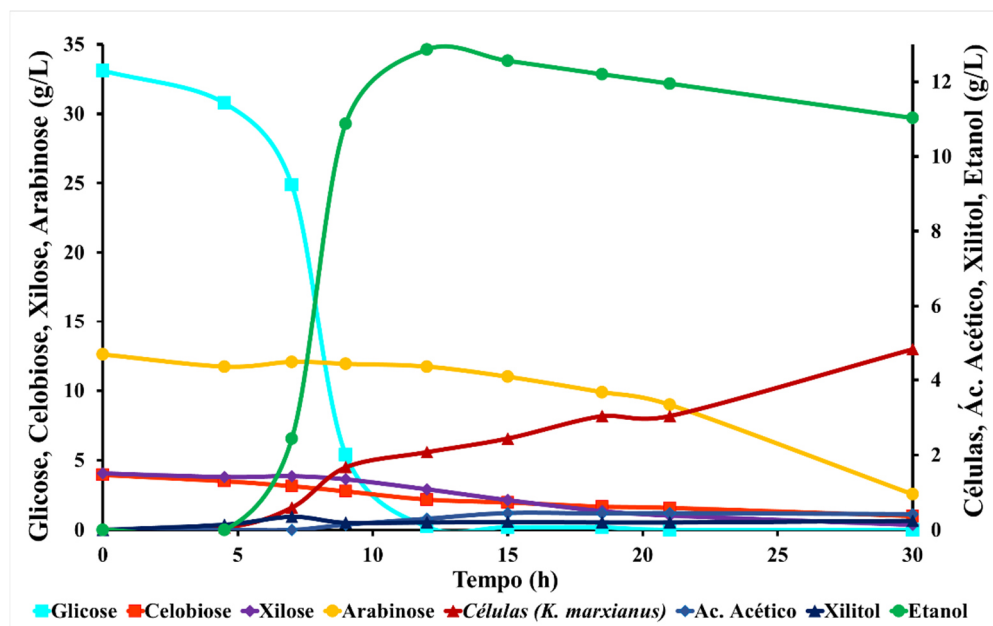
Figura 20 - Consumo de açúcares e produção de células, xilitol, ácido acético e arabitól de *K. marxianus* em meio complexo contendo hidrolisado hemicelulósico suplementado com sais e extrato de levedura



Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Figura 21, ao contrário do que foi observado no hidrolisado hemicelulósico a xilose só foi consumida após o consumo de toda glicose no meio. Além da xilose a glicose também exerceu repressão metabólica ao consumo de celobiose, a assimilação da arabinose só ocorreu após o esgotamento dos demais açúcares. Rodrussamee *et al.* (2011) observaram um comportamento semelhante da cepa *K. marxianus* a DMKU3-1042 que em meio semi-definido contendo glicose e xilose o consumo desta pentose só ocorreu após toda glicose ser exaurida do meio. Nota-se ainda na Figura 21 que além de biomassa (4,8 g/L), ocorreu a produção de etanol (11,03 g/L), ácido acético (0,42 g/L) e xilitol (0,24 g/L) no tempo de 30h.

Figura 21 - Consumo de açúcares e produção de células, etanol, ácido acético e xilitol de *K. marxianus* em meio complexo contendo hidrolisado celulósico suplementado com sais e extrato de levedura



Fonte: Arquivo pessoal

Analisando os parâmetros de crescimento de *K. marxianus* em hidrolisado celulósico e hemicelulósico (Tabela 14) pode-se notar que ocorreu uma maior conversão de açúcares em biomassa no meio contendo hidrolisado celulósico (MC1). Estes resultados podem ser explicados tanto pela fonte de carbono principal (glicose) que é mais facilmente metabolizada como pela menor concentração de compostos fenólicos no hidrolisado celulósico (SANDOVAL –NUÑEZ, 2018; RODRUSAMEE, 2011).

Tabela 14 - Parâmetros de crescimento de *K.marxianus* em meio contendo hidrolisado celulósico ou hemicelulósico.

Meio	* Y_{XS} (g/g)	Q_x (g/L.h)
Hidrolisado celulósico	0,10	0,16
Hidrolisado hemicelulósico	0,06	0,04

* Y_{XS} - fator de conversão de açúcares (glicose, xilose e arabinose) em biomassa; Q_x - produtividade volumétrica em biomassa.

Fonte: Arquivo pessoal

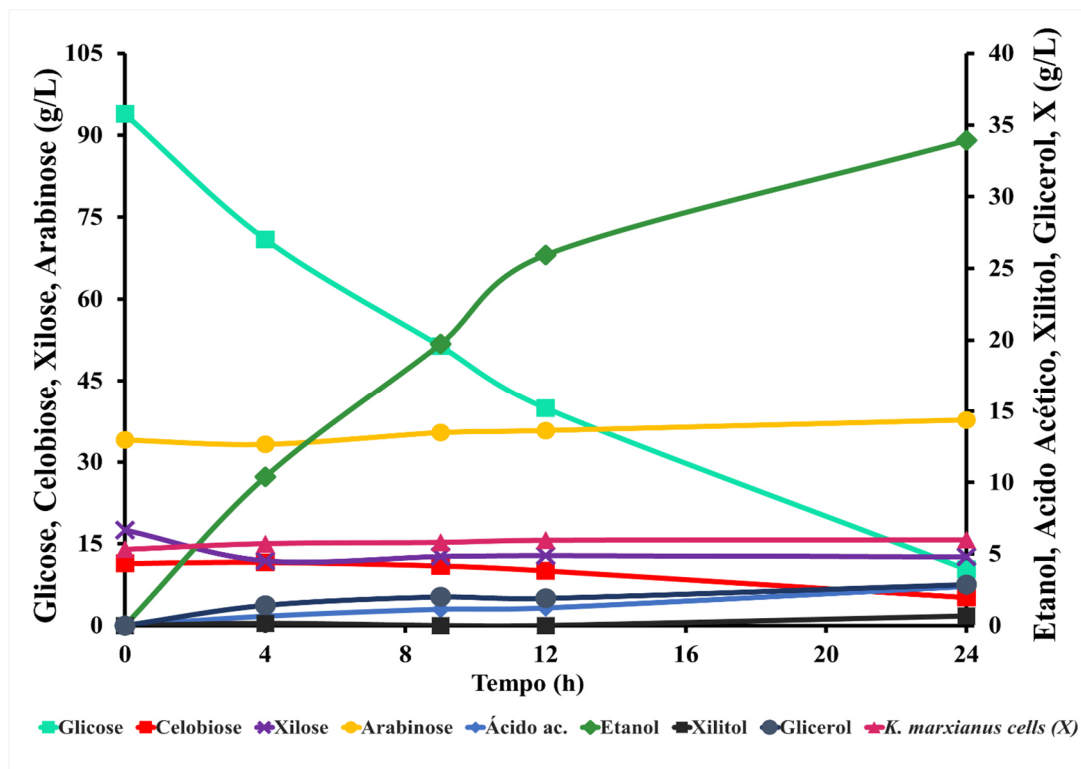
Após o crescimento celular em meio contendo hidrolisado celulósico ou hemicelulósico as células foram utilizadas como inóculo (5 g/L) para a produção de etanol celulósico à 40°C, nas condições descritas no item 4.3.2, visando avaliar o impacto do meio de crescimento no desempenho fermentativo de *K. marxianus*.

A Figura 22 mostra o desempenho fermentativo do inóculo de *K. marxianus* produzido em hidrolisado hemicelulósico na produção de etanol celulósico. Nota-se que em 12h de fermentação apenas a glicose foi consumida (57,5%). Após este período pode ser observado uma assimilação concomitante de celobiose e xilose pela levedura, sendo estes açúcares consumidos parcialmente ao final de 24 h (55 e 33%, respectivamente). Nota-se ainda que a *K. marxianus* não foi capaz de assimilar a arabinose durante o cultivo. A máxima concentração de etanol foi observada no tempo de 24 h, 33,93 g/L, com o fator de conversão de açúcares (glicose, celobiose e xilose) em etanol ($Y_{P/S}$) de 0,36 g/g e uma produtividade volumétrica em etanol (Q_P) de 1,41 g/L.h.

Além da produção de etanol, obteve-se no caldo fermentado a formação de xilitol (0,67 g/L), glicerol (2,86 g/L) e ácido acético (2,73 g/L). Em relação a produção de células, no tempo de 24h o fator de conversão de açúcares (glicose, celobiose e xilose) em biomassa foi $Y_{X/S} = 0,007$ g/g revelando que os açúcares metabolizados por *K. marxianus* durante o processo fermentativo foi utilizado majoritariamente para a formação de etanol, subprodutos e manutenção celular

Dasgupta *et al.* (2017) estudaram a produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* IPE453 em hidrolisado celulósico de bagaço de cana de açúcar empregando o inóculo (4g/L) produzido em meio contendo hidrolisado hemicelulósico. A fermentação foi realizada em meio contendo 45 g/L de glicose (hidrolisado celulósico) à 45°C em reator do tipo tanque agitado (200 rpm e 0,025 vvm) por 24h. Com o término da fermentação os autores observaram a concentração de 21,6 g/L de etanol no caldo fermentado o que gerou um fator de conversão de glicose em etanol de 0,44 g/g e uma produtividade volumétrica em etanol de 0,9 g/L.h. Comparando estes resultado com o obtido no presente trabalho, nota-se que apesar do menor valor de $Y_{P/S}$ * obtido com *K. marxianus* NRRL Y-6860, 18,2% inferior ao observado por Dasgupta, a concentração de glicose inicial no hidrolisado celulósico utilizada neste estudo foi duas vezes superior a utilizada pelos autores, proporcionando produtividade volumétrica em etanol 36% maior.

