

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.