



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**JESSYCA ALINE DA COSTA CORREIA**

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO  
SIMULTÂNEA DA FIBRA DE CAJU PRÉ-TRATADA COM PERÓXIDO DE  
HIDROGÊNIO ALCALINO**

**FORTALEZA**

**2017**

JESSYCA ALINE DA COSTA CORREIA

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA  
DA FIBRA DE CAJU PRÉ-TRATADA COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C848p Correia, Jessyca Aline da Costa.

Produção de etanol por sacarificação e fermentação simultânea da fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino / Jessyca Aline da Costa Correia. – 2017.  
102 f. ; il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

Coorientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

1. Fibra de Caju. 2. Etanol. 3. Batelada. 4. Batelada-Alimentada. I. Título.

CDD 660

---

JESSYCA ALINE DA COSTA CORREIA

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA  
DA FIBRA DE CAJU PRÉ-TRATADA COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química. Área de Concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 09/06/2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Valderez Ponte Rocha (Orientadora)**  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

**Prof. Dr.<sup>a</sup>. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Co-Orientadora)**  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

**Prof. Dr. André Casimiro de Macedo**  
Universidade Federal de Ceará (UFC)

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Marjory Lima Holanda Araújo**  
Universidade Federal de Ceará (UFC)

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Tigressa Helena Soares Rodrigues**  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

---

**Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos**  
Universidade Federal de Rio Grande do Norte (UFRN)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me ceder o dom da vida, pela minha saúde e por guiar todos os meus passos.

À minha mãe, pela pessoa maravilhosa que é para mim, pelo apoio que me dá em todas as minhas decisões, pelos conselhos e amor que me proporciona.

Ao meu pai, por estar tão presente em minha vida, apesar da distância que para nós não é nenhuma barreira, por me apoiar e confiar nas minhas decisões.

À minha avó, por toda atenção dada, pelas preocupações com a educação quando criança e pelo apoio e conselhos que me proporciona sempre que necessário.

À minha maravilhosa irmã Janaina, é tudo na minha vida, é minha fonte de inspiração em tudo, é o meu braço direito nas minhas decisões.

À toda minha família, pelo carinho e incentivo que recebi durante toda minha vida, em especial a Ana e a Guiguinha que estão comigo em todos os momentos.

Ao meu marido, Júnior, por ser meu fiel companheiro há 14 anos, me dando amor, conselhos, atenção, por suportar toda minha correria com os estudos e minha ausência algumas vezes.

Ao meu bebê, Benício, que ainda no meu ventre me dá forças para seguir e vencer as batalhas que a vida apresenta.

À Professora Dra. Maria Valderez Ponte Rocha por dedicar seu tempo e suas experiências para minha formação, pela paciência, por todo o conhecimento que me repassou, por acreditar no meu potencial. À professora Valderez minha sincera admiração e gratidão.

À Professora Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela oportunidade, por me apoiar nas minhas decisões e por sua confiança no meu trabalho.

Aos meus amigos da graduação que apesar de ter terminado o curso, ainda continuou uma forte amizade: Jeferson, Gaby, Karen e Marcinha. À forte amizade construída nos últimos anos com Camilla, Kamilly, Mary, Tici, Carlinha e Jú.

Aos amigos do grupo GPBio pela companhia durante o dia de trabalho, em especial a Jouci por toda ajuda dada durante meus experimentos.

A todos os amigos do DEQ conquistados durante todo esse período.

Aos funcionários do DEQ, em especial ao Luiz, por me ajudar sempre que precisei.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos leitores que dedicarem um pouco do seu tempo para ler minha Tese.

*“O maior líder é aquele que reconhece sua pequenez, extrai força de sua humildade e experiência da sua fragilidade.”*

*Augusto Cury*

## RESUMO

Nesse trabalho estudou-se a produção de etanol a partir da fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA) através do processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF). Inicialmente avaliou-se os efeitos da carga de sólidos (4,52; 6,79; 9,05 e 10,0 g<sub>FC-PHA</sub>/100 mL) e da temperatura (37, 40, 45 e 50 °C) nos processos de SSF em batelada, utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907 (5 g/L) e o complexo enzimático Cellic CTec 2 (30 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>). Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio SSF (tampão citrato de sódio 50 mM a pH 4,8; suplementado com 1 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de sulfato de amônio), 150 rpm por 72 h. Em seguida foram avaliados os efeitos da etapa de pré-hidrólise no processo de SSF. Dois tempos de pré-hidrólise (12 e 24 h) foram avaliados. Realizou-se um estudo do efeito da alimentação com substrato (FC-PHA) no processo de SSF. Foram avaliadas onze estratégias de alimentação. Um estudo de cargas enzimáticas (30,25,15 e 10 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>) foi avaliado, visando uma economia no processo. Os ensaios foram realizados em biorreator de 1L, com 750 mL de meio reacional, utilizando carga enzimática de 15 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>. Além disso, a lignina foi extraída do licor obtido após o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e caracterizada. Resultados mostraram que com uma carga de 10% (FC-PHA) e SSF realizada a 45 °C foi possível um rendimento em etanol de 83,84%, correspondendo a 21,0 ± 0,48 g/L de etanol. No entanto, a adição da etapa de pré-sacarificação, influenciou negativamente na produção de etanol, para SSF conduzida em 12 e 24 h correspondendo a rendimentos de 66,54 e 60,23%. Os processos de SSF até então estudados, mostraram dificuldades no aumento da carga de sólidos devido a elevada capacidade higroscópica apresentada pelo FC-PHA. Com isto, realizou-se SSF em batelada alimentada avaliando dez estratégias de alimentação e obteve-se uma maior concentração de etanol (29,7±0,84 g/L) após 48 h de processo no ensaio com alimentação de 10% (FC-PHA) no início do processo e 4% (FC-PHA) após 24 h. Os estudos de produção de etanol utilizando diferentes cargas enzimáticas não apresentaram diferenças significativas para os ensaios com 30 e 15 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>. Portanto, seguiu-se para os ensaios em biorreator utilizando carga de enzima de 15 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>. A produção de etanol em batelada em biorreator com 10% (FC-PHA) apresentou resultado menor quando comparado ao ensaio realizado em mesa agitadora, com redução de 18,48% no rendimento em etanol. Estratégias de alimentação foram também avaliadas no processo de produção de etanol em biorreator com produção de 21,71 ± 0,07 g/L) após 48h de fermentação e eficiência de apenas 61,92%. Ensaios realizados demonstraram que a fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino pode ser aplicada na produção de etanol por SSF em batelada alimentada

e a lignina extraída após o pré-tratamento apresentou características semelhantes às citadas na literatura.

**Palavras-chave:** Fibra de caju. Etanol. Batelada. Batelada-alimentada.

## ABSTRACT

This work studied the ethanol production from cashew apple fiber pretreated with alkaline hydrogen peroxide (FC-PHA) by a Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). The effects of solids loading (4.52, 6.79, 9.05 e 10.0 g<sub>FC-PHA</sub>/100 mL) and temperature (37, 40, 45 e 50 °C) in batch SSF processes were evaluated. These experiments were realized with *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 (5 g/L) and enzymatic complex Cellic CTec 2 (30 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>) in Erlenmeyers of 250 mL with 100 mL of SSF medium (sodium citrate buffer 50 mM pH 4.8, supplemented with 1 g/L yeast extract and 1 g/L ammonium sulfate) at 150 rpm for 72 h. Then, prehydrolysis effects in SSF process were evaluated. Two prehydrolysis times (12 h and 24 h) were studied. It was realized the study of eleven feeding strategies for fed-batch SSF mode operation. A study of enzyme loading (30 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>, 25 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>, 15 FPU/g<sub>FC-PHA</sub> e 10 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>) was carried out in order to obtain an economic process in large scale. The ethanol production was also performed in 1L Bioreactor with 750 mL of medium and using 15 FPU/g<sub>FC-PHA</sub> of enzyme loading. This work also presents the characterization of lignin obtained from the liquor resulting from the pretreatment of cashew apple fiber with alkaline hydrogen peroxide. Results showed that batch-SSF reached 83.84 % of ethanol yield and an ethanol concentration of 21.0 ± 0.48 g/L in processes conducted at 45 °C and 10 % of solids loading (FC-PHA). However, the addition of prehydrolysis stage prior to Batch-SSF did not improve the ethanol yields that were 66.54 % and 60.23 % for PSSF 12 h and 24 h respectively. The hygroscopic property of FC-PHA does not allow the increasing of solids loading in the SSF processes. Therefore, eleven strategies were studied and the maximum ethanol production was 29.7 ± 0.84 g/L after 48 h of fermentation obtained with the solid feeding of 10% FC-PHA at the beginning of the processes and supplemented with 4% FC-PHA after 24 h. The study of ethanol production using different enzymatic charges did not show any significant differences on experiments with 30 e 15 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>. Therefore, it was followed for bioreactor assays the enzyme loading of 15 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>. Batch ethanol production in bioreactor with 10% (FC-PHA) showed an ethanol yield decrease of 18.48%. Feeding strategies were also evaluated in a bioreactor with ethanol production of 21.71 ± 0.07 g/L after 48h of fermentation and an efficiency of 61.92%. The same experiment was reproduced in shaker and showed an ethanol production 26.88% higher. The results indicated that the cashew apple fiber pretreated with alkaline hydrogen peroxide could be used as substrates for ethanol production in fed-batch SSF and the extracted lignin from black liquor generated during the pretreatment showed characteristics similar to those cited in the literature.

**Keywords:** Cashew Apple Fiber. Ethanol. Batch. Fed-batch.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1 -</b>	Estrutura da molécula de celulose.....	23
<b>Figura 2.2 -</b>	Fluxograma de aproveitamento da Lignina.....	25
<b>Figura 2.3 -</b>	Produtos derivados da agroindústria do caju.....	26
<b>Figura 2.4 -</b>	Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático celulase sobre celulose com geração de glicose.....	30
<b>Figura 3.1 -</b>	Fluxograma do estudo de produção de etanol por SSF utilizando diferentes estratégias.....	38
<b>Figura 4.1 -</b>	Estabilidade térmica da lignina extraída durante o pré-tratamento da fibra de caju com peróxido de hidrogênio alcalino (4,3% v/v, pH 11.5, 5% de FB, 35 °C, 250 rpm por 6 h).....	57
<b>Figura 4.2 -</b>	Espectro de FTIR da lignina extraída durante o pré-tratamento da fibra de caju com peróxido de hidrogênio alcalino (4,3% v/v, pH 11.5), 5% de FB, 35 °C, 250 rpm por 6 h.....	58
<b>Figura 4.3 -</b>	Fotomicrografias obtidas por MEV da lignina extraída durante o pré-tratamento da fibra de caju com peróxido de hidrogênio alcalino 4,3% v/v, pH 11,5, 5% de FB, 35 °C, 250 rpm por 6 h. (A) ampliação de 100x e barra de escala de 500 µm; (B) ampliação de 500x e barra de escala de 100 µm; (C) ampliação de 2000x e barra de escala de 30 µm; e (D) ampliação de 10 000x e barra de escala de 5 µm.....	59
<b>Figura 4.4 -</b>	Perfil da concentração de etanol (A) e da Conversão de glicose (B) com o tempo para o processo de sacarificação e fermentação simultânea conduzida em agitador orbital a 45 °C, 150 rpm por 72 horas, utilizando 30 FPU.gFC-PHA-1 da enzima Cellic Ctec 2; 5 g.L-1 de inóculo ( <i>K. marxianus</i> ATCC36907). (▲) 5% fibra seca e (▲) 50% fibra úmida.....	60
<b>Figura 4.5 -</b>	Perfis de concentração de glicose (A), taxa de consumo de glicose (B), concentração de etanol (C), taxa de produção de etanol (D) e conversão de glicose, realizados com 30 g.L-1 de glicose inicial, 5 g.L-1 de inóculo ( <i>K. marxianus</i> ATCC 36907) a 45 °C, 150 rpm por 12 horas. Foram feitas adição de 0 g.L-1 (Controle) (♦), 15 g.L-1 (■), 20 g.L-1 (●), 40 g.L-1 (▲) e 60 g.L-1 (▼) de etanol no início do processo.....	62
<b>Figura 4.6 -</b>	Perfis de concentrações de glicose (●), xilose (▲) e etanol (■) com o tempo para o processo de sacarificação e fermentação simultânea conduzido em agitador orbital a 150 rpm, 45 °C, utilizando 30 FPU/gFC-PHA (Cellic Ctec 2), 5 g.L-1 de inóculo ( <i>K. marxianus</i> ATCC36907), por 72 horas usando	

diferentes cargas de sólidos: 4,52 (A), 6,79 (B), 9,05 (C) e 10,0 (D) gFC-PHA/100 mL meio.....	65
<b>Figura 4.7 -</b> Perfil de concentrações de glicose (●), xilose (▲) e etanol (■) com o tempo para o processo de sacarificação e fermentação simultânea conduzido em agitador orbital a 150 rpm por 72 horas, utilizando 30 FPU celulase /gFC-PHA (Cellic Ctec 2), <i>K. marxianus</i> ATCC36907, 10,0 gFC-PHA/100 mL, a diferentes temperatura: (A) 37 °C, (B) 40 °C, (C) 45 °C e (D) 50 °C	68
<b>Figura 4.8 -</b> Perfil de concentrações de glicose (●), xilose (▲) e etanol (■) com o tempo para o processo PSSF conduzido em agitador orbital a 150 rpm, 45 °C, utilizando 30 FPU celulase /gFC-AHP (Cellic Ctec 2), <i>K. marxianus</i> ATCC36907, 10,0 gFC-PHA/100 mL, por 72 horas . PSSF 12 horas (A) e PSSF 24 horas (B). O tempo de 0 h representa o momento em que a levedura é adicionada ao meio, após o tempo de pré-hidrólise	72
<b>Figura 4.9 -</b> Perfil de concentração de glicose (●), xilose (▲) e etanol (■) com o tempo para, para os processos de sacarificação e fermentação simultânea por batelada alimentada, com diferentes estratégias de alimentação (FB1, FB2, FB3 e FB4). Os processos foram conduzidos a 45 °C, 150 rpm, 72 h com 30 FPU/ gFC-PHA inicial. As linhas tracejadas correspondem aos pontos de alimentações da fibra FC-PHA	75
<b>Figura 4.10 -</b> Perfil de concentração de glicose (●), xilose (▲) e etanol (■) com o tempo para as estratégias de alimentação: (FB5, FB6, FB7, FB8, FB9, FB10 e FB11) iniciadas com 6% e 10% de carga de fibra (FC-PHA) e terminados com carga final de 14 % e 18%, conduzidos a 45 °C, 150 rpm, 72 h com 30 FPU/ gFC-PHA inicial. As linhas tracejadas correspondem aos pontos de alimentações de fibra FC-PHA.....	79
<b>Figura 4.11 -</b> Perfil de concentração de glicose (●), xilose (▲) e etanol (■) com o tempo para a estratégia de alimentação FB6 com adição de 30 FPU/gFC-PHA durantes as alimentações, com o processo de SSF a 45 °C, 150 rpm, 72 h. As linhas tracejadas correspondem aos pontos de alimentações de fibra FC-PHA....	84
<b>Figura 4.12 -</b> Perfil de concentração de etanol utilizando diferentes cargas enzimáticas de Cellic CTec2 no processo de SSF a 45 °C, 150 rpm por 72 horas utilizando uma carga de sólidos de 10 gFC-PHA/100 mL, 5 g.L <sup>-1</sup> de inóculo ( <i>K. marxianus</i> ATCC36907). Cargas enzimáticas: (■) 10 FPU/gFC-PHA, (●) 15 FPU/gFC-PHA, (▲) 25 FPU/gFC-PHA e (▼) 30 FPU/gFC-PHA.....	85
<b>Figura 4.13 -</b> Perfil de concentrações de glicose (●), xilose (▲) e etanol (■) com o tempo para o processo de SSF conduzido em biorreator com carga inicial de 10%	