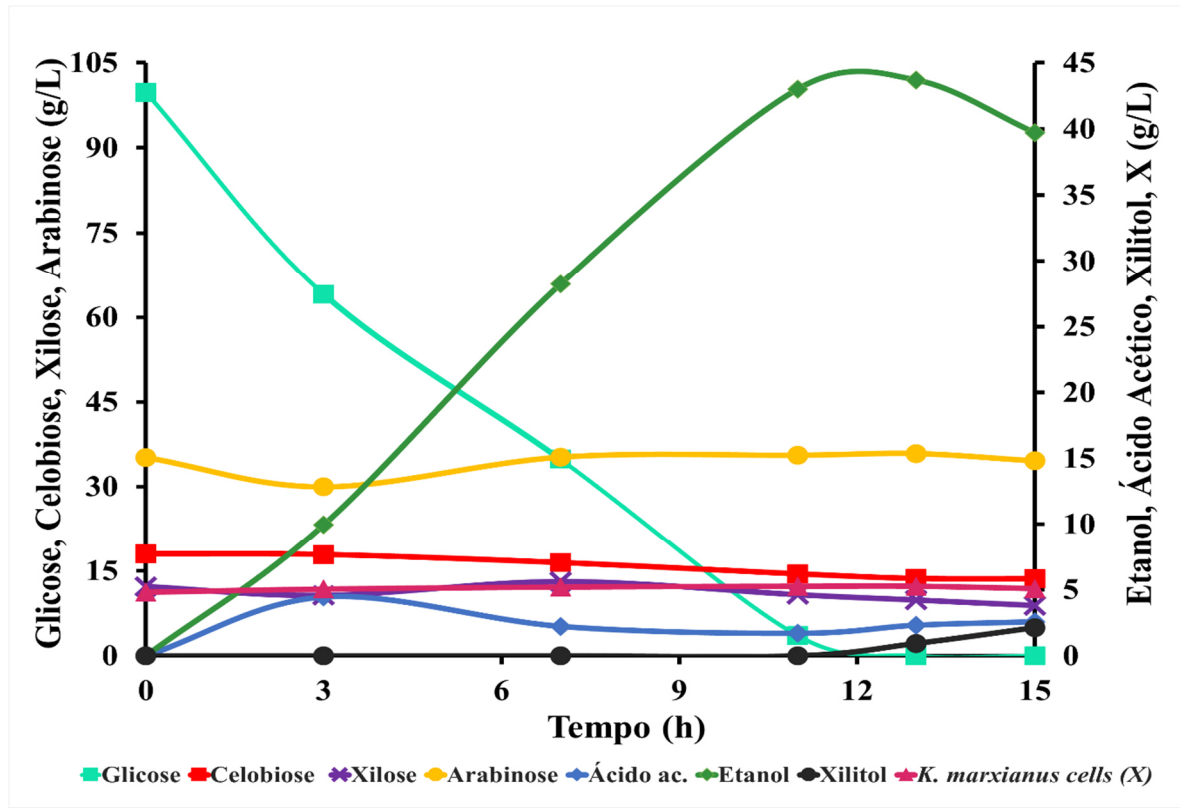
Figura 22 - Desempenho fermentativo de *K. marxianus* em hidrolisado celulósico utilizando células produzidas em meio contendo hidrolisado hemicelulósico.



Fonte :Arquivo pessoal

A Figura 23 mostra o desempenho fermentativo de *K. marxianus* empregando o inóculo produzido em hidrolisado celulósico. Nota-se que concentração de etanol foi 43,02 g/L com 11 h de fermentação, neste período a produtividade volumétrica em etanol foi 3,91 g/L.h e o fator de conversão de açúcares (glicose, celobiose e xilose) em etanol de 0,43 g/g. Em relação ao consumo de açúcares, em 11h pode-se observar a assimilação de 96,4% glicose, 19,7% de celobiose e 11,8 % de xilose disponível no meio por *K. marxianus*. Além de etanol foi observado no caldo fermentado ácido acético e xilitol, no entanto a produção de xilitol só ocorreu após 11h de reação sendo sua concentração 2,13 g/L no tempo de 15h, a quantidade de biomassa produzida foi baixa, produzindo um $Y_{X/S}$ de 0,003 g/g, isto revela que as fontes de carbono disponíveis no meio foram utilizadas pelas células de *K. marxianus* para manutenção celular e produção de etanol, ácido acético e xilitol (TAVARES *et al.*, 2019).

Figura 23 - Desempenho fermentativo de *K. marxianus* em hidrolisado celulósico utilizando células produzidas em meio contendo hidrolisado celulósico



Fonte: Arquivo pessoal

A Tabela 15 mostra os parâmetros fermentativos da produção de etanol celulósico por *K. marxianus* à 40°C, a partir da utilização do inóculo produzido em meio contendo hidrolisado celulósico (HC) ou hidrolisado hemicelulósico (HH).

Tabela 15 - Parâmetros fermentativos de *K. marxianus* em hidrolisado celulósico utilizando o inóculo preparado em meio contendo hidrolisado celulósico (HC) ou hidrolisado hemicelulósico (HH)

Parâmetros fermentativos	HC	HH
Tempo (h)	11	24
Glicose residual (g/L)	3,55	10,30
Etanol (g/L)	43,02	33,93
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,43	0,36
Q_P (g/L.h)	3,91	1,41
η (%)	84,0	70,5

$Y_{P/S}$ - fator de conversão de açúcares (glicose, celobiose e xilose) em etanol

Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados revelam que o inóculo de *K. marxianus* preparado em hidrolisado celulósico favoreceu os parâmetros de fermentação, sendo o fator de conversão de açúcares (glicose, celobiose, xilose) em etanol $Y_{P/S} = 0,43$ g/g no superior ao fator de conversão obtido a partir do inóculo produzido em meio contendo hidrolisado hemicelulósico (HM- $Y_{P/S} = 0,36$ g/g). Nota-se que ainda na Tabela 15 que a maior diferença ocorreu no tempo de fermentação que foi 2,2 vezes maior no meio contendo o inóculo preparado em HC (11h), devido a isso, a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) observada neste meio de fermentação (HC), $Q_P = 3,91$ g/L.h, foi maior que no meio contendo o inóculo preparado em HM- $Q_P = 1,41$ g/L.h.

Como o desempenho fermentativo de *K. marxianus* para a produção de etanol celulósico foi melhor com o inóculo produzido em hidrolisado celulósico (HC), este foi o meio utilizado para realização do planejamento experimental foi o produzido em hidrolisado celulósico.

5.4 Avaliação da suplementação nutricional do hidrolisado celulósico na produção de etanol por *K. marxianus*

Nesta etapa foi avaliado o efeito da suplementação nutricional do hidrolisado celulósico sobre o desempenho fermentativo de *Kluyveromyces marxianus* através do planejamento experimental do tipo fatorial completo 2^4 utilizando os sais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e do extrato de levedura. As fermentações foram realizadas em hidrolisado celulósico contendo inicialmente 100 g/L de glicose à 40°C, empregando o inóculo produzido em hidrolisado celulósico (5g/L) por 12h, conforme descrito no item 4.3.3.

De acordo com a Tabela 16 pode ser observado que em todos os ensaios fermentativos a levedura consumiu praticamente toda glicose em 12h. Em relação ao açúcares totais (glicose, celobiose, xilose e arabinose), nota-se ocorreu o consumo em torno de 70% destas fontes de carbono por esta cepa. As maiores concentrações de etanol foram obtidas nos ensaios 1 e 2 no hidrolisado não suplementado e no adicionado de sulfato de amônio, respectivamente. Nestes ensaios a concentração de etanol foi aproximadamente 45 g/L. Nota-se ainda que a conversão de açúcares totais (glicose, xilose, celobiose e arabinose) em etanol ($Y_{P/S}^*$) variaram de 0,36 a 0,41 g/g, os valores de produtividade volumétrica em etanol (Q_P) foram de 3,27 a 3,81 g/L.h.

Tabela 16 - Níveis reais dos sais utilizados no planejamento experimental do tipo fatorial completo 2^4 , consumo de açúcares (glicose, xilose celobiose e arabinose) por *K. marxianus*, e parâmetros fermentativos.

Ensaio	Níveis reais dos nutrientes				Parâmetros						
	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7 H ₂ O (g/L)	EL (g/L)	Glicose consumida (%)	Açúcares* consumidos (%)	Etanol (g/L)	Células final (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Y* _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h ⁻¹)
1	0,00	0,00	0,00	0,00	99,42	68,31	45,31	5,67	0,46	0,39	3,78
2	1,00	0,00	0,00	0,00	99,40	67,63	45,77	5,17	0,48	0,41	3,81
3	0,00	1,50	0,00	0,00	100,00	68,31	42,48	5,64	0,45	0,38	3,54
4	1,00	1,50	0,00	0,00	99,45	70,02	44,00	5,08	0,42	0,36	3,67
5	0,00	0,00	0,10	0,00	99,39	69,12	40,98	5,46	0,44	0,36	3,42
6	1,00	0,00	0,10	0,00	99,42	69,07	44,87	5,08	0,45	0,39	3,74
7	0,00	1,50	0,10	0,00	100,00	70,93	39,33	5,72	0,41	0,33	3,28
8	1,00	1,50	0,10	0,00	99,45	69,32	44,00	5,78	0,43	0,37	3,67
9	0,00	0,00	0,00	3,00	99,22	68,20	42,07	5,29	0,45	0,38	3,51
10	1,00	0,00	0,00	3,00	99,40	68,78	42,59	5,81	0,42	0,37	3,55
11	0,00	1,50	0,00	3,00	100,00	69,22	39,27	5,81	0,42	0,34	3,27
12	1,00	1,50	0,00	3,00	99,43	69,19	44,73	5,26	0,45	0,39	3,73
13	0,00	0,00	0,10	3,00	99,17	68,93	40,86	5,55	0,43	0,35	3,41
14	1,00	0,00	0,10	3,00	99,09	69,00	42,03	5,81	0,44	0,36	3,50
15	0,00	1,50	0,10	3,00	99,14	69,72	40,36	5,55	0,42	0,34	3,36

(Continua)

(Conclusão)

Ensaio	Níveis reais dos nutrientes				Parâmetros						
	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ .7 H ₂ O (g/L)	EL (g/L)	Glicose consumida (%)	Açúcares* consumidos (%)	Etanol (g/L)	Células final (g/L)	Y _{P/S} (g/g)	Y* _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h ⁻¹)
16	1,00	1,50	0,10	3,00	99,44	66,80	44,46	5,93	0,44	0,39	3,71
PC	0,50	0,75	0,05	1,50	99,63	69,56	43,53	5,37	0,42	0,37	3,63
PC	0,50	0,75	0,05	1,50	99,58	69,15	44,59	5,44	0,42	0,37	3,72
PC	0,50	0,75	0,05	1,50	99,59	69,94	43,34	5,47	0,41	0,36	3,61
PC	0,50	0,75	0,05	1,50	99,54	69,41	44,56	5,50	0,42	0,37	3,71

*Parâmetros: Açúcares consumidos (%) – porcentagem do total de açúcares (glicose, celobiose, xilose e arabinose) consumido. Y_{P/S} - conversão de glicose em etanol; Y*_{P/S} - conversão dos açúcares consumidos (glicose, celobiose, xilose e arabinose) em etanol, Q_P – Produtividade volumétrica de etanol no tempo de 12h.

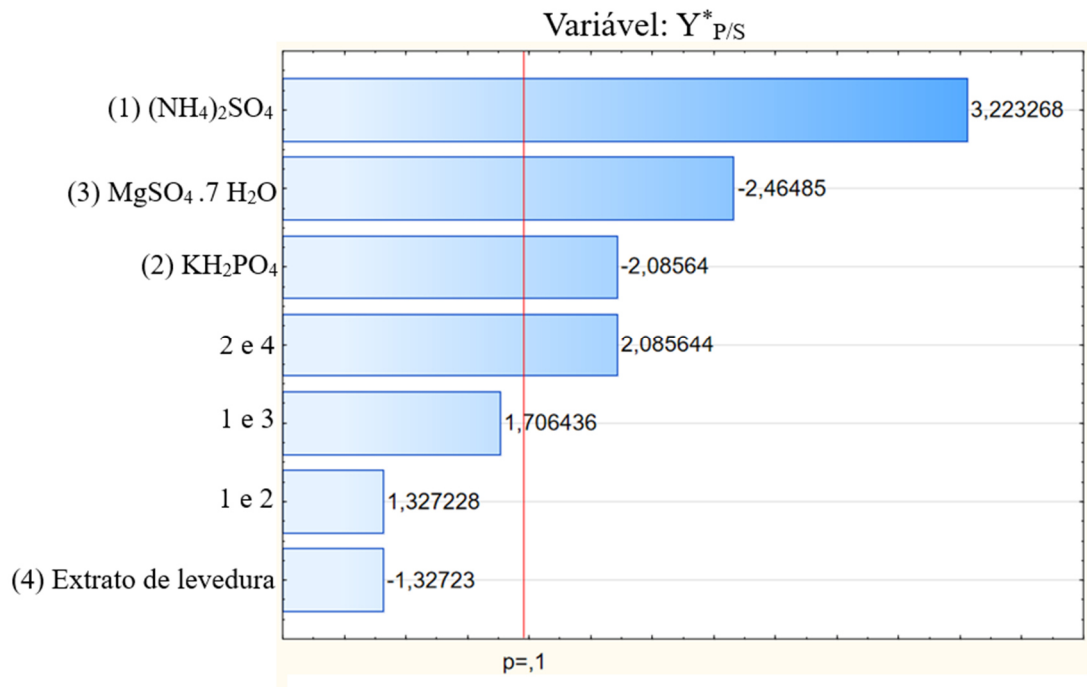
Fonte: Arquivo pessoal

Para análise dos dados obtidos no planejamento experimental foi utilizado o software Statistica® 13.4 (StatSoft, Inc., 215 Tulsa, OK, USA2) obtendo-se o diagrama de Pareto para análise do efeito da suplementação nutricional utilizando como variável de resposta os parâmetros fermentativos o fator de conversão de açúcares totais em etanol ($Y_{P/S}^*$) e a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) em hidrolisado celulósico. No diagrama de Pareto as barras representam os efeitos padronizados (t calculado) relacionados às variáveis de resposta. As variáveis representadas pelas barras que ultrapassam a linha vertical (t tabelado) são consideradas estatisticamente significantes ao nível de confiança de 90%. O estudo da significância estatística dos efeitos e suas interações sobre as respostas obtidas, assim como a avaliação da qualidade do ajuste do planejamento (coeficiente de determinação R^2) foi realizada através da análise da variância dos efeitos (ANOVA).

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 24) utilizando como variável de resposta o fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}^*$) nota-se que a nível de confiança de 90% que a adição do sal $(NH_4)_2SO_4$ produziu um efeito positivo significativo (+ 3,2) sobre $Y_{P/S}^*$. Nota-se ainda que o $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ e o KH_2PO_4 , apresentaram um efeito principal negativo de (-2,46) e (-2,08), respectivamente, sobre o fator de conversão de açúcares em etanol. O extrato de levedura não apresentou efeito sobre $Y_{P/S}^*$. Em relação a interação entre KH_2PO_4 e o extrato de levedura apesar de seu efeito ser positivo, como o efeito principal do KH_2PO_4 foi negativo e com influência semelhante sobre $Y_{P/S}^*$, que a observada por sua interação.

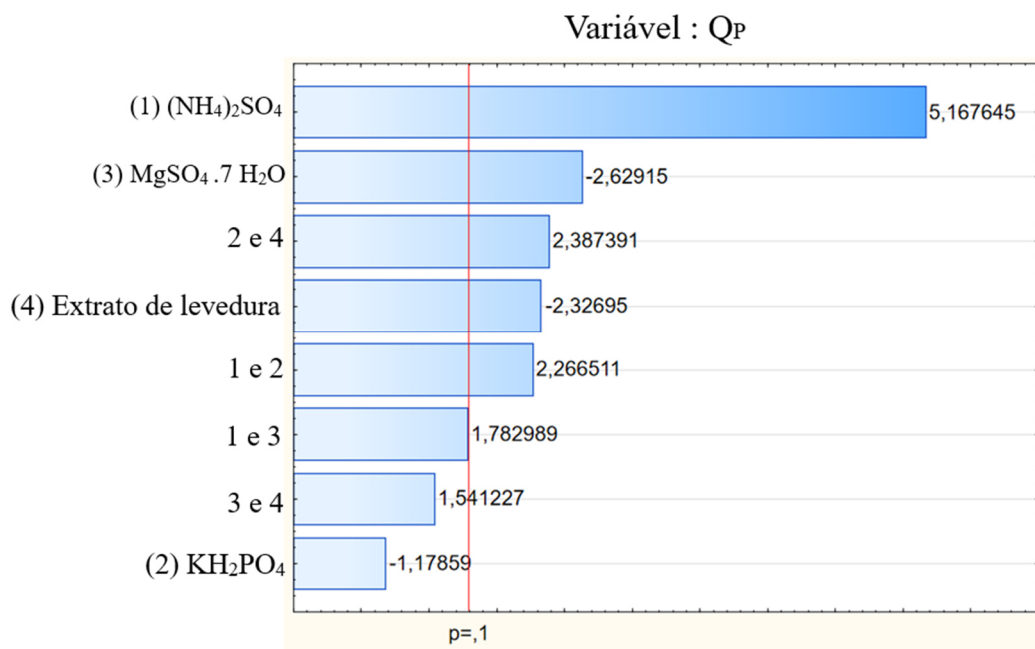
Analisando a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) como variável de resposta nota-se (Figura 25) nota-se que a variável $(NH_4)_2SO_4$ teve um efeito positivo significativo (+5,2). O sal $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ e o extrato de levedura teve um efeito negativo e significativo de (-2,6) e (-2,3) sobre a produtividade volumétrica de etanol, já a adição de KH_2PO_4 diferente do foi observado para $Y_{P/S}^*$ não apresentou efeito sobre esta variável (Q_P) a um nível de confiança de 90%. Em relação às interações, nota-se que foram positivas e significativas a adição de KH_2PO_4 e extrato de levedura (+2,4) e a interação entre $(NH_4)_2SO_4$ e KH_2PO_4 .

Figura 24 - O diagrama de Pareto demonstra as estimativas dos efeitos da variação da concentração dos sais e do extrato de levedura sobre fator de conversão de açúcares em etanol por *K. marxianus* com 90% de confiança.



Fonte: Arquivo Pessoal

Figura 25 - O diagrama de Pareto demonstra as estimativas dos efeitos da variação da concentração dos sais e do extrato de levedura na produtividade volumétrica em etanol em etanol por *K. marxianus* com 90% de confiança.



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 17 - Análise da variância com o erro total para os principais efeitos e suas interações dos sais e extrato de levedura empregando com variável de resposta o fator de conversão de açúcares em etanol.

Fatores	SS	GL	MQ	F	p
1 (NH ₄) ₂ SO ₄	0,182756	1	0,182756	26,7046	0,000310
2- KH ₂ PO ₄	0,009506	1	0,009506	1,3891	0,263430
3- MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,047306	1	0,047306	6,9124	0,023443
4- EL	0,037056	1	0,037056	5,4147	0,040084
1 e 2	0,035156	1	0,035156	5,1371	0,044580
1 e 3	0,021756	1	0,021756	3,1790	0,102172
2 e 4	0,039006	1	0,039006	5,6996	0,036027
2 e 3	0,016256	1	0,016256	2,3754	0,151521
Erro	0,075280	11	0,006844		
		R = 0,72	R²_{aju} = 0,56		

* EL- extrato de levedura

Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 18- Análise da variância com o erro total para os principais efeitos e suas interações dos sais e extrato de levedura empregando com variável de resposta a produtividade volumétrica em etanol

Fatores	SS	GL	MQ	F	p
1 (NH ₄) ₂ SO ₄	0,001806	1	0,001806	10,3895	0,007310
2- KH ₂ PO ₄	0,000756	1	0,000756	4,3499	0,059030
3- MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,001056	1	0,001056	6,0755	0,029773
4- EL	0,000306	1	0,000306	1,7615	0,209132
1 e 2	0,000306	1	0,000306	1,7615	0,209132
1 e 3	0,000506	1	0,000506	2,9119	0,113649
2 e 4	0,000756	1	0,000756	4,3499	0,059030
Erro	0,002086	12	0,000174		
		R = 0,83	R²_{aju} = 0,72		

Fonte: Arquivo Pessoal

Os resultados da análise estatística mostraram que o $Y^*_{P/S}$ e o Q_P tiveram um efeito significativo e positivo do $(NH_4)_2SO_4$ sobre este parâmetro. No entanto, considerando que os valores de $Y^*_{P/S}$ e Q_P obtidos durante a fermentação do HC apenas suplementado com 1,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ ($Y^*_{P/S} = 0,41$ g/g e $Q_P = 3,81$ g/L.h) são próximos aos obtidos no HC sem qualquer suplementação ($Y^*_{P/S} = 0,39$ g/g e $Q_P =$ g/L.h)) optou-se pela utilização do HC sem adição de nutrientes nos ensaios fermentativos em reator *air-lift*.