(FC-PHA), a 45 °C por 72 h operando com rampa de agitação: 500 rpm (12h) e 200 rpm (após 12 h) e adição de enzimas no inicio do processo: 15 FPU/gFC- PHA. Ensaio 01 (batelada), Ensaio 02 (batelada alimentada: 4% (FC-PHA) após 24 h), Ensaio 03 (batelada alimentada: 4% (FC-PHA) com 12 h e 24 h) e Ensaio 04: (batelada alimentada: 4% (FC-PHA) com 24 h e 48 h).....	87
<b>Figura 4.14 -</b> Balanço de massa da produção de etanol por 100 g de fibra de caju <i>in natura</i> ....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1 -</b>	Composição de alguns materiais lignocelulósicos aplicados na produção de etanol de segunda geração.....	22
<b>Tabela 3.1 -</b>	Estratégias de alimentação de FC-PHA durante o processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas conduzido a 45 °C, 150 rpm e 72 h, visando obter uma carga final de 10,0 % m/v FC-PHA.....	47
<b>Tabela 3.2 -</b>	Estratégias de alimentação de FC-PHA durante o processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas conduzido a 45 °C, 150 rpm e 72 h, visando obter uma carga final maior que 10% m/v FC-PHA.....	48
<b>Tabela 3.3-</b>	Processos SSF realizados em biorreator em sistema batelada (Ensaio 1) e batelada alimentada (Ensaios 2 e 3) a 45 °C, a 500 rpm na primeiras 12 horas e em seguida 200 rpm até 72 h de processo.....	50
<b>Tabela 4.1-</b>	Composição da fibra de caju não tratada (FC-in natura) e da fibra pré-tratada pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA).....	4
<b>Tabela 4.2-</b>	Efeito da carga inicial de sólido nos parâmetro de produção de etanol por SSF a 45 °C, utilizando 30 FPU/gFC-PHA (Cellic Ctec 2), 5 g.L-1 de inóculo ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC36907), por 72 horas.....	66
<b>Tabela 4.3-</b>	Efeito de diferentes temperaturas nos parâmetros de produção de etanol por SSF utilizando 10,0 gFC-PHA/100 mL meio, 30 FPU/gFC-PHA (Cellic Ctec 2), 5 g.L-1 de inóculo ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC36907), por 72 horas.....	70
<b>Tabela 4.4-</b>	Efeito das estratégias de alimentação nos parâmetros de produção de etanol por SSF utilizando FC-PHA como substrato, a 45 °C, 150 rpm por 72 horas. Valores com as mesmas letras, em sobreescrito, e na mesma coluna, não são significantemente diferentes um do outro com um nível de confiança de 95 % (P < 0,05).....	77
<b>Tabela 4.5 -</b>	Efeito das estratégias de alimentação nos parâmetros de produção de etanol por SSF em batelada alimentada utilizando FC-PHA como substrato, a 45 °C, 150 rpm por 72 horas. Valores com as mesmas letras, em sobreescrito, e na mesma coluna, não são significantemente diferentes um do outro com um nível de confiança de 95% (p< 0,05).....	82
<b>Tabela 4.6 -</b>	Efeito de diferentes cargas enzimáticas nos parâmetros de produção de	

etanol por SSF a 45 °C, 150 rpm por 72 horas, utilizando FC-PHA como substrato. Valores com as mesmas letras, em sobreescrito, e na mesma coluna, não são significantemente diferentes um do outro com um nível de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ).....	86
<b>Tabela 4.7-</b> Parâmetros obtidos na produção de etanol em Biorreatore por SSF com carga inicial de 10% (FC-PHA) a 45°C por 72 h, operando com rampa de agitação: 500 rpm (12h) e 200 rpm (após 12 h). Ensaio 01 (batelada), Ensaio 02 (batelada alimentada: 4% (FC-PHA) após 24 h) e Ensaio 03 (batelada alimentada: 4% (FC-PHA) com 24 h e 48 h).....	88

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>Produção e consumo de etanol no Brasil: cenário atual.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>Agroindústria do caju.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3</b>	<b>Materiais lignocelulósicos.....</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Produção de etanol por material lignocelulósico.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4.1</b>	<b><i>Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....</i></b>	<b>28</b>
<b>2.4.2</b>	<b><i>Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.....</i></b>	<b>29</b>
<b>2.4.3</b>	<b><i>Fermentação alcoólica.....</i></b>	<b>31</b>
<b>2.4.4</b>	<b><i>Estratégias para produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.....</i></b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Microrganismo.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1.1</b>	<b><i>Manutenção das células.....</i></b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Complexo enzimático.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.1</b>	<b><i>Determinação da atividade de Celulases no Complexo Enzimático.....</i></b>	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Material lignocelulósico.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4</b>	<b>Pré-tratamento do Bagaço de Caju.....</b>	<b>40</b>
<b>3.5</b>	<b>Caracterização da matéria-prima.....</b>	<b>40</b>
<b>3.5.1</b>	<b><i>Determinação de Sólidos Totais.....</i></b>	<b>41</b>
<b>3.5.2</b>	<b><i>Determinação de Extraíveis.....</i></b>	<b>41</b>
<b>3.5.3</b>	<b><i>Determinação do teor de glucana, xilana, lignina solúvel e inibidores.....</i></b>	<b>41</b>
<b>3.5.4</b>	<b><i>Determinação de lignina insolúvel.....</i></b>	<b>43</b>
<b>3.5.5</b>	<b><i>Determinação de cinzas.....</i></b>	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF) em agitador orbital (SSF).....</b>	<b>44</b>
<b>3.6.1</b>	<b><i>Obtenção de massa celular para a condução dos processos SSF.....</i></b>	<b>44</b>
<b>3.6.2</b>	<b><i>Efeito comparativo da SSF utilizando fibra de caju pré-tratado seco e úmido.....</i></b>	<b>45</b>
<b>3.6.3</b>	<b><i>Estudo do efeito da carga de sólidos no processo SSF.....</i></b>	<b>46</b>
<b>3.6.4</b>	<b><i>Estudo do efeito da temperatura no processo SSF.....</i></b>	<b>46</b>
<b>3.7</b>	<b>Avaliação da etapa de Pré-sacarificação no processo SSF (PSSF).....</b>	<b>46</b>
<b>3.8</b>	<b>Avaliação de estratégias de alimentação durante o processo SSF.....</b>	<b>46</b>
<b>3.9</b>	<b>Teste de inibição por etanol.....</b>	<b>48</b>
<b>3.10</b>	<b>Estudo do efeito da carga enzimática no processo de SSF.....</b>	<b>49</b>
<b>3.11</b>	<b>Produção de etanol por SSF em escala de biorreator.....</b>	<b>49</b>
<b>3.12</b>	<b>Determinação dos parâmetros de conversão.....</b>	<b>50</b>

<b>3.12.1</b>	<i>Eficiência do processo (<math>\eta</math>)</i> .....	50
<b>3.12.2</b>	<i>Rendimento (g<sub>etanol</sub>/g<sub>celulose</sub>)</i> .....	51
<b>3.12.3</b>	<i>Produtividade de etanol</i> .....	51
<b>3.13</b>	<b>Extração e Caracterização da lignina obtida no pré-tratamento da fibra de caju com peróxido de hidrogênio alcalino</b> .....	51
<b>3.13.1</b>	<i>Extração da lignina</i> .....	51
<b>3.13.2</b>	<i>Caracterização da Lignina</i> .....	51
<b>3.13.2.1</b>	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	51
<b>3.13.2.2</b>	<i>Análise por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i> ..	52
<b>3.13.2.3</b>	<i>Análise Imediata</i> .....	52
<b>3.13.2.4</b>	<i>Análise Elementar</i> .....	52
<b>3.13.2.5</b>	<i>Análise Termogravimétrica</i> .....	53
<b>3.14</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	53
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussões</b> .....	54
<b>4.1</b>	<b>Caracterizações das frações obtidas do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino</b> .....	54
<b>4.1.1</b>	<i>Caracterização da fração sólida obtida após o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino</i> .....	54
<b>4.1.2</b>	<i>Extração e caracterização da lignina obtida a partir da fração líquida oriunda do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino</i> .....	55
<b>4.2</b>	<b>Análise comparativa da SSF realizada com BC-PHA seco e úmido</b> .....	59
<b>4.3</b>	<b>Efeito da carga de sólidos na SSF</b> .....	64
<b>4.4</b>	<b>Estudo do efeito da temperatura no processo de SSF</b> .....	67
<b>4.5</b>	<b>Adição da etapa de pré-sacarificação no processo SSF (PSSF)</b> .....	71
<b>4.6</b>	<b>Avaliação de estratégias de alimentação da fibra de caju pré-tratada no processo de sacarificação e fermentação simultâneas</b> .....	74
<b>4.7</b>	<b>Estudo do efeito da carga enzimática no processo SSF</b> .....	84
<b>4.8</b>	<b>Estudo da produção de etanol por SSF em biorreator</b> .....	86
<b>4.9</b>	<b>Balanço de massa do processo</b> .....	90
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	92
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	93

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo IBGE (2017), Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a produção de castanha de caju em 2016, foi de 228,7 toneladas, com um aumento de 120% em relação à colheita de 2015, de 102,7 toneladas. Segundo dados da FAOSTAT (2013), Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, o Brasil é o quinto maior produtor mundial de castanha de caju. Por outro lado, o processamento industrial de pedúnculo para a produção de bebidas a partir do caju resulta em torno de 15% (m/m) de fibra, sendo este um subproduto de baixo valor agregado e uma das principais fontes de resíduos deste setor agroindustrial. Estes fatores agregam potencial para a utilização da fibra de caju, um material lignocelulósico, que vem sendo fonte de estudo no Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio-DEQ/UFC) na utilização como matéria-prima alternativa e de baixo custo para a produção de etanol de segunda geração(ROCHA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011; CORREIA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017), produção de xilitol (ROCHA *et al.*, 2014; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015) e na imobilização de enzimas (GONDIM *et al.*,2014; SOUZA *et al.*, 2016). A produção de etanol por lignocelulósicos, demanda a transformação da celulose e hemicelulose em seus monômeros (glicose e xilose) e subsequente conversão a etanol por microrganismos.

Na estrutura de um material lignocelulósico, a celulose e hemicelulose encontram-se dispostas em um arranjo bastante complexo, protegidas pela lignina, de modo a dificultar o ataque enzimático para produção de açúcares fermentescível. Portanto, torna-se necessário realizar um pré-tratamento de modo a incrementar a exposição das fibras de celulose e hemicelulose, tornando-a mais acessível (LIN *et al.*, 2013; CORREIA *et al.*, 2015). No presente trabalho realizou-se o pré-tratamento da fibra de caju utilizando Peróxido de Hidrogênio Alcalino (PHA). Segundo CORREIA *et al.* (2013), o peróxido de hidrogênio alcalino atua na redução da cristalização da celulose e com a ação oxidativa dos radicais derivados do peróxido, ocorre elevada despolimerização e solubilização da lignina. Nos estudos de pré-tratamento realizados por CORREIA *et al.* (2013) foram obtidos redução de 92% no percentual de lignina e um aumento de 53% no percentual de celulose com redução na cristalinidade do material.

A lignina extraída durante o pré-tratamento vem sendo fonte de estudo em diversas literaturas por se tratar de um material fibroso e bastante resistente (RAMESH *et al.*, 2004; GORDOBIL *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015;MOHAN *et al.*, 2015).

Em etapas subsequentes ao pré-tratamento têm-se a hidrolise enzimática e a fermentação que

podem vir a ocorrer em um único processo, conhecido como Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF). Este processo apresenta como principal vantagem à redução da inibição pela glicose (produto final da hidrólise), já que a presença de microrganismos fermentadores reduz o acúmulo de açúcar no biorreator. Por este motivo se consegue maiores taxas de hidrólise e percentagens de conversão, em comparação ao processo de hidrólise e fermentação em separado, obtendo-se um aumento dos rendimentos de etanol (SAHA *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2017). Ao processo de SSF pode ser adicionada uma etapa inicial de pré-hidrólise (PSSF) com objetivo de hidrolisar parcialmente a celulose em açúcares monoméricos e oligoméricos antes da adição da levedura, o que pode aumentar a taxa de produção de etanol durante a SSF(MANZANARES *et al.*, 2011; HOYER *et al.*, 2013). Estratégias de alimentação com substrato no decorrer do processo de SSF também estão sendo estudadas com o objetivo de aumentar a concentração de etanol no caldo processado e, ao mesmo tempo, eliminar problemas relacionados à inibição da atividade enzimática e/ou fermentativa, devido a elevadas concentrações de substrato, produto e inibidores nos processos em batelada, manter aspropriedades reológicas das suspensões fibrosas facilitando amistura e transferência de calor quando comparadosàmesma carga em batelada(CHEN E DIXON, 2007; TOMÁS-PEJÓ *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2017; KOSSATZ *et al.*, 2017).

A principal desvantagem do processo de SSF está relacionada com as diferentes condições ótimas de pH e temperatura nas etapas de hidrólise e fermentação, respectivamente. Por este motivo faz-se necessário realizar um processo em condições compatíveis com as duas etapas. Considerando que a temperatura ótima da hidrólise enzimática seja próxima de 50 °C e que as leveduras produtoras de etanol convencionais operam em torno dos 30-37 °C é recomendável à utilização de microrganismos termotolerante para ambos os processos em uma única etapa. Neste contexto, *Kluyveromyces marxianus* é uma espécie de levedura termotolerante e tem sido considerada como um organismo promissor para a produção de etanol (LANE E MORYSSEY, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2016).

A produção de etanol a partir da fibra de caju vem sendo fonte de estudo em diferentes processos utilizando diferentes pré-tratamentos: pré-tratamento ácido seguido de álcali (ROCHA *et al.*, 2009), pré-tratamento álcali assistido em micro-ondas (RODRIGUES *et al.*, 2011), pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (CORREIA *et al.*, 2013) e pré-tratamento utilizando líquido iônico prótico (REIS *et al.*, 2016). Em todos os trabalhos citados anteriormente, foram realizados estudos de condições de hidrólise enzimática com a fibra pré-tratada visando uma posterior aplicação desse material. Fibra de caju pré-tratada com ácido seguido de álcali foram aplicados na seleção de cepas de microrganismo para produção de etanol e, em seguida,

estratégias de fermentação SHF e SSF foram investigadas (RODRIGUES *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017) realizou estudos comparativos de estratégias de produção de etanol por SSF batelada e batelada alimentada utilizando fibra de caju pré-tratada com ácido e base.

Diante do apresentado na literatura, até o presente momento, neste trabalho foi avaliado o potencial da fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino para produção de etanol de segunda geração por *Kluyveromyces marxianus* ATCC36907, foi avaliado pelo processo de Sacarificação e Fermentação Simultânea.