5.5 Reator *air-lift*

5.5.1 Parâmetros hidrodinâmicos

Nesta etapa foi realizado o estudo dos parâmetros hidrodinâmicos do biorreator *air-lift* com circulação interna da Tecnal (TEC-BIO-P 3- AIR-LIFT), para avaliar a transferência de massa e calor no interior do vaso de reação no volume de 2L à 40°C. Os parâmetros hidrodinâmicos avaliados foram: velocidade superficial do gás na região de subida U_{GS} , coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{LA}), tempo de circulação (t_c), velocidade de circulação do líquido (U_L), tempo de mistura (t_m) e retenção gasosa (ϵ_G). A análise de cada parâmetro foi realizada nas vazões específicas de ar ($vvm\text{-min}^{-1}$): 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 e o fluido utilizado foi água destilada.

A Tabela 19 mostra os valores obtidos para os parâmetros hidrodinâmicos estudados nas diferentes vazões específicas de ar ($vvm\text{-min}^{-1}$): 0,125; 0,250; 0,375 e 0,5 utilizadas no estudo. Nota-se que o aumento da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}) acarretou no incremento no tempo de retenção gasosa (ϵ_G), na velocidade de circulação do líquido (U_L) e no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{LA}). O aumento observado no K_{LA} e na U_L pode-se observar que foi linear, a retenção gasosa também pode ser observado este efeito linear nos primeiros pontos. Em relação ao tempo de mistura (t_m) e de circulação (t_c) nota-se que ocorreu a diminuição dos valores destas variáveis aumento dos valores de U_{GS} .

Tabela 19 - Valores médios dos parâmetros hidrodinâmicos estudados utilizando como fluido água destilada (2L), na temperatura de 40°C no biorreator *air-lift*.

Φ_e (min^{-1})	U_{GS} (m/s)	K_{La} (h^{-1})	t_c (s)	U_L (m/s)	t_m (s)	ε_G (%)
0,125	0,0016	4,4 ± 0,1	23,3 ± 0,3	0,028	30 ± 0,7	0,33 ± 0,06
0,250	0,0032	9,59 ± 0,06	10,1 ± 0,2	0,064	29,34 ± 0,5	0,66 ± 0,08
0,375	0,0047	13,0 ± 0,3	7,14 ± 0,3	0,092	20 ± 0,5	1,32 ± 0,1
0,500	0,0063	17,2 ± 0,4	5,00 ± 0,5	0,132	20 ± 0,8	1,64 ± 0,1
1,00	0,0126	33,4 ± 2,3	na	na	na	na

* Onde: Φ_e – vazão específica de ar, U_{GS} -velocidade superficial do gás na região de subida, K_{La} -coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, t_c -tempo de circulação, U_L - velocidade de circulação do líquido, t_m -tempo de mistura e ε_G - retenção gasosa; na- não analisado.

Fonte: Arquivo pessoal

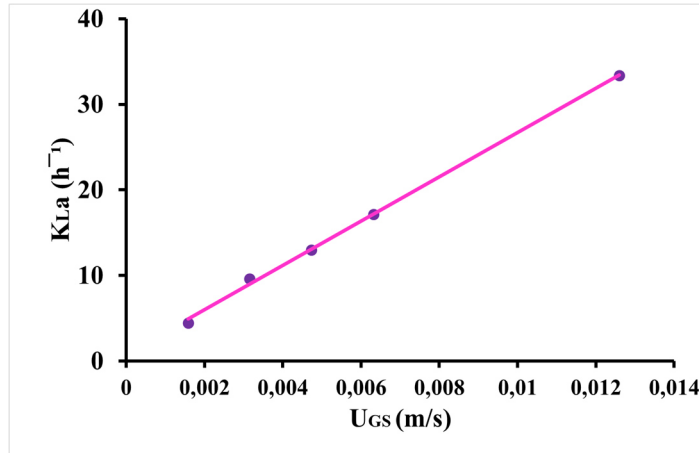
A única variável independente neste tipo de biorreator é a velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}), devido a isso foi avaliado o comportamento dos parâmetros: K_{La} , t_c , U_L , t_m em função do aumento de U_{GS} .

A Figura 25 mostra uma relação linear (Equação 16) entre o aumento da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}) e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}), o mesmo foi observado por Cerri (2009) e Rodriguez (2015) para baixas vazões específicas de ar.

Equação 16 - Modelo matemático que descreve a variação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio em função da velocidade superficial do gás

$$K_{La} = 2587. U_{GS} + 0,082 \quad R^2 = 0,999$$

Figura 26 - Coeficiente volumétrico de oxigênio (K_{La}) em função da velocidade superficial do gás na região de subida



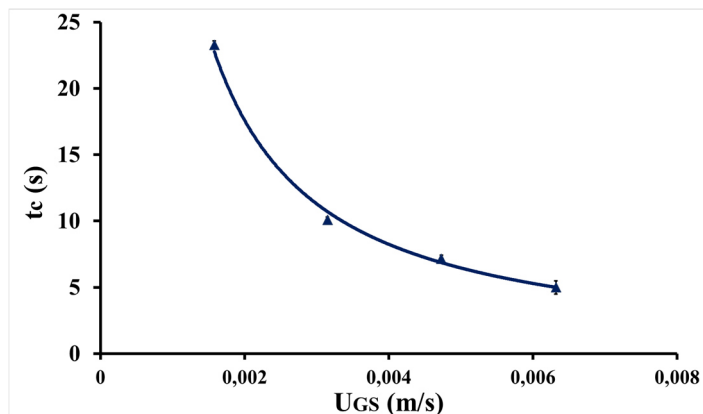
Fonte: Arquivo pessoal

O comportamento do tempo de circulação em relação ao aumento da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}) é revelado na Figura 27. Nota-se quando o valor de U_{GS} dobrou de 0,0016 para 0,0032 m/s o tempo de circulação decresceu mais que a metade. Para valores de U_{GS} superiores a 0,0032 m/s ainda observou-se a queda do tempo de circulação, porém o decréscimo no valor desta variável foi menor. A equação 17 mostra o modelo matemático que descreve o comportamento do tempo de circulação em função de U_{GS} .

Equação 17 - Modelo matemático que descreve a valores do tempo de circulação obtidos em função da velocidade superficial do gás

$$t_c = 0,0197 \cdot U_{GS}^{-1,093} \quad R^2 = 0,996$$

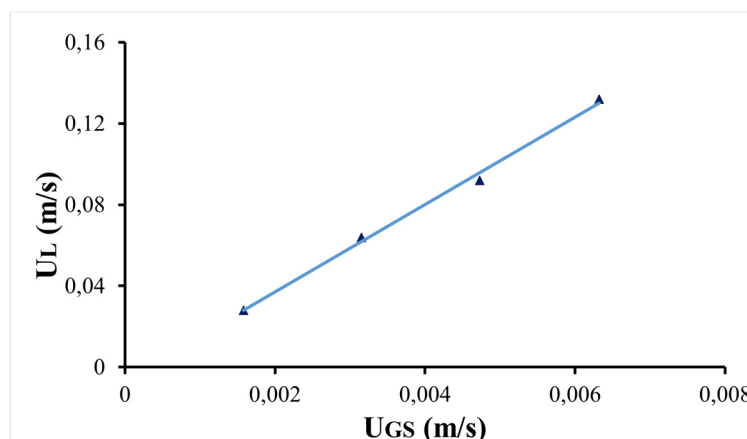
Figura 27 - Valores médios do parâmetro hidrodinâmico tempo de circulação obtidos na temperatura de 40°C utilizando diferentes vazões específicas de ar (0,125-0,5 min^{-1}) em função da velocidade superficial do gás na região de subida



Fonte: Arquivo pessoal

A Figura 28 mostra que os valores da velocidade de circulação do líquido (U_L) aumentaram de maneira linear com o incremento da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}), como revela o modelo matemático que correlaciona estes parâmetros obtidos no presente trabalho (Equação 18).

Figura 28 - Valores de velocidade de circulação do líquido obtidos na temperatura de 40°C utilizando diferentes vazões específicas de ar (0,125-0,5 min^{-1}) em de água destilada (2L) em função da velocidade superficial do gás na região de subida



Fonte: Arquivo pessoal

Equação 18 - Modelo matemático que descreve a variação da velocidade de circulação do líquido (U_L) em função da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS})

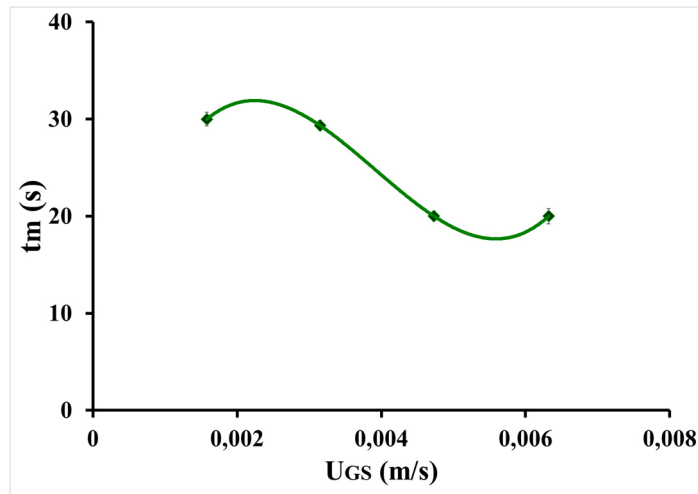
$$U_L = 21,52 \cdot U_{GS} - 0,006 \quad R^2 = 0,996$$

O tempo de mistura apresentou um perfil diferente ao observado para o tempo de circulação, embora os valores obtidos para este parâmetro também decresceram com o aumento da velocidade superficial do gás na região de subida, nota-se que dobrando o valor de U_{GS} de 0,0016 para 0,0032 m/s este parâmetro permaneceu praticamente constante. Com o incremento de U_{GS} para 0,0047 m/s observa-se um declínio 1,5 vezes em t_m , seguido por uma nova estabilização na faixa de U_{GS} de 0,0047 e 0,0063 m/s. O modelo matemático que descreve o comportamento desta variável em função de U_{GS} se encontra na Equação 19.

Equação 19 - Modelo matemático que descreve o decréscimo do tempo de mistura observado em relação ao incremento da velocidade superficial do gás na região de subida

$$t_m = 8E+08 \cdot U_{GS}^3 - 9E+06 \cdot U_{GS}^2 + 28643 \cdot U_{GS} + 4,609 \quad R^2 = 0,999$$

Figura 29 – Perfil do tempo de mistura (t_m) em função do aumento da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}) obtidos na temperatura de 40°C utilizando água destilada (2L) como fluido.



Fonte: Arquivo pessoal

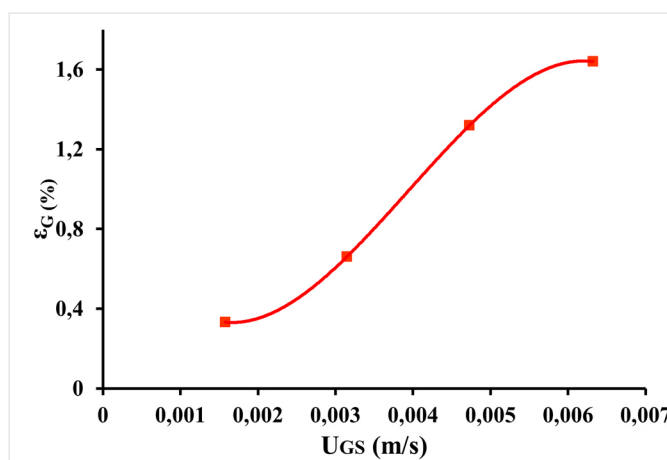
A transferência de massa da fase gasosa para a fase líquida é determinada pelo tamanho de bolha e pela retenção gasosa, a qual revela a variação da altura da coluna de líquido no vaso de reação para uma vazão específica de ar. O conhecimento da retenção gasosa é importante para determinar o volume de líquido máximo que se pode empregar na fermentação.

No presente trabalho nota-se na Figura 30 que o aumento da velocidade superficial do gás na região de subida proporcionou o incremento da retenção gasosa de maneira linear até o valor de U_{GS} de 0,0047 m/s, a partir deste ponto pode-se observar o aumento ϵ_G mais lentamente. A equação 20 descreve o modelo matemático para os valores observados.

Equação 20 - Modelo matemático que descreve o aumento da retenção gasosa (ϵ_G) em função da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS})

$$t_m = -3E+07 * U_{GS}^3 + 331651 * U_{GS}^2 - 869,06 * U_{GS} + 0,988 \quad R^2 = 0,999$$

Figura 30 – Comportamento da retenção gasosa em função do aumento da velocidade superficial do gás na região de subida (U_{GS}) obtidos na temperatura de 40°C utilizando água destilada (2L) como fluido.



Fonte: Arquivo pessoal

A partir dos valores obtidos dos parâmetros hidrodinâmicos: U_{GS} , K_{LA} , t_c , U_L , t_m e ϵ_G mostrados na Tabela 19, pode-se inferir que no menor valor de vazão específica de ar estudada (0,125 vvm) o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio foi $4,44 \text{ h}^{-1}$. Neste ponto observa-se que o tempo de mistura e de circulação em água (2L) foram 30 e 23 segundos respectivamente, mostrando que neste K_{LA} ocorre a homogeneização da mistura no interior do vaso de reação.

Entretanto a retenção gasosa, que avalia o tempo de residência do gás no líquido, no K_{LA} de $4,44 \text{ h}^{-1}$ foi baixa, o que é adequado para presente trabalho que tem como objetivo a produção de etanol, obtido em meio de fermentação com baixa concentração de oxigênio. Portanto para os ensaios fermentativos em reator *air-lift* definiu-se a utilização do K_{LA} $4,44 \text{ h}^{-1}$.

5.5.2 Fermentação em reator *air-lift*

Nesta etapa foi realizada a produção de etanol utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* a partir do hidrolisado celulósico de palha de arroz em reator *air-lift* na mesma temperatura utilizada na avaliação nutricional (item 5.4), o K_{La} utilizado foi de $4,7 \text{ h}^{-1}$, conforme descrito na metodologia (item 4.4). Para efeito de comparação do desempenho fermentativo desta cepa em hidrolisado celulósico foi realizada uma fermentação neste reator sob as mesmas condições, utilizando o meio semi - definido contendo glicose.

Segundo Schimidell *et al.* (2001) a presença de alguns compostos como sais afetam de maneira negativa a transferência de oxigênio da fração gasosa para a fração líquida (K_{La}) no meio. Como observado na Tabela 7 (metodologia - item 4.4), a vazão específica de ar foi diferente para os ensaios em hidrolisado e no meio semi-definido (0,5 vvm e 0,25 vvm, respectivamente). Então pode-se inferir a partir dos dados obtidos que o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio K_{La} foi negativamente influenciado pela composição do hidrolisado celulósico, sendo necessário a introdução de uma vazão específica de ar maior para atingir o K_{La} de $4,7 \text{ h}^{-1}$.

A Figura 31 revela o desempenho fermentativo de *K. marxianus* em hidrolisado celulósico. Nota-se que com 11h de fermentação esta cepa consumiu 87,2% da glicose e a concentração de etanol foi de 31,8 g/L, praticamente a mesma encontrada no tempo de 10h (31,71 g/L), quando a concentração de glicose no meio era de 20,8 g/L. Durante as primeiras 11h foi observado o consumo somente de glicose pela levedura, no entanto no tempo de 22h, observou-se que além da glicose a levedura metabolizou celobiose e xilose. O mesmo foi observado no presente trabalho Figura 21, onde nota-se que o consumo dos demais açúcares só ocorreu após a glicose ser exaurida do meio fermentativo.

A concentração máxima de etanol foi atingida com 22h de fermentação 35,1 g/L, com fator de conversão de açúcares (glicose, xilose e celobiose) em etanol ($Y_{P/S}$) 0,31 g/g e produtividade volumétrica de 1,59 g/L.h, todavia os valores máximos de $Y_{P/S}$ e Q_P foram observados no tempo de 10h, 0,38 g/g e 3,17g/L.h, respectivamente a partir do consumo somente de glicose por *K. marxianus*. Como subprodutos da fermentação obteve-se glicerol, xilitol e ácido acético. A concentração máxima destas substâncias foram observadas no final da fermentação (22h), os valores encontrados foram (g/L): 3,65 glicerol, 1,83 de ácido

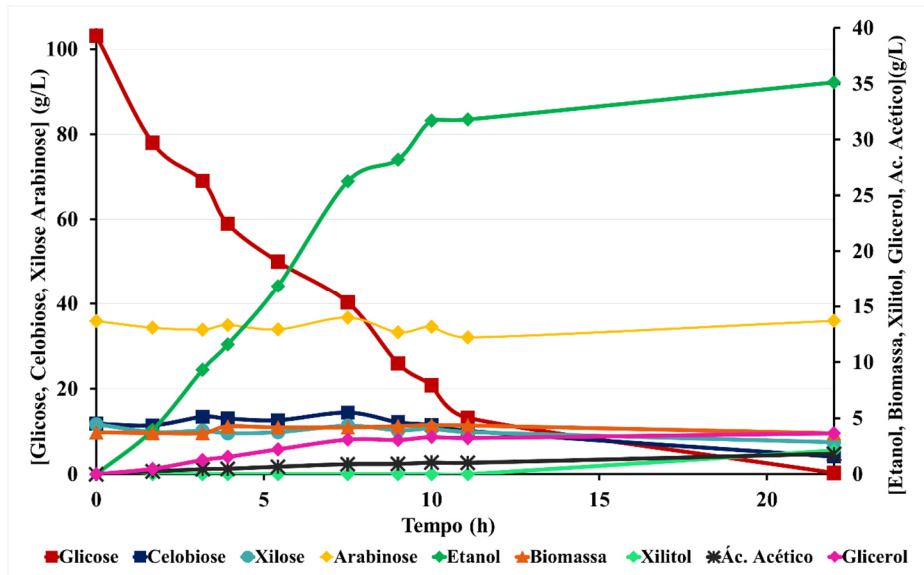
acético e 2,12 de xilitol. A formação de glicerol e ácido acético ocorreram no início da fermentação (1,7h), o xilitol, entretanto foi observado após 11h de fermentação.

Comparando os valores de produtividade volumétrica assim como o fator de conversão de açúcares em etanol obtidos em hidrolisado celulósico no *air-lift* em 22h de fermentação ($Q_P= 1,6 \text{ g/L.h}$ e $Y_{P/S}= 0,31 \text{ g/g}$), nota-se que os valores destes parâmetros em *air-lift* foram menores que os obtidos durante o planejamento experimental no tempo de 12h, $Q_P= 3,78 \text{ g/L.h}$ e $Y_{P/S}= 0,31 \text{ g/g}$ e $0,39 \text{ g/g}$ respectivamente. Além disso, na etapa de avaliação nutricional que foi realizada em frasco erlenmeyer, para os valores destes parâmetros fermentativos ($Y_{P/S}$ e Q_P) observou-se o consumo de 68,31% dos açúcares do meio (toda glicose foi consumida) e uma concentração de etanol de 45,3 g/L, enquanto no *air-lift* a *K. marxianus* no tempo de 22h consumiu somente 57% dos açúcares e a concentração de etanol foi 35,1 g/L.

Uma explicação para o baixo valor no consumo de açúcares e produção de etanol pode residir no tamanho do inóculo, durante o planejamento experimental (item 5.4) foi utilizada a concentração inicial aproximada 5,0 g/L de células, no reator esta concentração foi de 3,8 g/L. Além disso, o inóculo durante o planejamento experimental foi produzido em hidrolisado celulósico suplementado com sais ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$) e extrato de levedura (30h, 30g/L de glicose inicial) enquanto para o aumento de escala (reator) o inóculo foi obtido a partir do meio sintético suplementado com os mesmos sais do hidrolisado celulósico e extrato de levedura (17h, 30g/L de glicose inicial). O crescimento celular no próprio hidrolisado pode ter ativado o metabolismo dos demais açúcares, e as células *K. marxianus* estarem mais adaptadas ao hidrolisado.