O presente trabalho teve como objetivos específicos:

- Realização do pré-tratamento da fibra de caju (FC) com peróxido de hidrogênio alcalino.
- Caracterização da FC e da FC-PHA.
- Extração e caracterização da lignina obtida do licor após o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.
- Efeito da carga inicial de substrato na produção de etanol por SSF utilizando fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino em agitador orbital.
- Estudo do efeito da temperatura na produção de etanol por SSF utilizando fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino em agitador orbital.
- Avaliação do efeito da adição de uma etapa de pré-sacarificação no processo de produção de etanol por SSF utilizando fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino em agitador orbital.
- Estudo do processo SSF por batelada alimentada, avaliando-se diferentes estratégias de alimentação de substrato FC-PHA.
- Estudo do efeito da carga enzimática na produção de etanol por SSF utilizando fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino em agitador orbital.
- Estudo da produção de etanol em biorreator por SSF (batelada e batelada alimentada) utilizando fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Produção e consumo de etanol no Brasil: cenário atual

A demanda por etanol tem se expandido de forma muito rápida, e esta deverá aumentar ainda mais em um futuro próximo, principalmente nos países mais desenvolvidos e nos de maior consumo de combustíveis automotivos. Em relação às projeções de demanda por etanol, a OIA (Organização Internacional do Açúcar) prevê que a demanda dobrará até 2020. A OIA prevê uma demanda de 88 bilhões de litros nos EUA, 35 bilhões de litros no Brasil, 12 bilhões de litros na União Europeia, 8 bilhões de litros na China e 24 bilhões de litros em outros mercados. No cenário atual, o Brasil vive uma nova expansão dos canaviais com o objetivo de oferecer, em grande escala, o combustível alternativo, sendo que a nova escalada não é um movimento comandado pelo governo, como a corrida no final da década de 70, com o Pró-álcool. A corrida para ampliar unidades e construir novas usinas é movida por decisões da iniciativa privada, convicta de que o álcool terá, a partir de agora, um papel cada vez mais importante como combustível, no Brasil e no mundo (LAMONATO, 2014). De fevereiro de 2016 a fevereiro de 2017, 19 usinas receberam autorização da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) para operar. Destas autorizações, 17 são referentes a ampliações de unidades já existentes e duas ao início das operações de novas unidades produtivas (NOVACANA, 2017). No entanto, faz-se necessário o uso de novas matérias-primas que auxiliem na produção desse biocombustível.

A posição do Brasil no que se refere à produção de etanol pode ser classificada como privilegiada, em virtude da conjugação de dois fatores: a grande extensão territorial e o clima tropical. Isso é particularmente verdadeiro no que diz respeito à produção de etanol proveniente da cana-de-açúcar, na qual a liderança do país, estabelecida há décadas, foi consolidada com a introdução dos veículos com motor flexível. As vendas de veículos leves devem se expandir a uma taxa média anual mais moderada nos próximos dez anos. Dos novos veículos que entrarão em circulação, estima-se que a participação dos carros Flex Fuel se mantenha alta, ao redor de 87% do total elevando o seu porcentual na frota brasileira de veículos (NOVACANA, 2017).

Diante dessa alta demanda na produção de etanol, o uso de tecnologias para converter a celulose dos materiais lignocelulósicos em etanol de segunda geração, especialmente os

resíduos agroindustriais, passa a ser uma alternativa promissora (HASUNUMA e KONDO, 2012; HAQUE *et al.*, 2013). Segundo RODRIGUES *et al.* (2016), a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica está deixando a fase experimental e entrando em escala industrial de produção no Brasil. A primeira usina a produzir etanol de segunda geração no Brasil foi instalada pela Granbio em Alagoas, produzido a partir de palha e fibra da cana. Este processo ainda tem custo superior ao tradicional, mas a Granbio, espera torná-lo 20% mais barato do que o etanol de primeira geração quando a usina estiver operando em plena capacidade, com produção de 82 milhões de litros de etanol celulósico por ano (FOLHA DE SÃO PAULO, 2014). Uma segunda usina, conhecida como usina Costa Pinto, instalada em Piracicaba (SP), está avançando também na produção de etanol de segunda geração, com objetivos de atingir uma produção de 42 milhões de litros até 2018, apostando em custos de produção do etanol de segunda geração menores do que os de primeira geração até o fim da década (CNPEM, 2016). Atualmente, além do Brasil, o etanol de segunda geração é produzido em larga escala comercial apenas nos Estados Unidos e na Itália (FOLHA DE SÃO PAULO, 2014).

Diante do que foi exposto, o crescente interesse na produção de etanol de segunda geração, leva ao interesse de matérias-primas alternativas que, assim como o fibra de cana-de-açúcar, possam ser utilizados na produção desse biocombustível.

## **2.2 Materiais lignocelulósicos**

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por celulose, hemicelulose e lignina, dispostos em uma estrutura bastante complexa. A composição desses compostos varia de acordo com a natureza do vegetal, sendo que na maioria dos vegetais, o maior componente é a celulose (35-50%), seguido de hemicelulose (20-35%) e lignina (10-25%). Outros componentes como proteínas, gorduras e cinzas fazem parte de uma fração destes materiais.

As cadeias de celulose e hemicelulose compõem dois terços da estrutura dos materiais lignocelulósicos, os tornando substratos em potencial para a produção de etanol de segunda geração (GÍRIO *et al.*, 2010). Os lignocelulósicos, alvo dos estudos para produção do etanol, em geral constituem os resíduos agrícolas, como palha de milho, fibra de caju, fibra de cana, palha de trigo, casca de arroz, madeira, os resíduos urbanos orgânicos além dos resíduos das atividades agroindustriais (GOMEZ *et al.*, 2008; VAN DYK e PLETSCHKE, 2012). A Tabela

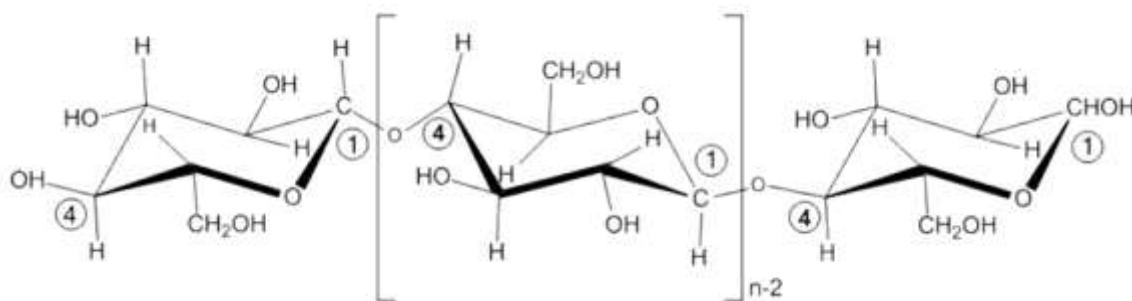
2.1 mostra a composição de alguns materiais lignocelulósicos utilizados em pesquisas nas produções de etanol de segunda geração.

**Tabela 2. 1** Composição de alguns materiais lignocelulósicos aplicados na produção de etanol de segunda geração.

Materiais Lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose(%)	Lignina(%)	Autores
Palha de trigo	32,6 ± 0,3	24,7 ± 0,2	20,6±1,3	GOVUMONI <i>et al.</i> , 2013
Fibra de cana	45,5 ± 1,1	17,0 ± 0,8	21,1±0,9	ROCHA <i>et al.</i> , 2011
Fibra de caju	20,9 ± 2,0	16,3 ± 3,0	33,6 ± 5,3	BARROS <i>et al.</i> , 2017
Palha de milho	27,6 ± 1,2	18,2 ± 1,1	17,6 ± 1,6	LIU E CHEN, 2017
Casca de arroz	35,6 ± 0,1	11,9 ± 0,7	15,4 ± 0,2	SAHA E COTTA, 2007

A celulose é um polímero de cadeia longa, de peso molecular variável e com fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , com valor mínimo de  $n=200$ , possui somente um monômero que é a glicose, podendo ser classificada como polissacarídeo. A Figura 2.1 apresenta a estrutura da molécula de celulose. A celulose trata-se de um polímero linear (parte amorfo e parte cristalino) que consiste em cadeiaslineares de ligações de unidades de glicose (ZHU, 2008). A ligação entre as moléculas são de natureza  $\beta$ -1,4 glicosídicas e permitem que o polímero seja disposto em longas cadeias. Nas extremidades da molécula, devido as hidroxilas estar uniformemente distribuídas em ambos os lados dos monômeros, permite a formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de celulose. Devido a essas ligações de hidrogênio há uma forte tendência de formar cristais que a tornam completamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. O grau de cristalinidade da celulose varia de acordo com sua origem e processamento o que acarreta em uma dificuldade para a hidrólise enzimática (ARAÚJO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009).

**Figura 2.1** Estrutura da molécula de celulose.



Fonte: Adaptado de HARMSEN *et al.*, (2009).

A obtenção de glicose a partir de celulose pode ocorrer por via ácida ou por via enzimática, a depender do processo. No entanto, segundo BEGUN E AUBERT (1994), a hidrólise enzimática da celulose é realizada por enzimas celulase altamente específica e os produtos da hidrólise são açúcares, incluindo principalmente a glicose. O custo de utilidades industriais da hidrólise enzimática torna-se baixo em comparação com a hidrólise ácida ou alcalina pois a hidrólise enzimática é geralmente conduzida em condições suaves (pH 4,8 e temperatura entre 45-50 °C) e não tem causado problema de corrosão(DUFF E MURRAY, 1996).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado, composto por arabino-xilanias, gluco-mananas, galactanas e outros (GIRIO *et al.*, 2010). Trata-se de um material mais facilmente hidrolisado, em comparação a celulose, devido sua estrutura amorfa e ramificada. (SAHA, 2003).

Segundo SUN E CHENG (2005) a hemicelulose, diferentemente da celulose, apresenta baixa massa molecular e também não apresenta regiões cristalinas, tornando-a mais suscetível à hidrólise química em condições amenas. No entanto, a fermentação dos açúcares pentosídicos ainda não é muito desenvolvida quanto os processos envolvendo glicose. Mas, de acordo com BRANDT *et al.* (2013) esse processo deve mudar futuramente com a introdução das cepas geneticamente modificadas, possibilitando efetiva conversão da hemicelulose. Diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas na literatura visando uma aplicação da hemicelulose, segundo ALBUQUERQUE *et al.* (2015) a hemicelulose obtida da fibra de caju pode ser aplicada para produção de xilitol, sendo este um polialcool natural, muito utilizado nas indústrias de alimentos e farmacêutica em substituição a sacarose, por possuir poder adoçante semelhante. Contudo, sua produção por via química requer um

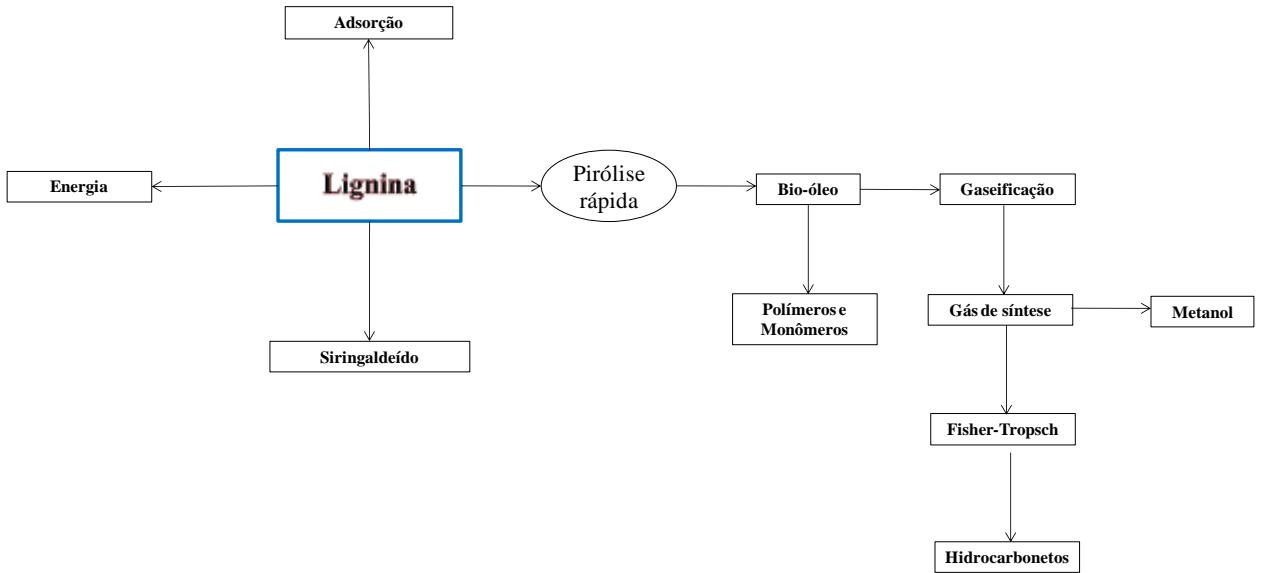
elevado custo e apresenta baixos rendimentos, portanto vários estudos vêm sendo conduzidos, nos quais se busca a obtenção do produto pela via biotecnológica. A hemicelulose oriunda da fibra de caju também vem sendo fonte de estudo na produção da enzimamaxilose redutase (SERPA, 2016).

A lignina é um complexo altamente amorfó e heterogêneo de compostos fenólicos substituídos, frequentemente compreendendo componentes siringil, guaiacil, e p-hidroxifenol. Junto com a cadeia de hemicelulose e pectina, este componente preenche os espaços entre as fibras de celulose, atuando assim como um material de ligação entre componentes da parede celular, sendo responsável pela rigidez e baixa reatividade dos materiais lignocelulósicos (D'ALMEIDA, 1988).

A lignina é altamente resistente à hidrólise enzimática, química e microbiana devido à sua extensa ligações cruzadas. Pode, no entanto, ser pirolisada para formar óleo para combustível e resinas (KAMM *et al.*, 2006). A lignina confere rigidez à parede celular e, por conseguinte, contribui para resistência mecânica das plantas, protegendo-as contra a degradação microbiana e contribuindo para a eficiência do sistema de transporte de nutrientes e água (AZADFAR, 2015).

A lignina extraída durante o pré-tratamento vem sendo fonte de estudo em diversas literaturas por se tratar de um material fibroso e bastante resistente (RAMESH *et al.*, 2004; GORDOBIL *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; MOHAN *et al.*, 2015). A Figura 2.2 resume algumas aplicações da lignina. Segundo NIEMI. (2011) nos processos tradicionais, principalmente nas indústrias de papel e celulose, a lignina ainda é utilizada como fonte geradora de energia através da combustão. A oxidação da lignina gera uma matéria prima para síntese de produtos de alto valor agregado, como o siringaldeído (ARAÚJO *et al.*, 2010). Atualmente, uma grande variedade de produtos químicos pode ser produzida de uma forma sustentável a partir das estruturas aromáticas da lignina (VANDERGHEM *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2013). Devido sua elevada massa molecular, pode ser usada para produzir fibras de carbono, modificadores de polímeros, adesivos e resinas (FROLLINI E CASTELLAN, 2012). Além disso, este componente dos materiais lignocelulósicos possuem atividade antioxidante, devido à presença de grupos fenólicos e hidrogênios benzílicos (PORTES *et al.*, 2007; GARCIA *et al.*, 2011). Outra aplicação seria em processos de adsorção de corantes (SILVA *et al.*, 2015).