Iniciando o processo fermentativo com a concentração celular aproximada de 4,2 g/L Dasgupta *et al.* (2017) produziram etanol celulósico em reator do tipo tanque agitado a partir de *Kluyveromyces marxianus* IIPE453 utilizando como matéria prima o bagaço de cana de açúcar. A partir da concentração inicial de glicose 45g/L no hidrolisado, os autores obtiveram um fator de conversão de açúcares em etanol de 0,44 g/g e uma produtividade volumétrica de 0,9 g/L.h, esta produtividade foi menor do que a observada no *air-lift* (1,59 g/L.h no tempo de 22h).

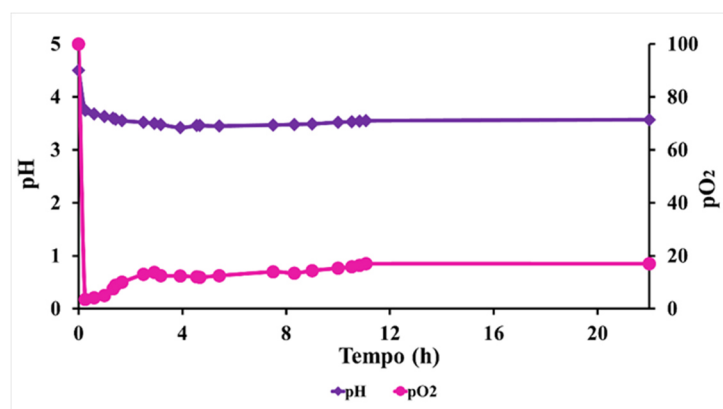
Figura 31 - Perfil do desempenho fermentativo da levedura *K. marxianus* NRRL-Y 6860 em hidrolisado celulósico no reator *air-lift*



Fonte: Arquivo Pessoal

Além da concentração inicial e o do meio de cultivo do para obtenção do inóculo, um outro fator que pode ter contribuído para a baixa concentração de etanol obtida é a concentração de oxigênio dissolvida no meio. Ao contrário do que foi observado na fermentação utilizando o meio definido em *air-lift*, a quantidade de oxigênio dissolvida no sistema não zerou (Figura 33). Com a adição do inóculo no reator a pressão parcial de oxigênio se manteve em 4% e aumentou no decorrer da fermentação, atingindo o valor aproximado de 19%.

Figura 32 - Quantidade de oxigênio dissolvido (pO_2) e do pH durante a produção de etanol em meio composto por hidrolisado celulósico à 40°C por *K. marxianus* em biorreator *air-lift*



Fonte: Arquivo pessoal

De acordo a Figura 33 o perfil de fermentativo de *K. marxianus* NRRL Y 6860 em meio semi-definido composto por glicose, sais e extrato de levedura (Figura 33) revela que o consumo de toda glicose (100 g/L) do meio foi concomitante com a máxima concentração de etanol encontrada no meio (44,4 g/L) no tempo de 6,5h, sendo os valores do fator de conversão ($Y_{P/S}$) e da produtividade volumétrica em etanol (Q_P) neste período 0,44 g/g. e 6,83 g/L/h, respectivamente. Como subprodutos do processo observou-se a formação de glicerol e ácido acético. A concentração máxima de glicerol (5,52 g/L) e ácido acético (1,04 g/L) foi atingida com 6,5h, mesmo tempo em que a concentração de etanol foi máxima. Após este período pode-se notar um declínio na concentração de glicerol (5,44 g/L), no entanto a concentração de ácido acético se manteve constante.

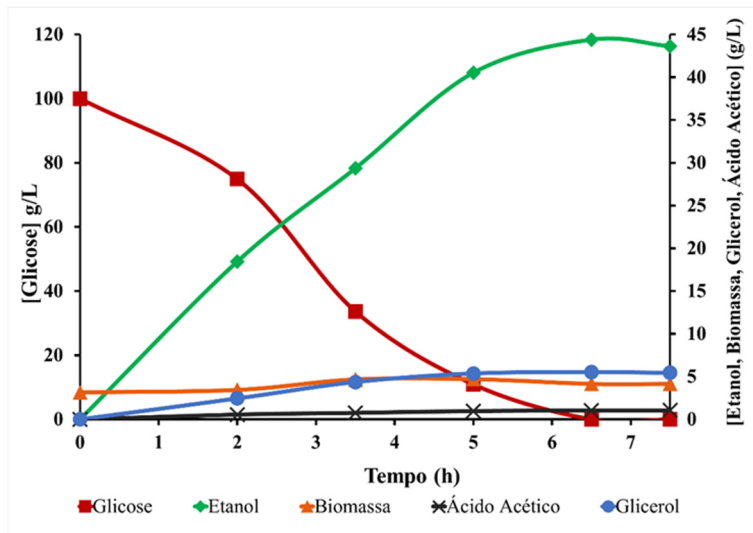
Tavares *et al.* (2019) produziram bioetanol em reator do tipo tanque agitado, na mesma temperatura (40°C) utilizando um K_{La} de $0,2 \text{ h}^{-1}$, sob agitação (300 rpm), utilizando a cepa *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 em meio semi-definido composto por glicose (89,7 g/L), o final de 24 h os autores observaram uma concentração de 36,2 g/L de etanol no caldo fermentado correspondendo a $Y_{P/S} = 0,41 \text{ g/g}$ e $Q_P = 1,51 \text{ g/L.h}$. Nota-se que a produtividade volumétrica obtida pelos autores foi 4,5 vezes menor que a do presente trabalho, um dos fatores que podem ter contribuído para o maior tempo de fermentação observado por Tavares *et al.* (2019) é a concentração de células inicial que foi 3 vezes inferior a utilizada neste estudo (3,1 g/L).

Além disso, Tavares *et al.* (2019) também encontraram a máxima concentração de glicerol (~11,0 g/L) e ácido acético 1-1,5 g/L no mesmo ponto em que a concentração de etanol foi máxima (36,2g/L), após este período estes valores permaneceram constantes. A quantidade de ácido acético obtida por estes autores foi próximo a obtida neste trabalho em biorreator *air-lift* em meio semi-definido, no entanto a concentração de glicerol observada por Tavares *et al.* (2019) foi o dobro. A produção de glicerol pode ser atrelada a necessidade da célula de obter co-fatores reduzidos para continuar a gerar energia (ATP) utilizada na biossíntese celular, além disso a produção de glicerol pode ser observada quando a célula se encontra em stress que pode ser gerado pela falta de nutrientes gerada no decorrer da fermentação, pressão osmótica, pH e dos produtos obtidos no decorrer do processo como etanol e ácidos acético, por exemplo (BAI, ANDERSON, MOO-YOUNG, 2008; TAVARES *et al.*, 2019).

No mais, é possível inferir a partir da Figura 31 que após o tempo de 6,5h, onde se obtém a máxima concentração de etanol, ocorre um declínio na concentração deste produto

no meio, o mesmo foi observado pelos autores Tavares *et al.* (2019), Da Silva *et al.* (2015) e Fu *et al.* (2009) o consumo de etanol após o esgotamento da glicose no meio pode estar relacionado ao etanol servir como fonte de carbono para a levedura.

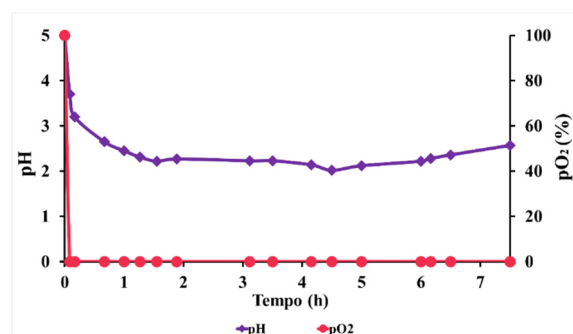
Figura 33 - Perfil do desempenho fermentativo da levedura *K. marxianus* NRRL-Y 6860 em meio composto por glicose, sais $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{KH}_2\text{PO}_4, \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ e extrato de levedura à 40°C por *K. marxianus* em biorreator *air-lift*



Fonte: Arquivo Pessoal

Durante a fermentação observou-se também (Figura 33) a produção de biomassa de 4,7 g/L com 5h de processo, após este período houve um declínio na concentração celular, que foi 4,15 g/L em 6,5h e se manteve estável até o final do processo fermentativo. A pouca formação de biomassa pode ser atribuída a baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio, isto pode ser corroborado com o fato que após poucos segundos (30s) da adição do inóculo no biorreator a pressão parcial de oxigênio zerou e se manteve assim durante toda a fermentação (Figura 34), o mesmo evento foi observado por Tavares *et al.* (2019).

Figura 34 - Valores do pH e da quantidade de oxigênio dissolvida no meio complexo composto por glicose, sais $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{KH}_2\text{PO}_4, \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ e extrato de levedura à 40°C por *K. marxianus* em biorreator *air-lift*



Fonte: Arquivo Pessoal

A Tabela 20 compara os parâmetros fermentativos obtidos neste trabalho em hidrolisado celulósico e meio semi-definido utilizando glicose como fonte de carbono.

Tabela 20 - Parâmetros fermentativos de *K. marxianus* em hidrolisado celulósico e meio semi-definido

Parâmetros fermentativos	HC	Meio semi-definido
Tempo (h)	22	6,5
Etanol (g/L)	35,1	44,4
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,33	0,44
Q_P (g/L.h)	1,59	6,83
η (%)	64,7	86,3

Fonte: Arquivo Pessoal

Os resultados revelam que o desempenho fermentativo de *K. marxianus* em reator *air-lift* foi melhor no meio semi-definido contendo glicose, onde obteve-se os maiores valores dos parâmetros de produtividade volumétrica (Q_P) e do fator de conversão de glicose em etanol ($Y_{P/S}$) como revela a Tabela 20. Nota-se ainda, que a maior diferença ocorreu no tempo de fermentação que foi aproximadamente de 3,4 vezes superior no meio contendo glicose comercial (semi-definido), devido a isso, a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) observada neste meio de fermentação, $Q_P = 6,83$ g/L.h, foi maior que a obtida em hidrolisado celulósico em reator *air-lift*.

A Tabela 21 compara os parâmetros fermentativos obtidos neste trabalho com a literatura, onde pode-se observar que o valor do fator de conversão de glicose em etanol obtido no meio semi-definido composto por glicose, sais e extrato de levedura foi semelhante ao observado pelos demais autores. A produtividade volumétrica em etanol obtida em hidrolisado celulósico se encontra próxima aos valores encontrados pelos autores da Tabela 21, entretanto Q_P observada em meio-semi-definido foi 3,2 vezes superior à obtida por Zahed *et al.* (2016).

Tabela 21 - Parâmetros fermentativos obtidos no presente trabalho e dados presentes na literatura

Microrganismo	Fonte de Carbono	T (°C)	vvm (min⁻¹) Agitação (rpm) KLa(h⁻¹)	Tempo (h)	Reator	Etanol (g/L)	Y_{P/S} (g/g)	Q_P (g/L.h)	Referencia
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-6860	Glicose comercial	40	0,25 - 4,0	6,5	<i>Air-Lift</i>	44,4	0,44	6,8	Presente estudo
<i>K. marxianus</i> NRRL Y-6860	Hidrolisado Celulósico (Palha de arroz)	40	0,5 - 4,68	22	<i>Air-Lift</i>	35	0,31	1,6	Presente estudo
<i>K. marxianus</i> IPE453	Hidrolisado Celulósico (Bagaço de cana de açúcar)	45	0,025 200 -	24	Tanque Agitado	40,5	~0,45	0,9	Dagsputa <i>et al.</i> (2017)
<i>K. marxianus</i> ATCC36907	Glicose comercial	40	0,1 300 0,2	24	Tanque Agitado	36,2	0,41	1,51	Tavares <i>et al.</i> 2019
<i>Pichia stipidis</i>	Hidrolisado hemicelulósico (Sun flower seed hull)	30	2,88 100 -	~53,7	Tanque Agitado	9,66	0,41	0,18	Telli-Okur; Eken- Saraçoğlu (2006)
<i>S. cerevisiae</i> & <i>C. tropicalis</i> (co-cultura)	Hidrolisado celulósico e hemicelulósico (Palha de arroz)	30	0,5 300 -	16	Tanque Agitado	33,4	0,44	2,1	Zahed <i>et al.</i> (2016)

Fonte: Arquivo Pessoal

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- A sequência de pré-tratamentos alcalino e com ácido diluído na palha de arroz resultou na obtenção do hidrolisado hemicelulósico com baixa concentração de ácido acético e da celulignina com alto teor de celulose.
- A configuração do processo de hidrólise enzimática em batelada alimentada com alto teor de sólidos em reator moinho de bolas vertical proporcionou a obtenção do hidrolisado celulósico com concentração de glicose superior a 100 g/L.
- O tipo de hidrolisado (hemicelulósico ou celulósico) utilizado para o preparo do inóculo de *K. marxianus* afetou na fermentabilidade desta cepa em hidrolisado celulósico. Os melhores resultados ($Y_{P/S}^* = 0,43$ g/g, $Q_P = 3,91$ g/L.h) foram observados quando os inóculos foram preparados em hidrolisado celulósico.
- Os resultados da análise estatística mostraram que o $Y_{P/S}^*$ e o Q_P tiveram um efeito significativo e positivo do $(NH_4)_2SO_4$ sobre este parâmetro. No entanto, considerando que os valores de $Y_{P/S}^*$ e Q_P obtidos durante a fermentação do HC apenas suplementado com 1,0 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ ($Y_{P/S} = 0,41$ g/g e $Q_P = 3,81$ g/L.h) são próximos aos obtidos no HC sem qualquer suplementação ($Y_{P/S} = 0,39$ g/g e $Q_P =$ g/L.h) optou-se pela utilização do HC sem adição de nutrientes nos ensaios fermentativos em reator *air-lift*.
- O desempenho fermentativo de *K. marxianus* no reator *air-lift* foi superior em meio semi-definido contendo glicose ($Y_{P/S} = 0,44$ g/g, $Q_P = 6,83$ g/L.h). que em hidrolisado celulósico ($Y_{P/S} = 0,33$ g/g, $Q_P = 1,41$ g/L.h). Os menores valores de $Y_{P/S}$ e Q_P obtidos no hidrolisado celulósico pode ter ocorrido pela presença de inibidores que pode ter afetado negativamente o desempenho fermentativo desta cepa.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudos para melhorar o desempenho fermentativo de *K. marxianus* em reator *air-lift* empregando o hidrolisado celulósico

REFERÊNCIAS

- AKINOSHO, H.; RYDZAK, T.; BOROLE, A.; RAGAUSKAS, A.; CLOSE, D. Toxicological challenges to microbial bioethanol production and strategies for improved tolerance. **Ecotoxicology- Springer Science**, v. 24, p. 2156-2174, 2015.
- ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L. Investigation of Acid Proteinase Biosynthesis by the Fungus *Humicola lutea* 120-5 in an Air-Lift Bioreactor. **Enzyme Microb. Technol.**, v.26, p.402-405, 2000.
- 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. 4851-4861, 2010.
- AHMED, A. M.; SEO, H. Y.; TÉRAN-HILARES, R.; REHMAN, R.U. S. M. ; HAN, J. I. Persulfate based pretreatment to enhance the enzymatic digestibility of rice straw. **Bioresource Technology**, v.222, p. 523-526, 2016.
- AMIRI, H., KARIMI, K., ZILOUEI, H. Organosolv pretreatment of rice straw for efficient acetone, butanol, and ethanol production. **Bioresource Technology**, v.152, p.450-456, 2014.
- ARORA, R.; BEHERA, S.; SHARMA, K. N.; KUMAR, S. Augmentation of ethanol production through statistically designed growth and fermentation medium using novel thermotolerant yeast isolates. **Renewable Energy**. v.101, p. 406-421, 2017.
- BAI, W.F.; ANDERSON, A. W.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89-105, 2008.
- BAMFORTH, W. C. **Food, Fermentation and Micro-organisms**. Blackwell Science, 2005.
- BINOD, P.; SHINDHU, R.; SINGHANIA, R.R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, K. R.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4767-4774, 2010.
- BLÜMMEL, M.; TEYMOURI, F.; MOORE, J.; NIELSON, C.; VIDETO, J.; KODUKULA, P.; POTHU, S.; DEVULAPALLI, R.; VARIJAKSHAPANICKER, P. Ammonia Fiber Expansion (AFEX) as spin off technology from 2nd generation biofuel for upgrading cereal straws and stovers for livestock feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.236, p. 178 – 186, 2018.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F.M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **J. Sci. Ind.**, v.67, p. 849-864, 2008.
- CASTRO, R. C.; ROBERTO, I. C. Effect of nutrient supplementation on ethanol production in different strategies of saccharification and fermentation from acid pretreated rice straw. **Science Direct**, v.78, p. 156-163, 2015.
- CASTRO, R. C. A; FONSECA, G.B.; SANTOS, L. T.H.; FERREIRA, I. S., MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. **Industrial Crops and Products**, v.106, p.65-73, 2017.

CASTRO, R. A. C.; MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I.C. A vertical ball mill as new reactor design for biomass hydrolysis and fermentation process. **Renewable Energy**, v. 114, p. 775-780, 2017.

CASTRO, R. A. C.; FONSECA, B. G.; SANTOS, H. L. T.; FERREIRA, I. S.; MUSSATO, S.I; ROBERTO, I. C. Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 65-73, 2017.

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.** 2011.(Dissertação)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

CERRI, Marcelo Otavio. **Hidrodinâmica e Transferência de Oxigênio em Três Biorreatores Airlift de Circulação Interna Geometricamente Semelhantes**, 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

CONAB.COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira grãos. v.7 – Safra 2019/2020 – Décimo segundo levantamento, Brasília, p.1-25, novembro 2020. ISSN 2318-6852. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos> Acesso: 20 nov 2019.

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Hydrothermal pretreatment of rice straw biomass: A potencial and promising method for enhance methane production. **Applied Energy**, v. 94, p. 129-140, 2012.

CHEN, X.; YU, J.; ZHANG, Z.; LU, C. Study on structure and thermal stability properties of cellulose fibers from rice straw. **Carbohydrate Polymers**, v.85, p. 245-250, 2011.

CHENG, YU-SHEN, ZHENG, Y., YU, W. C., TOOD, M. D., JENKINS, M. B., VANDER GHEYNST, S. J. Evaluation of High Solids Alkaline Pretreatment of Rice Straw., **Appl Biochem Biotechnol**, v.162, p.1768-1784, 2010.

CHISTI, M. Y. **Air-Lift Bioreactors**. New York : Elsevier, 1989.

DA SILVA, V. D. D.; DE ARRUDA, V. P.; VICENTE, F. C. M. F.; SENE, L.; DA SILVA, S. S.; FELIPE, AM. D. M. Evaluation of fermentative potencial of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in cellulosic and hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysates on xylitol and ethanol production. **Ann Microbiol**, v. 65, p. 687-694, 2015.

DAS, B., SARKAR, S., MAITI, S., BHATTACHARJEE, S. Studies on production of ethanol from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus*. **Materials Today: Proceedings**, v.3, p. 3253-3257, 2016.

DRANDEV, S.; PENEV, I. K.; KARAMANEV, D. Study of the hydrodynamics and mass transfer in a rectangular air-lift bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 146, p. 180-188, 2016.

DASGUPTA, D.; GHOSH D.; BANDHU, S.; ADHIKARI, K. D. Lignocellulosic sugar management for xylitol and ethanol fermentation with multiple cell recycling by *Kluyveromyces marxianus* IPE453. **Microbial Research**, v.200, 64-72, 2017.

DE BARROS, M. E.; CARVALHO, M. V.; RODRIGUES, S. H. T.; ROCHA, P. V. M.; GONÇALVES, B. R. L. Comparison of strategies for simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to

enhance cellulosic ethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 307, p. 939-947, 2017.

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.