**Figura 2.2** Fluxograma de aproveitamento da Lignina.



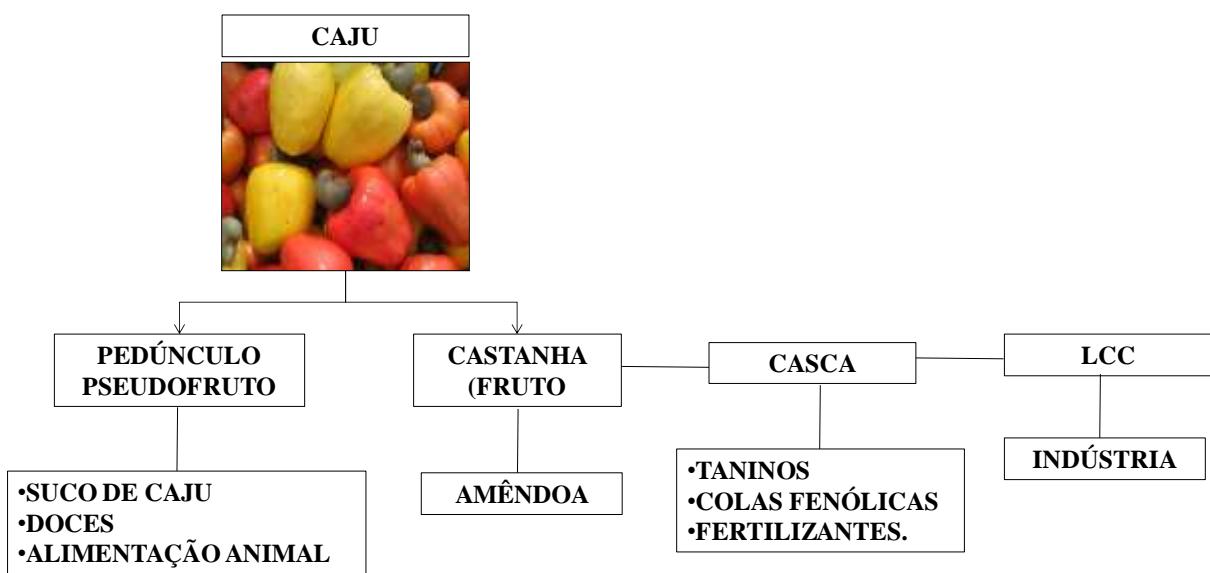
### 2.3 Agroindústria do caju

Em seu contexto mais amplo, a agroindústria do caju compreende um conjunto de atividades que geram um grande número de produtos intermediários e finais. O caju tem em sua estrutura um fruto e um pseudofruto (Figura 2.3). Do cajueiro aproveitam-se praticamente tudo. O principal produto é a amêndoia da castanha-de-caju, localizada no interior da castanha, de onde também é extraída a película que reveste a amêndoia, rica em tanino e utilizada na indústria química de tintas e vernizes. Da casca da castanha, extrai-se o líquido da casca de castanha-de-caju (LCC), usado na indústria química e de lubrificantes, curtidores, aditivos, entre outros, sendo o resíduo da casca utilizado como fonte de energia nas indústrias, por meio de sua queima em fornalhas. Já o pedúnculo do caju (pseudofruto) é processado por indústrias ou minifábricas para a obtenção do suco ou da polpa congelada, a ser utilizada na fabricação de sucos, cajuínas e outras bebidas. O pedúnculo também pode ser aproveitado para a fabricação de diversos produtos (principalmente doces) e na alimentação animal, além de que o caju inteiro também é comercializado in natura em feiras e supermercados (EMBRAPA, 2017).

Segundo dados estatísticos de FAOSTAT (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), o caju (*Anacardium occidentale L*) é cultivado atualmente em 27 países, sendo o Brasil o quinto principal produtor mundial. A produção de caju no Brasil é representada por 94% na Região Nordeste, sendo o estado do Ceará o maior produtor do país.

Entretanto, há também o potencial de agregação de valor ao negócio por meio do melhor aproveitamento do pedúnculo.

**Figura 2.3** Produtos derivados da agroindústria do caju.



Atualmente, apesar de toda a tecnologia disponível, 75% dos pedúnculos do caju não são aproveitados. Estima-se que apenas 350 mil toneladas de pedúnculos são absorvidas por pequenas empresas que produzem suco de caju, cajuína e doces (EMBRAPA, 2016). Segundo MATIAS *et al.* (2005), a fibra de caju após processo de desidratação apresenta em sua estrutura açúcares, fibras, proteínas e lipídeos, o que o torna uma matéria-prima em potencial para o seu aproveitamento, estes incluem a obtenção de produtos de alto valor agregado, biocombustíveis e alimentos, o que diversifica e amplia as oportunidades do uso do subproduto da cadeia. Vários são os estudos na literatura para o aproveitamento da fibra de caju, em destaque tem-se a utilização da matéria-prima alternativa e de baixo custo para a produção de etanol de segunda geração devido sua composição (BARROS *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2016; CORREIA *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2009), produção de xilitol (ROCHA *et al.*, 2014; ALBUQUERQUE *et al.*, 2015), produção da enzima xilose redutase (SERPA, 2016) e na imobilização de enzimas (GONDIM *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2016).

## 2.4 Produção de etanol por material lignocelulósico

Diversos debates e preocupações a respeito da sustentabilidade influenciam o estudo da produção de etanol por materiais lignocelulósicos, visando a produção de uma energia limpa e renovável para mitigar a dependência da energia fóssil e reduzir a emissão de CO<sub>2</sub>. Embora o bioetanol produzido a partir do milho ou da cana-de-açúcar domine os mercados de biocombustíveis no momento, o espaço para o desenvolvimento destas cultivares para produção de etanol tem sido limitado pela demanda de terra para o fornecimento de alimentos como cana-de açúcar e amido de milho utilizado na produção atual de etanol na maioria dos países. Dessa forma, o uso dos lignocelulósicos provenientes das diversas atividades agroindustriais se enquadra como uma alternativa na produção de etanol (LASER *et al.*, 2002; SHEN *et al.*, 2011; HAN *et al.*, 2015; SINDHU *et al.*, 2016).

O processo de produção de etanol a partir de lignocelulósicos trata-se de um processo mais complexo quando comparado ao processo de produção a partir da sacarose de cana ou amido de milho, requerendo a transformação da celulose e hemiceluloses em seus principais monômeros (glicose e xilose) e subsequente conversão dos mesmos pelos microrganismos em bioetanol. Entretanto, a estrutura cristalina e recalcitrante da biomassa, que torna a parede celular da planta resistente, dificulta a sua hidrólise em açúcares monoméricos para a subsequente conversão por fermentação, o que agrega ao processo algumas etapas para a obtenção do biocombustível (WEN *et al.*, 2009; ALVIRA *et al.*, 2010).

Diferentes materiais lignocelulósicos estão sendo utilizados como fonte de pesquisa para produção de etanol, como: palha de trigo (SAHA E COTTA, 2006; CHEN *et al.*, 2008; KARAGÖZ *et al.*, 2012), palha de milho (SELIG *et al.*, 2009; ZHAO E XIA, 2010; BANERJEE *et al.*, 2011), fibra de cana-de-açúcar (ROCHA *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2013), casca de arroz (SAHA E COTTA, 2007; DAGNINO *et al.*, 2013) e fibra de caju (ROCHA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011; CORREIA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017).

Há três etapas principais no processo de conversão dos materiais lignocelulósicos em etanol: primeira etapa, pré-tratamento, segunda etapa, sacarificação enzimática da biomassa vegetal para disponibilizar os açúcares fermentescíveis; terceira etapa, fermentação dos açúcares liberados realizada por microrganismos especializados. A segunda e a terceira etapa combinadas, gera uma única etapa chamada de Sacarificação e Fermentação Simultâneas

(Simultaneous Saccharification and Fermentation-SSF); e quarta etapa, recuperação do etanol (processo de destilação).

#### **2.4.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica**

Os materiais lignocelulósicos são altamente resistentes à hidrólise enzimática, portanto, para aumentar a conversão das cadeias de celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis, torna-se necessária a modificação das propriedades da parede celular, que consiste na etapa de pré-tratamento.

O pré-tratamento é uma etapa crucial na produção do etanol de segunda geração, pois permite que as cadeias de celulose e hemicelulose tornem-se acessíveis às enzimas hidrolíticas (ALVIRA *et al.*, 2010; SHEN *et al.*, 2011). Dependendo do pré-tratamento realizado, diferentes efeitos podem ser observados na biomassa lignocelulósica, como: remoção parcial ou quase total da lignina, rompimento da estrutura da lignina e de suas ligações com o restante da biomassa, redistribuição da lignina, aumento da porosidade e da área superficial, redução da cristalinidade da celulose, redução do grau de polimerização da celulose, remoção parcial ou quase total da hemicelulose (ZHANG E LYND, 2004; GARCIA *et al.*, 2010; RUIZ *et al.*, 2013).

Vários pré-tratamentos têm sido estudados na literatura para a disponibilização da celulose, destacando-se pré-tratamentos com ácidos: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e SO<sub>2</sub> (SAHA, 2003; ÖHGREN *et al.*, 2006; ROCHA *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2017), com álcalis: NaOH, AFEX e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (SAHA E COTTA, 2006; VÁSQUEZ *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2010; MCINTOSH E VANCOV, 2011; SAHA *et al.*, 2011; RABELO *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2015) e com líquidos iônicos: (REIS *et al.*, 2016).

A escolha adequada de um pré-tratamento pode ser determinante para a viabilidade econômica e técnica do processo e deve ser feita considerando diferentes aspectos, incluindo a entrada e saída de energia e o impacto ambiental (BARAKAT *et al.*, 2014). Assim, nos últimos anos, muitos pesquisadores vêm tentando desenvolver uma tecnologia econômica que leve à recuperação máxima de açúcares fermentáveis, com produção mínima de inibidores e baixo custo (HU *et al.*, 2012).

A adição da base hidróxido de sódio ao peróxido de hidrogênio faz com que a solução se torne um agente efetivo na deslignificação e solubilização da hemicelulose. Isto é devido à

formação do ânion hidroperóxido ( $\text{HOO}^-$ ), formado em pH alcalino, que se apresenta como a principal espécie ativa no peróxido. Em contraste, peróxido de hidrogênio é instável nas condições alcalinas e decompõe em radicais hidroxil ( $\text{OH}^-$ ) e superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). Estes radicais são responsáveis pela oxidação da estrutura da lignina, na qual ataca os grupos hidrofílicos, quebrando algumas ligações e, eventualmente, levando a dissolução da lignina (SUN *et al.*, 2005).

O peróxido de hidrogênio alcalino tem se mostrado uma boa alternativa no que se refere ao pré-tratamento de biomassa lignocelulósica uma vez que conduz a altos rendimentos de glicose e pode ser realizada em condições de temperatura e pressão moderadas e a não utilização de ácidos, o que leva a menor formação de inibidores (YAMASHITA *et al.*, 2010; CORREIA *et al.*, 2015; ALVAREZ-VASCO E ZHANG *et al.*, 2017). Trata-se de um agente típico do meio ambiente, utilizado para a deslignificação em processos de polpação de madeira e não deixa resíduos na biomassa, pois se degrada em oxigênio e água, minimizando assim a necessidade de tratamento de resíduos (RABELO *et al.*, 2011; RABELO *et al.*, 2014).

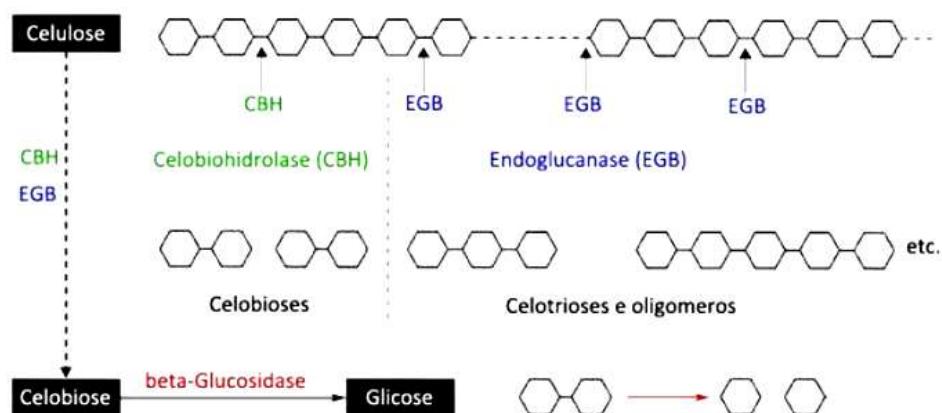
O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos utilizando peróxido de hidrogênio alcalino vem sendo fonte de diversos estudos na literatura (SAHA E COTTA, 2006; SAHA E COTTA, 2007; CHEN *et al.*, 2008; KARAGÖZ *et al.*, 2012; RABELO *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2015; ALVAREZ-VASCO E ZHANG *et al.*, 2017). Em destaque tem-se a produção de etanol a partir da fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino, desenvolvido por CORREIA *et al.* (2013) no Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio-DEQ/UFC).

#### **2.4.2 Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos**

A hidrólise enzimática trata-se da etapa posterior ao pré-tratamento, tendo como principal objetivo o acesso de enzimas aos polissacarídeos contidos no material lignocelulósico. A hidrólise enzimática ainda é considerada o gargalo do processo de produção de etanol de lignoceluloses em termos de tempo e investimento, uma vez que as enzimas apresentam alto valor agregado e exige um determinado período de tempo para atuarem nas cadeias da biomassa e produzirem glicose o suficiente para a etapa de fermentação (MODENBACH e NOKES, 2013).

A hidrólise enzimática da celulose é catalisada por enzimas altamente específicas que são chamadas de celulases. A celulase trata-se de um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente e estão subdivididas em três classes: endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases ou endoglucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais; exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases ou celobio-hidrolases, responsáveis pela ação nos terminais levando à celobiose; e 1,4- $\beta$ -D-glucosidases que hidrolisam a celobiose à glicose (OGEDA E PETRI, 2010). A Figura 2.4 é uma representação simplificada da ação enzimática de cada classe de enzimas.

**Figura 2.4** Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático celulase sobre celulose com geração de glicose



Celobio-hidrolases são capazes de hidrolisar as extremidades das cadeias de celulose para formar glicose, celobiose e celotriose, enquanto as endoglucanases hidrolisa as cadeias de celulose randomicamente reduzindo o grau de polimerização da celulose. A beta-Glucosidase possui a função de conversão da molécula de celobiose em duas moléculas de glicose, e sua ausência pode provocar inibição pelo produto devido ao excesso de celobiose formado (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006; VAN DYK e PLETSCHKE, 2012). No mecanismo sinérgico exo-endo, as endoglucanases clivam randomicamente cadeias na superfície da celulose, fornecendo assim numerosos sítios (terminais) adicionais para ataque das celobio-hidrolases. Logo, cada evento hidrolítico catalisado por uma endoglucanase resulta em novos sítios para as celobio-hidrolases (OGEDA e PETRI *et al.*, 2010).

A eficiência deste processo é influenciada por fatores inerentes aos substratos como grau de lignificação, associação entre lignina e hemiceluloses, cristalinidade e grau de polimerização da celulose e área superficial. Há também outros fatores inerentes aos processos como temperatura, carga enzimática, a escolha da enzima adequada, a inibição pelo produto (HIMMEL *et al.*, 2007).