ELSAYED, M.; ABOMOHRRA, E. A.; AI, P.; WANG, D.; EL-MASHAD, M. H.; ZHANG, Y. Biorefining of rice straw by sequential fermentation and anaerobic digestion for bioethanol and/or biomethane production: Comparison of structural properties and energy output. **Bioresource Technology**. v.268, p. 183-189, 2018.

FERREIRA, Isabela Silveira. **Estudo da produção de etanol a partir de glicose empregando a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6860**. 2013. (Dissertação) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

FONSECA, G.G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.79, p. 339–354, 2008.

FONSECA, G.G; DE CARVALHO, M. N. B.; GOMBERT, A.K. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p. 5055-5067, 2013.

FU, X., LI, P., ZHANG, L., LI, S. Understanding the stress responses of *Kluyveromyces marxianus* after an arrest during high-temperature ethanol fermentation based on integration of RNA-Seq and metabolite data. **Appl Microbiol. Biotechnol.**, v.103, p. 2715, 2019.

GARCÍA-APARICIO, M. P.; OLIVA, J.M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLES, A.; NEGRO, M. J. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Fuel**, v. 90, p. 1624-1630, 2011.

GONÇALVES, Ingrid da Mata. **Influência de campos magnéticos na produção de glutatona por *Saccharomyces cerevisiae* em biorreator “airlift” pressurizado**, 2012. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

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.

HODGE, B. D.; KARIM, N. M.; SCHELL, J. D.; MCMILLAN, D. J. Model-Based Fed-Batch for High-Solids Enzymatic Cellulose Hydrolysis. **Appl Biochem Biotechnol**, v.152, p. 88-107, 2009.

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, p.4907-4913, 2010.

HUANG, C.; HE, J.; MIN, D.; LAI, C.; YONG, Q. Understanding the nonproductive enzyme adsorption and physicochemical properties of residual lignins in moso bamboo pretreated with sulfuric acid and kraft pulping. **Appl. Biochem.** v. 180, p. 1508-1523, 2016.

- KARAGOZ, P.; BILL, M. R.; OZKAN, M. Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. **Renew Energy**, v.143, p. 741-752, 2019.
- 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.
- LANE, M. M.; MORRISEY, P.J. *Kluyveromyces marxianus* : A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Review**, v.24, p.17-26, 2010.
- LANE, M. M.; BURKE, N.; KARREMAN, R.; WOLFE, H.K.; O'BYRNE, C.; MORRISEY, P.J. Physiological and methabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.100, p.507-519, 2011.
- LENNARTSSON, R. P.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, J. M. A pilot study on lignocelluloses to ethanol and fish feed using NMMO pretreatment and cultivation with zygomycetes in an air – lift reactor. **Bioresour Technol**, v. 102, p. 4425-4432, 2011.
- LI, X.; ZHENG, Y. Investigation of dynamic changes of substrate features on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Industrial Crops & Products**. v.111, p.414-421, 2018.
- LU, X.; ZHANG, Y.; ANGELIDAKI, I. Optimization of H₂SO₄ – catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content. **Bioresour Technol**, v. 100, p. 3048-3053, 2009.
- MAJEED, G., J.; BÉKÁSSY-MOLNÁR, E. Design correlations of an air-lift tube reactor. **Gas Sep. Purif.**, v.9, p.101-109, 1995.
- MANSFIELD, S.D; MOONEY, C.; SADDLER, J.N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnol.**, v. 15, p.804-816, 1999.
- MARTINS, S. H. L.; RABELO, C. S.; COSTA, C. A. Effects of pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of cellulosic fraction of sucarcane bagasse. **Bioresour. Technol**, v.191, p.312-321, 2015.
- NELSON, L. D.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- NITIYON, S., K-O, C., MURATA, M., LERTWATTANASAKUL, N., LIMTONG, S., KOSAKA, T., YAMADA, M. Efficient conversion of xylose to etanol by stress- tolerant *Kluyveromyces marxianus* BUNL-21. **SpringerPlus**, v.5 p. 185, 2016.
- PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D.J.; SADDLER, J.N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreates softwood with residual lignina content. **Appl. Biochem. Biotechnol.** – Part A. Enzyme Eng Biotechnol, v.124, p. 1069-1079, 2005.
- PANDIYAN, K.; SINGH, A.; SINGH, S.; SAXENA, K. A.; NAIN, L. Review- Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 132, p. 723-741, 2019.
- PEDRINI, Márcia Regina da Silva. **Desenvolvimento e aplicações de um biorreator airlift com circulação externa**, 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1997.

QIN, L.; LIU, H. Z.; JIN, M.; LI, Z.B.; YUAN, J. Y. High temperature aqueous ammonia pretreatment and post-washing enhance the high solids enzymatic hydrolysis of corn stover. **Bioresour Technol**, v.146, p.504-511, 2013.

QUEROL, A.; FLEET, H. G. **Yeast Handbook -Yeast in Food and Beverages**. Germany: Springer, 2006. cap. 5.

RAMACHANDRIYA, D. K.; WILKINS, M.; ATIYEH, K. H.; NURHAN, D. T. Effect of high dry solids loading on enzymatic hydrolysis of acid bisulfite pretreated Eastern redcedar. **Bioresour Technol**, v.147, p.168-176, 2013.

RASTOGI, M.; SHRIVASRAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.80, p. 330-340, 2017.

RODRUSSAMEE, N.; LERTWATTANASAKUL, N.; HIRATA, K.; 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*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 90, p. 1573-1586, 2011.

RODRIGUEZ, Guilherme Youssef. **Avaliação de parâmetros globais de desempenho de biorreatores pneumáticos através de fluidodinâmica computacional**. 2015 Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

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

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 Biochem**. v.40, p. 3693-3700, 2005.

SANDOVAL-NUÑEZ, D.; ARELLANO-PLAZA, M.; GSCHAEDLER, A.; ARRIZON, J.; AMAYA-DELGADO, L. A comparative study of lignocellulosic ethanol productivities by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 20, p. 1491-1499, 2018.

SANTANA, Mona Liza. **Produção, caracterização, aplicação e determinação estrutural de celulase de *Moniliophthora perniciosa***. 2010 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

SINGH, A.; MISHRA, P. **Microbial Pentose Utilization-Current Applications in Biotechnology**. New York: Elsevier Science, 195. v.33

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SUITER, J. TEMPLETON, D.; CROCKER, D.: Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, 2012. Laboratory Analytical Procedure (LAP). Disponível em: <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>. Acesso: 20 jul. 2019.

STAYAFTIKA, N.; MATSUMARA, Y. Comparative study of hydrothermal pretreatment for rice straw and its corresponding mixture of cellulose, xylan and lignin. **Bioresour Technol**. v.255, p.1-6, 2018.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI. **Biotecnologia Industrial**. Vol.2- Engenharia Bioquímica. Editora Blucher: 2011.

SOREK, N.; YEATS, H. T.; SZEMENYEI, H.; YOUNGS, H.; SOMERVILLE, R. C. The implications of lignocellulosic biomass chemical composition for the production of advanced biofuels. **BioScience**, v.64, p. 192-201, 2014.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, K. P.; GUPTA, K. V.; MOLINA, G.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, A.; RAMTEKE, W., P. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

SUBHEDAR, B.P.; GOGATE, R. P. Alkaline and ultrasound assisted alkaline pretreatment for intensification of delignification process from sustainable raw-material. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 216-225, 2014.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **Int. J. Sci.** v.9, p. 1621-1651, 2008.

TALUKDER, R. M. M.; GOH, Y. H.; PUAH, M. S. Interaction of sílica with cellulase and minimization of its inhibitory effect on cellulose hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v.118, p. 91-96, 2017.

TANIGUCHI, M., SUZUKI, H., WATANABE, D., SAKAI, K., HOSHINO, K., TANAKA, T. Evaluation of Pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw. **Bioscience and Bioengineering**, v.100, p.637-643, 2005.

TAVARES, B.; FELIPE, M.G. A.; SANTOS, J. C.; PEREIRA, M. F.; GOMES, S. D., SENE, L. An experimental and modeling approach for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in stirred tank bioreactor using vacuum extraction as a strategy to overcome product inhibition. **Renewable Energy**, v. 131, p. 261-267, 2019.

TELLI-OKUR, M.; EKEN-SARAÇOĞLU, N. Ethanol production from sunflower seed hull hidrolysate to ethanol by *Pichia stipitis* under uncontrolled pH conditions in a bioreactor. **J Eng Environ Sci**, v. 30, p.317-322, 2006.

TOOR, M.; KUMAR, S.S.; MALYAN, K. S.; BISHNOI, R. N., MATHIMANI, T.; RAJENDRAN, K.; PUGAZHENDHI, A. An overview on bioethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Chemosphere**, v.242, p.12-50, 2020.

TOMASI, S. S.; CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Average shear rate in tree pneumatic bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, p. 979-988, 2010.

VASCONCELOS, J. M. T.; RODRIGUES, J. M. L.; ORVALHO, S. C. P.; ALVES, S. S.; MENDES, R. L.; REIS, A. Effect of contaminants on mass transfer coefficients in bubble column and air-lift contactors. **Chem. Eng. Sc.**, v. 58, p.1431-1440, 2003.

VOGEL, C. H.; TODARO, L. C. **Fermentation and Biochemical Engineering Handbook-Principles Process, Design and Equipment**. 2 nd. New York: Noyes Publications, 1996.

VERACHTERT, H.; MOT, R. **YEAST- Biotechnology and Biocatalysis**. New York: CRC Press, 1990. v. 5, cap. 3

ZAHED, O.; JOUZANI, S. G.; SAEED, A.; FARAMARZ, K.; TABATABAEI, M. Continuous co-production of ethanol and xylitol from rice straw in a membrane bioreactor. **Folia Microbiol.**, v. 61, p. 179-189, 2016.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 82, p.815-827, 2009.

WU, H.; DAI X.; ZHOU, L. S.; GAN, Y. Y.; XIONG, Z. Y., QIN, H.Y; MA, J.; YANG, L.; WU, Z.K.; WANG, T. L.; WANG, W. G.; WANG, C. W. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment for enhancing the enzymatic hydrolysis of rice straw by using the heat energy dissipated from ultrasonification. **Bioresour. Technol.**, v.241, p.70-74, 2017.