#### **2.4.3 Fermentação alcoólica**

A fermentação alcoólica trata-se da ação de microrganismos que utilizam os açúcares provenientes da ação de enzimas na hidrólise enzimática, como substrato para metabolizar e gerar etanol e outros subprodutos. A glicose, oriunda da hidrólise da celulose, a qual é uma hexose (carboidrato com seis átomos de carbono) é o açúcar mais comum utilizado por microrganismos como substrato para a produção de etanol (HAMELINCK *et al.*, 2005). No entanto, o metabolismo de certos microrganismos também permite a assimilação de pentoses (carboidratos com cinco átomos de carbono), como xilose e arabinose, oriundos da hidrólise da hemicelulose, para a produção de etanol (OLSSON, 1996; CORREIA, 2013), sendo a xilose o segundo açúcar fermentescível mais presente em hidrolisados (MATSUSHIKA *et al.*, 2009).

Leveduras, particularmente do gênero *Saccharomyces*, são normalmente a primeira escolha para produção de etanol industrialmente, devido à sua boa capacidade fermentativa, alta tolerância ao etanol e outros inibidores (formados tanto durante o pré-tratamento de matérias-primas quanto durante a fermentação) e à capacidade de crescer rapidamente sob as condições anaeróbicas que são caracteristicamente estabelecidas durante a fermentação em larga-escala (KNAUF e KRAUS, 2006). No entanto, é importante salientar que outros microrganismos têm sido considerados para serem empregados na produção de etanol, como, por exemplo, a bactéria *Zymomonas mobilis* e *Escherichia coli*, que têm sido alvo de programas de engenharia genética com o objetivo de melhorar seu desempenho em termos de fermentação alcoólica (JARBOE *et al.*, 2007; ROGERS *et al.*, 2007).

A produção de etanol em elevadas temperaturas tem recebido destaque pelas vantagens econômicas do processo, destacando-se a redução nos riscos de contaminação, redução do investimento com sistemas de resfriamento e recuperação contínua do etanol(LIMTONG *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2008). Nesse sentido, a levedura *K.*

*marxianus* é uma das leveduras termotolerante que apresenta crescimento considerável na faixa de temperatura entre 25 °C e 45 °C (FONSECA *et al.*, 2008) e mostra tolerância moderada ao etanol (PEJO *et al.*, 2009).

Cepas pertencentes às espécies e gênero da levedura *K. marxianus* têm sido isoladas e estudadas para diferentes aplicações biotecnológicas. Dentre os estudos utilizando esta levedura inclui-se a produção de enzimas ( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glicosidase, entre outras), compostos aromáticos e etanol (BOYLE *et al.*, 1997; WILKINS *et al.*, 2008; BARROS, *et al.*, 2017) redução do teor de lactose em alimentos (BRADY *et al.*, 1997; MARTINS *et al.*, 2002), na produção de xilitol (ALBUQUERQUE *et al.*, 2015), além de aplicações em biorremediação e na medicina (FONSECA *et al.*, 2008).

Nesse sentido, devido às características destas cepas, estudos de processos de produção de etanol de segunda geração por sacarificação e fermentação simultâneas, utilizando *K. marxianus*, têm sido reportados na literatura (KRISHNA *et al.*, 2001; BALLESTEROS *et al.*, 2004; OBEROI *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017).

A principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica de leveduras e bactérias é a glicólise, na qual uma molécula de glicose é oxidada e duas moléculas de piruvato são produzidas. Em condições anaeróbicas, o piruvato é reduzido a etanol com a liberação de uma molécula de gás carbônico. O rendimento teórico desse processo é 0,511 g de etanol e 0,489 g de gás carbônico em relação a 1 g de glicose metabolizada. Além de etanol e gás carbônico, vários subprodutos também são produzidos durante a fermentação, sendo o glicerol, o principal deles (BAI, ANDERSON E MOO-YOUNG, 2008).

#### **2.4.4 Estratégias para produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica**

Quando a hidrólise ocorre seqüencialmente à fermentação a operação é designada de Hidrólise e Fermentação Separados (SHF- Separate Hydrolysis and Fermentation). O problema nesta operação é que a glicose e celobiose permanecem no mesmo meio que a celulose e celulase e estes mono e dissacarídeos inibem a ação da celulase (BALAT, 2011). Embora os rendimentos possam ser melhorados adicionando grandes quantidades de celulase, esta estratégia aumenta o custo do processo (OGEDA E PETRI, 2010). Para contornar este problema adiciona-se o microrganismo fermentativo ao mesmo reator onde estão sendo

produzidos os açúcares. Desta forma a glicose é rapidamente fermentada a etanol, reduzindo o acúmulo de inibidores de celulase e de custos de equipamentos, reduzindo assim o custo com a produção de etanol. A baixa concentração de glicose livre e a presença de etanol também fazem com que seja mais difícil para microrganismos competirem pelo substrato, formando produtos indesejáveis. Esta estratégia é conhecida como processo de SSF (Sacarificação e Fermentação Simultânea) (PAULOVÁ *et al.*, 2014; OLOFSSON *et al.*, 2008; SU *et al.*, 2013).

As vantagens de se operar um processo em SSF são limitadas por alguns fatores como: diferenças de temperaturas ótimas e pH para hidrólise e fermentação, potencial de sensibilidade das enzimas ao etanol liberado e limitações no carbono disponível para a população microbiana nos estágios iniciais do processo (ÖHGREN *et al.*, 2007; PAULOVÁ *et al.*, 2014). Por este motivo se faz necessário realizar o processo numa condição compatível com as duas etapas. Considerando que a temperatura ótima da hidrólise enzimática seja próxima a 50 °C e que as leveduras produtoras de etanol convencionais operam em torno dos 28-34 °C é recomendável à utilização de microrganismos termotolerante para realizar os processos numa só etapa (BALLESTEROS *et al.*, 2004; ÖHGREN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2010).

Elevadas concentrações de etanol no caldo fermentativo ao final do processo vem sendo referência para uma destilação eficiente considerando o consumo de energia e a eficiência de recuperação do etanol (KOPPRAM *et al.*, 2014; MODENBACH E NOKES, 2013). Segundo KOSSATZ, *et al.* (2017), a natureza do substrato, o custo do processo, as concentrações de etanol desejadas e a taxa de reação determinarão a configuração do processo a utilizar. Assim, alguns parâmetros como carga de sólidos, carga enzimática e temperatura veem sendo fonte de estudo durante a produção de etanol por SSF.

LIU *et al.* (2016) estudaram o efeito da carga de sólidos em diversas configurações de processo e concluíram que a concentração de etanol aumenta a medida em que se aumenta a carga de sólidos, no entanto o rendimento passa a ser afetado devido ao fato de que uma carga de sólido mais elevada conduz para uma fraca transferência de massa, diminuindo assim o rendimento do processo. A temperatura também é um parâmetro importante quando se trabalha com SSF, considerando que a levedura *K. marxianus* ATCC 36907 vem ganhando destaque neste tipo de processo, devido à sua capacidade de crescimento e fermentação a temperaturas acima de 40 °C, por tratar-se de um microrganismo termotolerante, próximo à temperatura ótima de hidrólise enzimática (TOMÁS-PEJÓ *et al.*, 2009; RODRIGUES, *et al.*,

2016; BARROS *et al.*, 2017). O estudo da melhor carga enzimática utilizada nos processos de SSF representa um parâmetro bastante relevante no que se refere ao custo do processo. A redução no custo com enzimas durante o processo contribui significativamente para a viabilidade econômica de um processo de maior escala no custo total de produção do bioetanol (KOSSATZ, *et al.*, 2017). Embora, atualmente, o custo com celulases tenha sofrido uma redução, uma análise por HUMBIRD *et al.* (2011) mostraram que 16% do custo total do etanol ainda era contabilizado pelo custo das enzimas.

Estratégias estão sendo desenvolvidas no sentido de aumentar o rendimento dos processos de SSF e reduzir possíveis efeitos inibitórios existentes. Uma delas trata-se da adição de uma etapa de pré-hidrólise antes de iniciar a sacarificação e fermentação simultânea, conhecida como PSSF.

O objetivo da pré-hidrólise é hidrolisar parcialmente a celulose em açúcares monoméricos e oligoméricos, o que aumentaria a taxa de produção de etanol durante a etapa inicial da SSF. PSSF também foi proposto para reduzir a viscosidade dos processos que operem com altas cargas de substrato (MESA *et al.*, 2011).

Vários estudos de PSSF são relatados na literatura e observa-se uma diferença nos resultados dos processos que adotaram essa estratégia. ÖHGREN *et al.* (2007) relataram que não houve melhora no rendimento e nas concentrações de etanol após 16 h de pré-sacarificação de palha de milho pré-tratada a 11,55% de concentração de sólidos. MESA *et al.* (2011) realizaram o processo de PSSF de 10 h com concentração de sólidos (13-16%) de fibra de cana pré-tratada e obtiveram resultados melhores quando comparados ao processo de SSF. No estudo realizado usando-se oliveira pré-tratada, os autores relataram que a pré-hidrólise antes da sacarificação simultânea e da fermentação facilitou o desempenho de SSF com alta carga de substrato (17%) e etanol rendendo cerca de 50% do teórico (MANZANARES *et al.*, 2011). HOYER *et al.* (2013), realizando uma sacarificação e fermentação simultâneas de madeira de uma conífera, observaram que a adição de uma etapa de pré-hidrólise de 22 horas elevou a eficiência de processo para 72%. BARROS *et al.* (2017) ao realizar o processo de PSSF com bagaço de caju pré-tratado com ácido seguido de álcali, não obteve um aumento na eficiência do processo quando comparado ao processo de SSF.

Dessa forma, a presença ou não da etapa de pré-hidrólise deve ser avaliada em um processo de sacarificação e fermentação simultâneas para a obtenção de maiores rendimentos na produção de etanol.

Estudos de estratégias de alimentação de substrato durante o processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF em batelada alimentada) têm sido reportados na literatura como uma estratégia viável na produção de etanol. Esta configuração de processo tem o objetivo de aumentar a concentração de etanol no processo e, ao mesmo tempo, eliminar problemas relacionados à inibição da atividade enzimática e/ou fermentativa, devido a elevadas concentrações de substrato, produto e inibidores nos processos em batelada (RUDOLF *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2010; PESSANI *et al.*, 2011; FRADEN *et al.*, 2013; PAULOVÁ *et al.*, 2014).

ZHANG *et al.* (2010) avaliaram o efeito da batelada alimentada na produção de etanol a partir de espiga de milho pré-tratada com ácido-base, visando diminuir problemas de elevada viscosidade causada pela alta concentração de substrato seco. Segundo ZHANG *et al.* (2010) elevadas concentrações de etanol são oriundas de elevadas cargas de sólidos. Após uma pré-hidrólise de 24 h a 50 °C, houve um aumento na produção de etanol com produção de 84,7 g.L<sup>-1</sup> frente a produção por SSF sem alimentação de 69,2 g/L..

LIU *et al* (2010) realizaram estudos de produção de etanol em batelada alimentada a partir de resíduos de sabugo de milho, comparando a eficiência do mesmo com dados da literatura em batelada. Foram realizadas várias estratégias de alimentação partindo de 6% de sólidos e atingindo 9,9%; 11,3%; 12,4%; 13,4%; 14,2% e 15,0% de total de sólidos secos, sendo dosada celulase durante as alimentações. O autor obteve, com a carga total de 15%, a maior concentração de etanol (57g.L<sup>-1</sup>) e conversão de celulose teórica de 85%. Os autores descreveram que uma elevada concentração inicial de substrato no meio de sacarificação e fermentação simultâneas pode interferir negativamente na hidrólise da celulose, devido a problemas com a transferência de massa, e que são necessárias estratégias de alimentação de substrato de forma a prevenir inibições inerentes ao processo, tanto pelo substrato como pelo produto.

BARROS *et al.* (2017) realizaram o processo de batelada alimentada utilizando como substrato afibra de caju pré-tratada com ácido-base e *K. marxianus* ATCC36907. No processo relatado pelos autores, o processo de SSF foi iniciado com uma carga de 10% de substrato e adições de 12 em 12 h de substrato, sem adição de enzimas, até que fosse obtida uma carga final de 20% em sólidos. Foram obtidos aproximadamente 68g.L<sup>-1</sup> de etanol, correspondendo a uma eficiência de 80,64%. Estes autores também realizaram uma comparação de três estratégias de alimentação e mesmo aumentando a carga de sólidos final para 25%, não foi

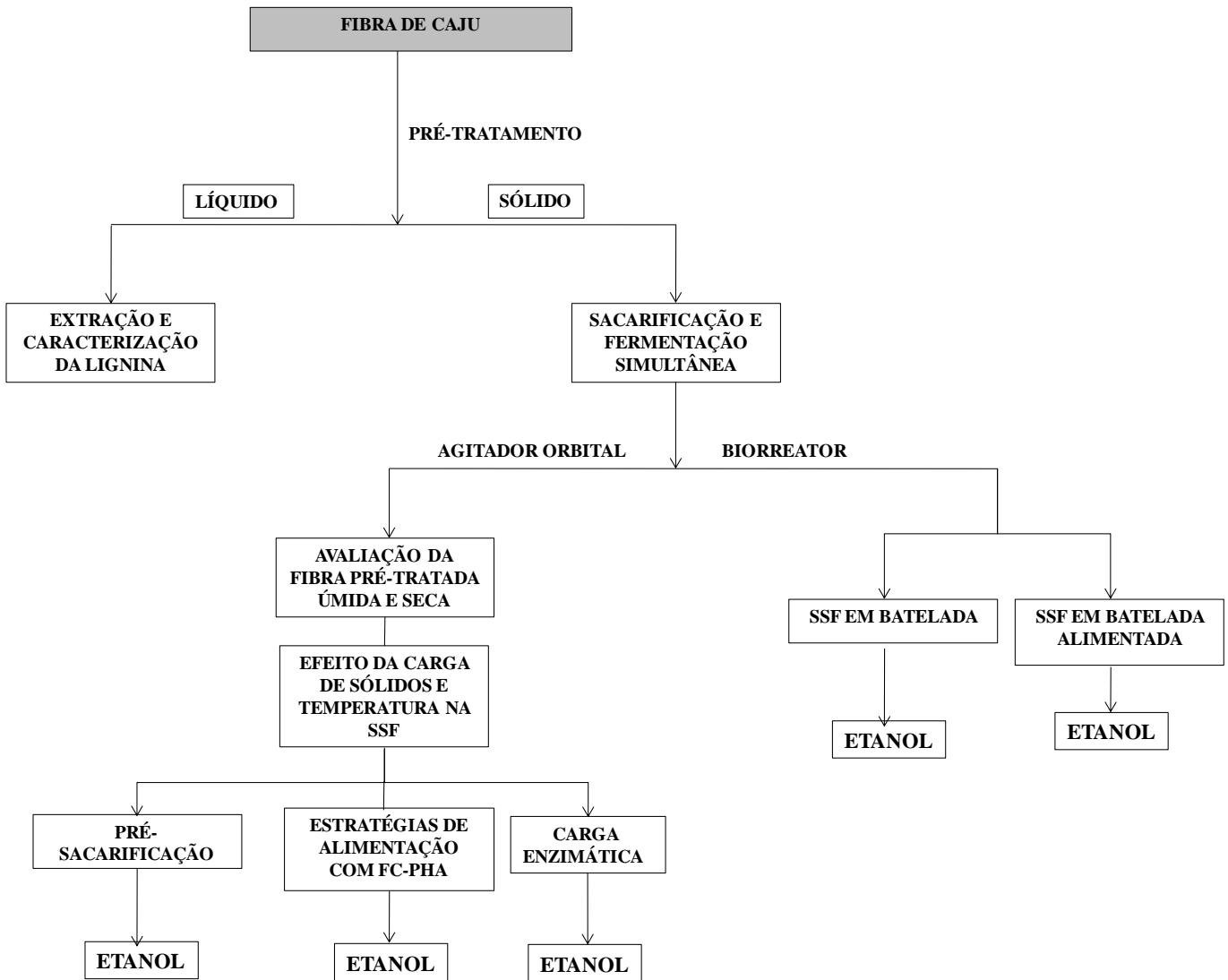
possível aumentar a concentração final de etanol, obtendo  $67,87\text{g.L}^{-1}$ . Isso dá um indicativo de um possível limite de tolerância para a levedura *K. marxianus* ATCC36907 em torno de  $68\text{ g.L}^{-1}$  de etanol no caldo fermentado.

Nesse sentido, visando produzir etanol por processo de SSF utilizando a fibra de caju, objeto deste trabalho, conduziu-se o processo em diferentes configurações, variando-se parâmetros operacionais com o intuito de aumentar a produção deste biocombustível.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Nesse trabalho estudou-se a produção de etanol a partir da fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA) através do processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF) em diferentes estratégias (Figura 3.1). Inicialmente avaliaram-se os efeitos da carga de sólidos e da temperatura nos processos de SSF em batelada, em seguida foram avaliados os efeitos da etapa de pré-hidrólise no processo de SSF. Realizou-se um estudo do efeito da alimentação com substrato (FC-PHA) no processo de SSF. Estudos de cargas enzimáticas foram avaliados, visando uma economia no processo antes de aumentarmos a escala para um biorreator. No biorreator foram realizados ensaios de produção de etanol por SSF em batelada e batelada alimentada. No presente trabalho, a lignina foi extraída do licor obtido após o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e caracterizada.

**Figura 3.1** Fluxograma do estudo de produção de etanol por SSF utilizando diferentes estratégias.



### 3.1.Microrganismo

A levedura *K. marxianus* ATCC36907, obtida de uma coleção de culturas Norte-Americana e adquirida com recursos de projeto, foi utilizada nesta pesquisa, baseando-se no desempenho deste microrganismo obtido dos estudos realizados por RODRIGUES *et al.* (2016) e BARROS *et al.* (2017).

### **3.1.1. Manutenção das células**

Para manutenção das células de *K. marxianus* ATCC36907, utilizou-se o meio ágar YEPD constituído por: 10 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 20 g.L<sup>-1</sup> peptona, 20 g.L<sup>-1</sup> glicose e 20 g.L<sup>-1</sup> ágar. A cultura foi mantida em placa para estoque sob refrigeração a 4°C. A cada três meses foi realizada a manutenção das células em estoque mantidas a -80 °C em meio Agar YEPD (40% glicerol).

## **3.2Complexo enzimático**

Nesse estudo foi utilizado o complexo enzimático Cellic CTec2 cordialmente doado pela empresa Novozymes (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) na forma de extrato enzimático.

### **3.2.1 Determinação da atividade de Celulases no Complexo Enzimático**

Na determinação da atividade de celulases, a atividade foi expressa em unidades de papel de filtro (FPU) por mL do complexo segundo a metodologia proposta por GHOSE (1987). Em tubos de ensaio, adicionou-se tiras de 1 cm x 6 cm (50 mg) de papel de filtro Whatman nº 1 e 1,0 mL de tampão citrato de sódio na concentração de 50 mM e pH 4,8, para pré-incubação a 50 °C. Em seguida, a reação de hidrólise foi iniciada pela adição de 0,5 mL de diferentes diluições enzimáticas. Nas mesmas condições experimentais, realizou-se a reação do branco das diluições enzimáticas (sem a presença do substrato) e branco do substrato (sem a presença da enzima). Após 60 min, as reações foram interrompidas com 3 mL do reagente DNS (MILLER, 1959) e fervidas durante 5 min. Logo após, foram adicionados 20 mL de água destilada em cada tubo e a leitura da absorbância feita a 540 nm em espectrofotômetro. A concentração de glicose liberada no meio foi determinada utilizando uma curva padrão de glicose. A atividade de celulase obtida no complexo Cellic CTec 2 foi 232,43 FPU.mL<sup>-1</sup>.

### **3.3 Material lignocelulósico**

A Fibra de Caju (FC) foi gentilmente cedido pela Indústria de Processamento de Sucos Jandaia localizada em Pacajus no Ceará, Brasil. AFC foi lavada três vezes com água e seca a 60°C por 24 h, triturado e padronizado os grãos por peneiramento (Mesh 20-80 correspondendo a 0,25-0,84 mm), em seguida estocado a temperatura ambiente para realização do pré-tratamento.

### **3.4 Pré-tratamento da Fibra de Caju**

O pré-tratamento foi realizado de acordo com a metodologia citada por CORREIA *et al.* (2015), utilizando peróxido de hidrogênio a uma concentração de 4,3% v.v<sup>-1</sup>. O pH da solução foi ajustado para 11,5 com NaOH 6 mol.L<sup>-1</sup>. O pré-tratamento foi conduzido em agitador orbital a 35 °C, 250 rpm por 6 horas, em frasco Erlenmeyer de 250 mL com 150 mL de volume reacional e uma porcentagem de sólidos de 5% m/v. Após, separou-se o líquido do sólido por filtração à vácuo. A fração sólida (FC-PHA) foi lavada até atingir o pH adequado para a hidrólise enzimática em seguida seca em estufa a 60 °C por 24 h, triturado e padronizado os grãos por peneiramento (Mesh 20-80 correspondendo a 0,25-0,84 mm), em seguida estocado a temperatura ambiente para realização dos experimentos.

### **3.5 Caracterização da matéria-prima**

A Fibra de Caju (FC), antes e após o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA), foi caracterizado quanto à sua composição de celulose, hemicelulose e lignina, segundo a metodologia de Gouveia e colaboradores (GOUVEIA *et al.*, 2009), validada para caracterização de fibra de cana-de-açúcar. Também, realizou-se análise de extraíveis (ceras e gorduras) e a determinação de sólidos totais e cinza conforme descritos nos protocolos da National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42619(SLUITER *et al.*, 2008a) e NREL/TP-510-42621(SLUITER *et al.*, 2008b), respectivamente.

### **3.5.1 Determinação de Sólidos Totais**

O teor de sólidos totais foi determinado segundo a metodologia descrita por National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42621 (SLUITER *et al.*, 2008b). Num cadinho de 25 mL, previamente pesado, adicionou-se 3 g ± 0,1 mg da amostra e em seguida foi aquecido em estufa a 105°C por 4 h. Após esse período o material foi retirado da estufa e esfriado a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) em um dessecador por 1 h para efetuar a pesagem. Colocou-se a amostra novamente na estufa a 105°C e secou-se até peso constante. O peso constante foi definido como ± 0,1% de alteração no peso dos sólidos sobre uma hora de re-aquecimento da amostra. A percentagem de sólidos totais (ST) foi determinada segundo a Equação 3.1.

$$\% \text{ Sólidos Totais} = \left[ 1 - \frac{(m_{\text{ÚMIDA}} - m_{\text{SECA}})}{m_{\text{ÚMIDA}}} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

### **3.5.2 Determinação de Extraíveis**

A percentagem dos extraíveis do material lignocelulósico foi determinada pelo método de Sohlext, usando-se 5g da amostra, adicionado em cartuchos de papel, sendo realizada a extração com 80 mL de etanol 95% v.v<sup>-1</sup> a 80°C por 8 h em um determinador de óleos e gorduras (Tecnal, TE – 044-5/50). Após a extração, os reboilers previamente pesados, que continham o solvente e o extrato, foram adicionados em estufa com circulação de ar (Tecnal, TE – 394/1) a 60°C por 24 h e após esse período foi adicionado em dessecador por 1 h para pesagem. A Equação 3.2 apresenta a expressão utilizada para determinar a percentagem de extraíveis, sendo  $m_i$  a massa inicial do reboiler,  $m_f$  a massa final do reboiler e ST a massa de sólidos totais.

$$\% \text{ Extraíveis} = \frac{(m_i - m_f)}{ST} \times 100 \quad (3.2)$$

### **3.5.3 Determinação do teor de glucana, xilana, lignina solúvel e inibidores**

Para determinação do teor de glucana e xilana presentes nas amostras de fibra de caju *in natura* e pré-tratada, foram utilizados 2 g de FC livre de gorduras e ceras, pesadas com

precisão de 0,1 mg, em seguida transferidas para bêqueres de 100 mL e tratadas com 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% v.v<sup>-1</sup>, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado a 45 °C por 7 min. As amostras foram transferidas quantitativamente para frascos Erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se o volume de 275 mL de água destilada. Após, as amostras foram hidrolisadas em autoclave a 121 °C por 30 min. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo. A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume posteriormente completado com água destilada. A solução foi armazenada para análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural e lignina solúvel. A fração sólida foi retida e armazenada para posterior análise de lignina insolúvel.

Para a análise dos carboidratos (glucana e xilana), furfural, hidroximetilfurfural e ácidos orgânicos (acético e fórmico), utilizaram-se a fração líquida do hidrolisado, e a concentração foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando um sistema de CLAE (Waters, Milford, MA, E.U.A.) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414 e com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio Rad, Hercules, CA, USA). O eluente foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM em água deionizada (MiliQ, Millipore) com vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> a 65°C. As concentrações de cada componente são obtidas através de curvas de calibração que correlacionam concentrações dos padrões com as respectivas áreas dos cromatogramas.

Para determinação de glucana e xilana utilizaram-se as concentrações decarboidratos e ácidos orgânicos obtidos, usando-se os fatores de conversão para converter amassa desses compostos em massa de glucana e xilana. Esses fatores são baseados na estequiometria de conversão em seus compostos percursores. Os fatores utilizados para obter a percentagem de glucana foram 0,95, 0,90, 3,09 e 1,29 para celobiose, glicose, ácido fórmico e hidroximetilfurfural, respectivamente. Na determinação da percentagem de xilana, os fatores foram 0,88, 0,88, 1,37 e 0,72 para xilose, arabinose, furfural e ácido acético, respectivamente. As Equações 3.3 e 3.4 apresentam as expressões utilizadas para determinar a percentagem de glucana e xilana:

$$\text{Glucana (\%)} = \frac{m_{celobiose} \times 0,95 + m_{glicose} \times 0,90 + m_{ac.fórmico} \times 3,09 + m_{HMF} \times 1,29}{ST} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\text{Xilana (\%)} = \frac{m_{xilose} \times 0,88 + m_{arabinose} \times 0,88 + m_{ac.acético} \times 1,37 + m_{Furfural} \times 0,72}{ST} \times 100 \quad (3.4)$$

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a Equação 3.5:

$$C_{lig} = 4,187 \times 10^{-2}(A_T - A_{pd}) - 3,279 \times 10^{-4} \quad (3.5)$$

sendo:  $C_{lig}$  - concentração de lignina solúvel, em  $\text{g.L}^{-1}$ ;  $A_T$  - absorbância da fração líquida obtida da hidrólise junto com os produtos de degradação, em 280 nm;  $A_{pd} = c_1\epsilon_1 + c_2\epsilon_2$  . representa a absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações  $c_1$  e  $c_2$  foram determinadas previamente por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e  $\epsilon_1$  e  $\epsilon_2$  são as absorvividades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00  $\text{L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.5.4 Determinação de lignina insolúvel**

O material retido no papel de filtro (fração sólida) foi lavado com aproximadamente 1500 mL de água destilada, para secagem em estufa a 100 °C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa de amostra seca conforme a Equação 3.6:

$$\% L_i = \frac{(M - M_C)}{M_A} \times 100 \quad (3.6)$$

sendo:  $L_i$  – Lignina insolúvel;  $M$  – massa de lignina insolúvel seca;  $M_C$  – massa de cinzas presente na lignina ;  $M_A$  – massa da amostra seca.

### **3.5.5 Determinação de cinzas**

Após a determinação da lignina insolúvel em meio ácido, a mesma, juntamente com o papel de filtro, foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente tarado. A amostra foi calcinada lentamente até 300 °C e mais 2 h a 800 °C, em uma mufla (EDG 3P-S). Na determinação das cinzas totais, pesaram-se aproximadamente 2 g da fibra em cadinho de

porcelana previamente tarado. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinado conforme a Equação 3.7:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{M_c}{M_a} \times 100 \quad (3.7)$$

Sendo: % cinzas – percentual em massa de cinzas; M<sub>c</sub> – massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio); M<sub>a</sub> – massa da amostra base seca.

### **3.6 Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF) em agitador orbital (SSF)**

A fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA) foi suspensa em 100 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, e suplementado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 1,0 g.L<sup>-1</sup>. Em seguida, esterilizou-se este meio em autoclave a 110 °C durante 10 min. O processo SSF foi iniciado por adição do complexo enzimático Cellic CTec 2 (atividade 232,43 FPU.mL<sup>-1</sup>) com carga de 30 FPU.g<sub>FC-PHA</sub><sup>-1</sup> e em seguida pela inoculação de 5,0 g.L<sup>-1</sup> de massa celular da levedura *K.marxianus* ATCC 36907, e realizado em um agitador orbital (Tecnal - TE 422, SP, Brasil) a 150 rpm por 72 h. A quantidade de sólidos (FC-PHA) e a temperatura do processo foram parâmetros estudados no trabalho. Os ensaios foram realizados em triplicata e amostras (1,0 mL) foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e submetidas à análise de glicose, xilose e etanol.

A concentração dos carboidratos (glicose e xilose) e etanol foram medidas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, em um sistema de CLAE (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414 e coluna Aminex HPX-87H a 65°C, sendo o eluente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 mmol.L<sup>-1</sup> e vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. O volume de injeção das amostras foi 20 µL e os picos foram comparados com o tempo de retenção dos padrões.

#### **3.6.1 Obtenção de massa celular para a condução dos processos SSF**

Para a propagação do inóculo, as leveduras foram inicialmente ativadas em meio ágar YEPD (contendo: extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, glicose 20,0 g.L<sup>-1</sup>, peptona 20,0 g.L<sup>-1</sup> e ágar

20,0 g.L<sup>-1</sup>) e incubada a 30 °C por 48h. Em seguida, transferiram-se três alçadas da cultura para 100 mL de meio YEPD caldo (contendo: extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, glicose 20,0 g.L<sup>-1</sup> e peptona 20,0 g.L<sup>-1</sup>) com pH ajustado para 4,5 e as culturas foram mantidas a 30 °C, 150 rpm por 24 h e após centrifugadas a 6.000 rpm por 10 min para se obter a biomassa celular inicial dos processos de SSF.

Foram feitas análises para determinação do teor de umidade presente nas células de biomassa. Amostras de 3g de células úmidas obtidas do processo de centrifugação do inóculo foram lavadas com 20 mL de água destilada para remoção de excedente de meio de cultura, e novamente centrifugado (6.000 rpm/15minutos) e seco a 60°C em estufa até peso constante. Pelo cálculo do peso seco foi determinada o teor de umidade das células. Como resultado, o teor de 2,7 g célula úmida equivale a 1,0 g célula seca. O inóculo foi adicionado ao meio reacional com base na massa úmida obtida.

### **3.6.2 Efeito comparativo da SSF utilizando fibra de caju pré-tratato seco e úmido**

Para a realização desse estudo foi necessário calcular o nível de umidade do FC-PHA. Em um cadinho de 25 mL, previamente pesado, adicionou-se 3 g ± 0,1 mg FC-PHA úmido e em seguida foi aquecido em estufa a 50°C por 24 h. Após esse período o material foi retirado e esfriado a temperatura ambiente (25 °C) em um dessecador por aproximadamente 1 h para efetuar a pesagem. Colocou-se a amostra novamente na estufa a 50°C e secou-se até massa constante. A percentagem de umidade foi determinada segundo a Equação 3.8.

$$\% \text{ Umidade}_{\text{FC-PHA}} = \frac{(m_{\text{ÚMIDA}} - m_{\text{SECA}})}{m_{\text{ÚMIDA}}} \times 100 \quad (3.8)$$

Após o cálculo da umidade do FC-PHA, seguiu-se para realização do estudo comparativo de SSF utilizando a fibra pré-tratada úmido e com fibra pré-tratada seco. Para este estudo foram utilizados 50% m.v<sup>-1</sup> do FC-PHA úmido e 5% m.v<sup>-1</sup> do FC-PHA seco. O processo de SSF foi conduzido a 45 °C, 150 rpm por 72 horas e as demais condições como descritas no item 3.6.

### **3.6.3 Estudo do efeito da carga de sólidos no processo SSF.**

Utilizando a metodologia citada no item 3.6, foram realizados os estudos do efeito da carga de FC-PHA: 2,0, 3,0, 4,0 e 4,5 g<sub>celulose</sub>/100 mL meio, correspondendo a 4,52, 6,79, 9,05 e 10,0 g<sub>FC-PHA</sub>/100 mL, fixando a temperatura a 45°C.

### **3.6.4 Estudo do efeito da temperatura no processo SSF**

Este estudo foi realizado para determinar o efeito da temperatura na produção de etanol usando o processo SSF. Foram estudadas as temperaturas 37 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C seguindo a metodologia supracitada no item 3.6. Nesse estudo utilizou-se uma carga de sólidos de 4,5 g<sub>celulose</sub>/100 mL meio, correspondendo a 10,0 g<sub>FC-PHA</sub>/100 mL.

## **3.7 Avaliação da etapa de Pré-sacarificação no processo SSF (PSSF)**

Para avaliar o efeito de uma pré-hidrólise no processo SSF, selecionou-se as melhores condições obtidas nos estudos anteriores. A pré-sacarificação foi realizada a 45 °C com a adição do complexo enzimático Cellic CTec 2, utilizando uma carga de 30 FPU celulase. g<sub>FC-AHP</sub><sup>-1</sup>, avaliando diferentes tempos de pré-hidrólise: 12 h e 24 h. Após o período de pré-hidrólise, adicionou-se as massa celular de *K. marxianus* na concentração de 5 g.L<sup>-1</sup>, dando inicio ao processo de sacarificação e fermentação simultânea como descrito no item 3.6.

## **3.8 Avaliação de estratégias de alimentação durante o processo SSF**

Estratégias de alimentação foram desenvolvidas com o objetivo de buscar amenizar efeitos inibitórios atrelados a processos em batelada. A fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA) foi adicionado ao meio no início e durante o processo de SSF de acordo com diferentes estratégias citadas posteriormente (Tabelas 3.1 e 3.2), sendo suspensos em 100 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), suplementado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 1,0 g.L<sup>-1</sup>. O meio foi esterilizado em autoclave a 110 °C durante 10 min. A enzima (Cellic CTec 2) foi adicionada ao meio com carga de 30

$\text{FPU.g}_{\text{FC-PHA}}^{-1}$  e em seguida 5,0 g.L<sup>-1</sup> de biomassa celular (*K. marxianus* ATCC 36907) também foram acrescentados, e o processo ocorreu a 45°C, 150 rpm em agitação orbital (Tecnal - TE 422, SP, Brasil) por 72 h. Os experimentos foram realizados em triplicata e amostras (1,0 mL) foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e submetidas à análise de glicose, xilose e etanol conforme descrito em 3.6.

Inicialmente, quatro perfis de alimentação diferentes foram investigados com cargas iniciais de 5,0% m/v de FC-PHA e parte do substrato foi alimentado durante o processo em diferentes tempos, até obter uma carga final de 10,0% m/v. As estratégias executadas estão apresentadas na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** Estratégias de alimentação de FC-PHA durante o processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas conduzido a 45 °C, 150 rpm e 72 h, visando obter uma carga final de 10,0% m/v FC-PHA.

Estratégias	Carga inicial de FC-PHA % m/v	Alimentações de substrato % m/v			Carga final de FC-PHA % m/v
		6 h	12 h	24 h	
FB1	5,0	2,5	2,5	-	10,0
FB2	5,0	-	2,5	2,5	10,0
FB3	5,0	5,0	-	-	10,0
FB4	5,0	-	5,0	-	10,0

Visando aumentar a carga final de fibra utilizada no processo de *fed-batch*, foram realizados experimentos aumentando a carga inicial e a carga alimentada durante 48 h, conforme estratégias apresentadas na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2** Estratégias de alimentação de FC-PHA durante o processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas conduzido a 45 °C, 150 rpm e 72 h, visando obter uma carga final maior que 10% m/vFC-PHA.

<b>Estratégias</b>	<b>Carga inicial de FC-PHA% m/v)</b>	<b>Alimentações de substrato% m/v</b>					<b>Carga final de FC-PHA% m/v</b>
		<b>6 h</b>	<b>12 h</b>	<b>24 h</b>	<b>36 h</b>	<b>48 h</b>	
FB5	6,0	-	2,0	2,0	2,0	2,0	14,0
FB6	6,0	-	3,0	3,0	3,0	3,0	18,0
FB7	10,0	2,0	-	2,0	-	-	14,0
FB8	10,0	-	4,0	-	-	-	14,0
FB9	10,0	-		4,0	-	-	14,0
FB10	10,0	-	4,0	4,0	-	-	18,0
FB11	10,0	-	-	4,0	-	4,0	18,0

### 3.9 Teste de inibição por etanol

Esse teste foi realizado para verificar se a concentração de etanol produzida durante a SSF tem efeito inibitório no processo. Foram adicionados concentrações iniciais de etanol de 15 g.L<sup>-1</sup>, 20 g.L<sup>-1</sup>, 40 g.L<sup>-1</sup> e 60 g.L<sup>-1</sup> ao meio contendo 100 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), suplementado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 1,0 g.L<sup>-1</sup>. Esse teste, diferentemente do processo de SSF, não contou com a adição de fibra no meio e sim com uma concentração de 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose adicionada no inicio do processo fermentativo e 5 g.L<sup>-1</sup> de inóculo. Foi realizado um ensaio como controle do processo, seguindo a mesma metodologia, sem a adição do etanol. Os resultados da inibição das concentrações de etanol foram baseados na taxa de consumo de glicose do decorrer de 12h e no aumento da produção de etanol. Os ensaios ocorreram a 45 °C e 150 rpm em triplicata.

### **3.10 Estudo do efeito da carga enzimática no processo de SSF**

Visando um aumento de escala do processo e uma economia no que se refere à carga enzimática utilizada, foi realizado um estudo comparativo de quatro cargas enzimáticas (30 FPU.g<sub>FC-PHA</sub><sup>-1</sup>, 25 FPU.g<sub>FC-PHA</sub><sup>-1</sup>, 15 FPU.g<sub>FC-PHA</sub><sup>-1</sup> e 10 FPU.g<sub>FC-PHA</sub><sup>-1</sup>) no processo de SSF. Inicialmente, 10% m.v<sup>-1</sup> FC-PHA foi suspenso em 100 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, e suplementado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 1,0 g.L<sup>-1</sup>. Em seguida, esterilizou-se este meio em autoclave a 110 °C durante 10 min. O processo SSF foi iniciado por adição do complexo enzimático Cellic CTec 2 nas cargas citadas anteriormente, seguido pela inoculação de 5,0 g.L<sup>-1</sup> de biomassa de *K. marxianus* ATCC 36907, incubado a 45 °C e 150 rpm em agitação orbital (Tecnal - TE 422, SP, Brasil) por 72 h. Os ensaios foram realizados em triplicata e amostras (1,0 mL) foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e submetidas à análise de glicose, xilose e etanol conforme descrito no tópico 3.6.

### **3.11 Produção de etanol por SSF em escala de biorreator**

Essa etapa do trabalho foi realizada em biorreator de bancada comercial Tec-Bio, modelo 1.5, fabricado pela empresa Tecnal (SP, Brasil), com 1L de disponibilidade no vaso reacional com banho térmico, chicanas eqüidistantes e sistema de agitação com três impelidores tipo hélice com potência ajustável. Afibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA) foi suspenso em 750 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), e suplementado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 g.L<sup>-1</sup> e extrato de levedura 1,0 g.L<sup>-1</sup>. Em seguida esterilizou-se este meio em autoclave a 110 °C durante 10 min. O processo SSF em biorreator foi realizado sem aeração iniciado por adição do FC-PHA conforme Tabela 3.3, seguido do complexo enzimático Cellic CTec 2 com carga de 15 FPU/g<sub>FC-PHA</sub> finalizado pela inoculação de 5,0 g.L<sup>-1</sup> de biomassa da levedura *K. marxianus* ATCC 36907, incubado 45°C. Foi realizada uma rampa de agitação: 500 rpm na primeiras 12 horas e em seguida a agitação foi reduzida para 200 rpm até 72 h de processo. Amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e submetidas à análise de glicose, xilose e etanol conforme descrito no tópico 3.6.

**Tabela 3.3** Processos SSF realizados em biorreator em sistema batelada (Ensaio 1) e batelada alimentada (Ensaios 2, 3 e 4) a 45 °C, a 500 rpm nas primeiras 12 horas e em seguida 200 rpm até 72 h de processo.

Ensaios em biorreator	Carga inicial de FC-PHA(% m/v)	Alimentações de substrato % m/v			Carga final de FC-PHA % m/v
		12 h	24 h	48 h	
01	10,0	-	-	-	10,0
02	10,0	-	4,0	-	14,0
03	10,0	4,0	4,0	-	18,0
04	10,0	-	4,0	4,0	18,0

### 3.12 Determinação dos parâmetros de conversão

#### 3.12.1 Eficiência do processo ( $\eta$ )

Este parâmetro expressa a conversão total da celulose em etanol realizada no processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas, sendo o indicativo da eficiência de processo e expresso através da Equação 3.9, de acordo com o protocolo NREL/TP-510-42630 da National Renewable Energy Laboratory (DOWE *et al*, 2001).

$$\eta(\%) = \frac{EtOH_t(g.L^{-1}) - EtOH_0(g.L^{-1})}{[Celulose_{inicial} \times m_{FC-PHA}(g.L^{-1}) \times 1,11] \times 0,511} \times 100 \quad (3.9)$$

Sendo,  $EtOH_t(g.L^{-1})$  = Concentração final de etanol  $EtOH_0(g.L^{-1})$  = Concentração inicial de etanol;  $Celulose_{inicial}$  = fração de celulose presente na FC-PHA  $m_{FC-PHA}(g.L^{-1})$  = concentração de FB-PHA seca no meio reacional; 1,11 é o fator de conversão de celulose em glicose; 0,511 é o fator de conversão de glicose em etanol de acordo com a estequiométria da fermentação, sendo um limite teórico.

### **3.12.2 Rendimento ( $g_{etanol}/g_{celulose}$ )**

O rendimento nos processos de SSF foi calculado como uma relação entre a quantidade de etanol produzida em  $g.L^{-1}$  e a quantidade total de celulose cedida ao processo em  $g.L^{-1}$ .

### **3.12.3 Produtividade de etanol**

A produtividade nos processos de SSF foi calculada como uma relação entre a produção máxima de etanol no processo e o tempo no qual ocorreu essa produção.

## **3.13 Extração e Caracterização da lignina obtida no pré-tratamento da fibra de caju com peróxido de hidrogênio alcalino.**

Como descrito no item 3.4, após o pré-tratamento da fibra de caju, foram obtidos duas fases: uma sólida, a fibra pré-tratada e uma fração líquida na qual continha o licor rico em lignina. A lignina foi extraída do licor obtido após o pré-tratamento e em seguida foi caracterizada.

### **3.13.1 Extração da lignina**

O processo de extração da lignina ocorreu por precipitação ácida, adicionando 1 mol/L  $H_2SO_4$ , até obter o pH igual a 2, a solução ficou em repouso *overnight* e em seguida foi centrifugada a 6.000 rpm por 15 min(RABELO *et al.*, 2014).A lignina obtida foi lavada adicionando 40 mL de água destilada, ressuspensa e levada novamente para centrifugação(6.000 rpm por 15 min). O processo de lavagem da lignina com água destilada foi realizado três vezes e em seguida a lignina foi seca a 50°C em estufa com circulação de ar (TECNAL TE-394/1) para então ser caracterizada.

### **3.13.2 Caracterização da Lignina**

#### **3.13.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Essa análise foi realizada com a lignina seca e em seguida foi realizada a montagem da amostra ou disposição em *stubs* e então foi realizada a metalização, que é o revestimento da amostra com ouro, usando pulverização catódica utilizando a Metalizadora QT150 ES – Quorume. A análise microscópica foi realizada no Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG, disponível na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará.

### *3.13.2.2 Análise por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

Com o objetivo de se analisar a estrutura química da lignina realizou-se análises de Infravermelho com Transformada de Fourier. Para as análises, pastilhas de KBr foram preparadas contendo 80 mg de KBr e 2,7 mg de amostra. Esta metodologia de preparação de amostras foi padronizada para as frações visando minimizar os erros experimentais associados à preparação de amostras para FTIR.

Todos os espectros foram obtidos usando um espectrômetro FTIR (Varian/ 620-IR), na região de comprimento de onda de 4000-400 cm<sup>-1</sup> com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e registrados como absorbância. Essa análise foi realizada no Laboratório Multusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Agroindústria Tropical.

### *3.13.2.3 Análise Imediata*

Para a determinação da umidade, teor de voláteis, teor de carbono fixo e teor de cinzas das amostras, a análise imediata foi realizada com aproximadamente 2 g de material no analisador termogravimétrico TGA701 LECO, disponível no Grupo de Catálise e Célula a Combustível do Departamento de Engenharia Química, dos Materiais e da Produção Industrial da Universidade de Nápoles Federico II (Itália).

### *3.13.2.4 Análise Elementar*

A Análise Elementar é uma técnica para determinação da composição elementar em termos de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio de uma amostra. Seu funcionamento é

baseado no método de Pregl-Dumas, no qual as amostras são sujeitas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro, e os gases resultantes dessa combustão são quantificados.

Para a realização da análise, alíquotas das amostras foram secas *overnight* a 105 °C. Em seguida, essas amostras foram inseridas no analisador CHNS/O PE2400 Perkin Elmer, disponível na Università di Napoli Federico II em Nápoles – Itália, juntamente com os dados de massa de cada amostra.

### *3.13.2.5 Análise Termogravimétrica*

Para avaliar as mudanças em massa e os efeitos térmicos nas amostras de lignina foram realizadas análises termogravimétricas. Na Análise Termogravimétrica é realizado o monitoramento da perda ou agregação de massa numa amostra em função da temperatura ou do tempo, num ambiente de atmosfera controlada, que pode ser nitrogênio ou ar sintético.

A estabilidade das amostras foram testadas com uso do equipamento Júpter STA 409 Netzsch submetidas a faixa de temperatura de 30 °C – 900°C com taxa de aquecimento de 10 K.min<sup>-1</sup> sob atmosfera N<sub>2</sub>. Essas análises foram realizadas no laboratório de caracterização e propriedade dos cristais, bloco 928, Departamento de Física,Universidade Federal do Ceará.

## **3.14 Análise Estatística**

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente utilizando uma análise de variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% e uma probabilidade de 5% ( $p<0,05$ ). Testes de *Tukey* também foram utilizados com nível de confiança de 95%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Microcal Origin 8.1 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, EUA).

## 4. Resultados e Discussões

### 4.1 Caracterizações das frações obtidas do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

#### 4.1.1 Caracterização da fração sólida obtida após o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino

A composição da fibra de caju *in natura* e após o pré-tratamento estão apresentadas na Tabela 4.1. A análise composicional da fibra de caju apresentada está de acordo com a composição obtida por outros autores para a mesma matéria lignocelulósica, a qual foi avaliada na produção de etanol de segunda geração (ROCHA *et al.*, 2011; CORREIA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017).

É possível observar que houve uma recuperação de sólido de  $37,3 \pm 0,67\%$  após lavagem da fibra, para total eliminação do peróxido, e secagem em estufa seguida de padronização granulométrica. Diversos estudos de pré-tratamento na literatura apresentam uma menor recuperação de sólidos quando comparado ao obtido no presente estudo. BARROS *et al.* (2017) e RODRIGUES *et al.* (2016) realizaram um pré-tratamento ácido seguido de álcali da fibra de caju e obtiveram um rendimento de apenas 9,34% em recuperação de sólidos.

**Tabela 4.1** Composição da fibra de caju não tratada (FC-*in natura*) e da fibra pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino (FC-PHA).

Componentes	FC <i>in natura</i> (%)	FC-PHA (%)
Celulose	$20,56 \pm 2,19$	$44,16 \pm 0,29$
Hemicelulose	$10,17 \pm 0,89$	$18,27 \pm 0,07$
Lignina	$35,26 \pm 0,9$	$2,91 \pm 0,07$
Extraíveis	$7,79 \pm 0,60$	$4,87 \pm 0,26$
Cinzas	$1,62 \pm 0,07$	$5,87 \pm 0,86$

O pré-tratamento não alterou significativamente o percentual de umidade presente na matéria-prima. A fibra *in natura* apresenta 12,2% em umidade e após o pré-tratamento com o PHA reduziu para 10,8%. A quantidade de sólidos totais presente na fibra de caju apresentou um pequeno aumento de 87,8% em sólidos no material *in*

*natura* para 89,2% em sólidos na fibra pré-tratada. A diminuição do teor de umidade da fibra tratada pode ser explicada devido o peróxido de hidrogênio ser um agente oxidante, tendo como alguns produtos da reação de oxirredução, o gás oxigênio e água (KARAGÖZ *et al.*, 2012).

A ação oxidante do peróxido de hidrogênio também contribui para a despolimerização da lignina quebrando as ligações dessa molécula em componentes de massa molecular menor (SELIG *et al.*, 2009). O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino resultou numa diminuição do teor de lignina presente na fibra, indicando que uma fração significativa da lignina foi removida (91,7% de remoção). Com a diminuição do teor de lignina, a porcentagem de celulose e hemicelulose aumentaram de 20,56% e 10,17% m/m para 44,16% e 18,27% m/m, respectivamente. Segundo CAO *et al.* (2012) e KARAGÖZ *et al.* (2012), o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino aumenta a eficiência na hidrólise enzimática por promover a deslignificação, sendo o pré-tratamento com PHA mais eficaz para a solubilização da lignina do que o pré-tratamento com outros ácalis (CHEN *et al.*, 2008). A remoção ou ruptura da lignina tem sido estabelecida como sendo essencial para bioconversão eficiente de materiais lignocelulosicos em açúcares, sendo este o constituinte dos lignocelulósicos que negativamente influencia a hidrólise enzimática da celulose. Contudo diferentes aplicações da lignina estão em investigação para obtenção de produtos com potencial de mercado (ALVIRA *et al.*, 2010; RABELO *et al.*, 2014).

No presente estudo, a fibra de caju livre de lignina após ação do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino foi aplicada em estudos de produção de etanol por Sacarificação e Fermentação Simultânea.

#### **4.1.2 Extração e caracterização da lignina obtida a partir da fração líquida oriunda do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino**

A partir da fração líquida obtida após o pré-tratamento da fibra de caju com peróxido de hidrogênio alcalino foi extraída a lignina. A massa de lignina extraída foi de 12,69 g para cada 100 g de fibra *in natura* e apresentou 6,65% de umidade. RABELO *et al.* (2014) extraíram lignina a partir da fibra de cana de açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino (7,36% v/v), 4% de sólidos, por 1 hora a 25 °C e

---

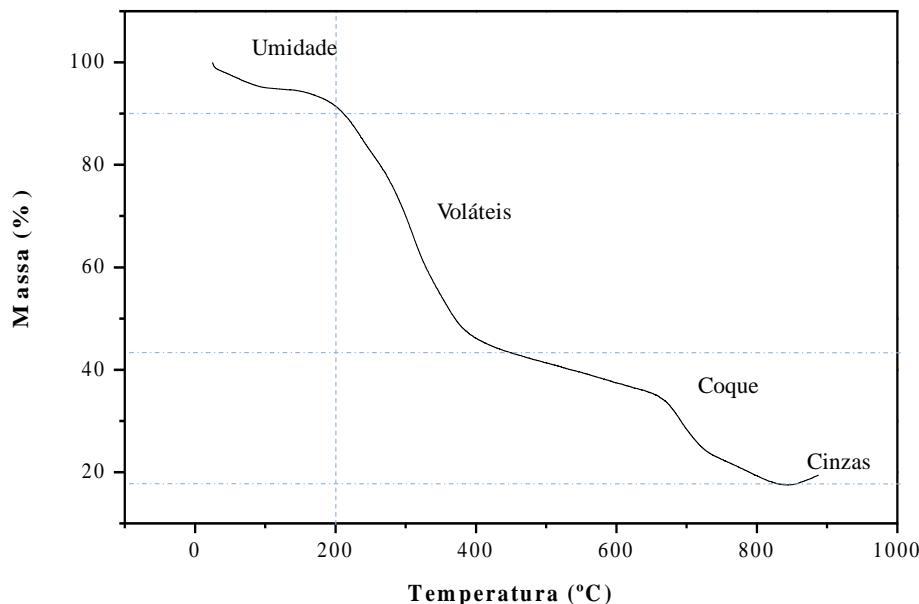
obtiveram 14,73 g para cada 100g de fibra *in natura* e umidade de 19,43%, sendo a massa de lignina recuperada semelhante a massa obtida do presente estudo.

Foram realizadas análises imediatas da amostra de lignina extraída da fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e obteve-se 6,93% de carbono fixo, 78,34% de voláteis e 8,88% de cinzas, bem como apresentou teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio de 47,57%; 6,86% e 5,60%, respectivamente. Os valores para análise elementar encontrados na literatura apresentam variações, possivelmente causadas pela composição do material de origem da lignina bem como do processo de extração. Por exemplo, KONDURI *et al.* (2015) estudaram a caracterização da lignina de madeira dura e obteve os seguintes teores de carbono: 64,76 %, hidrogênio 5,78% e nitrogênio 0,03%.

A decomposição térmica da lignina é outro importante tópico a ser considerado na sua caracterização, este comportamento pode ser avaliados através de análises termogravimétricas (TGA). Na curva de TGA apresentada na Figura 4.1, a perda de massa até 115 °C ocorre, principalmente, pela evaporação da água e substâncias de baixo peso molecular, tais como monóxido e dióxido de carbono. Já a perda de massa em torno de 200 °C é devido ao início da reação de pirólise da lignina. E acima de 300 °C normalmente ocorre à degradação da lignina, ocorrendo rupturas das ligações entre unidades que resulta na perda de fenóis. Acima de 400 °C ocorre a degradação dos anéis aromáticos. A massa não degradada possivelmente indica a formação de coque (GORDOBIL *et al.*, 2014).

A degradação da lignina é um processo complexo, onde ela se decompõe termicamente ao longo de um amplo intervalo de temperatura, devido ao fato de que os vários grupos funcionais à base de oxigênio têm estabilidade térmica diferente (LAURICHESSE e AVÉROUS, 2014).

**Figura 4. 1** Estabilidade térmica da lignina extraída durante o pré-tratamento da fibra de caju com peróxido de hidrogênio alcalino (4,3% v/v, pH 11,5, 5% de FB, 35 °C, 250 rpm por 6 h).



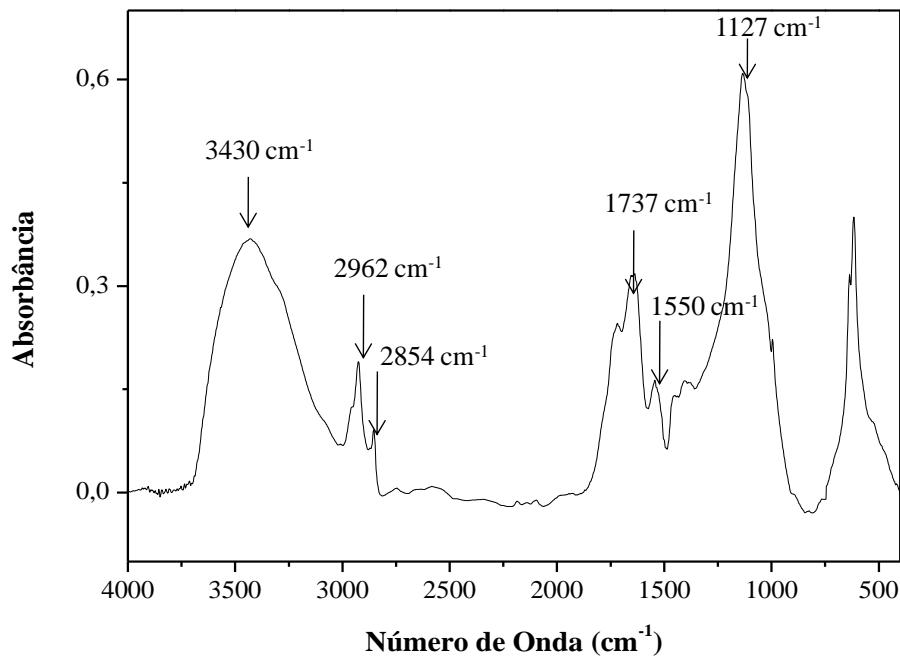
Também, foi realizada a espectroscopia na região do infravermelho da lignina extraída. Essa é uma técnica amplamente utilizada para a caracterização qualitativa da lignina e seus derivados podendo ser usada como instrumento para compreender a estrutura e os grupos químicos alterados, removidos e/ou adicionados a esta (RAMESH *et al.*, 2004). Contudo, existem dificuldades em relação à interpretação dos espectros de infravermelho da lignina, devido à influência de alguns fatores, como heterogeneidade estrutural e modificações introduzidas no processo de separação.

A Figura 4.2 apresenta o espetro de FTIR da lignina extraída e este demonstrou um fracionamento bem-sucedido, pois as bandas encontram-se bem definidas no gráfico. A lignina obtida no presente estudo pode ser considerada uma lignina isenta de carboidratos. Segundo LOPES *et al.* (2013), uma vez que não forem observadas bandas características a 897, 1046 e 1080 cm<sup>-1</sup> a lignina não apresenta carboidratos em sua estrutura.

Uma forte vibração foi observada na banda do número de onda a 1127 cm<sup>-1</sup>, que é característica da contribuição vibracional de três tipos de grupos nomeada C-H em

uma deformação plana, C= no estiramento das unidades de siringil, bem como os alcoóis secundários presentes na lignina. A pequena banda a  $1158\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a estiramento assimétrico de C–O em ligações ésteres. Uma banda pode ser notada a  $1654\text{ cm}^{-1}$  que está associada com a ligação dupla do carbono (C=); comprimento relacionado a aril-cetona, presente na estrutura da lignina. Bandas em intensidades de absorção a  $2852$  e  $2920\text{ cm}^{-1}$ , observadas no espectro da Figura 4.2, são características dos grupos CH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> presentes em moléculas de hidrocarbonetos (LOPES *et al.*, 2013).

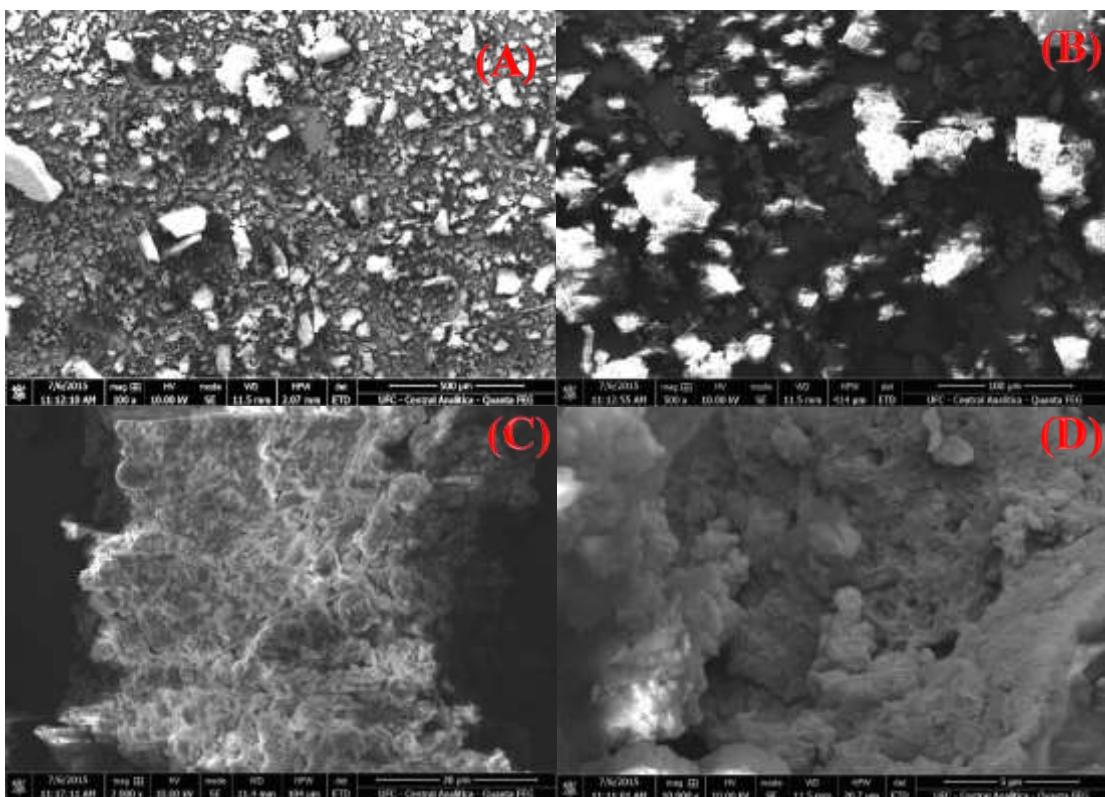
**Figura 4. 2** Espectro de FTIR da lignina extraída durante o pré-tratamento da fibra de caju com peróxido de hidrogênio alcalino (4,3% v/v, pH 11,5), 5% de FC *in natura*, 35 °C, 250 rpm por 6 h.



O espectro obtido apresenta bandas de absorção típicas de lignina e semelhantes às obtidas por RAMESH *et al.* (2004), SILVA *et al.* (2011) e LI *et al.* (2015). Os autores supracitados concluíram em seus espectros que as bandas com absorbância máxima em  $3430\text{ cm}^{-1}$  representam estiramento de grupos OH,  $2962\text{ cm}^{-1}$  estiramento CH de grupos metila ou metíleno,  $2854\text{ cm}^{-1}$  vibração CH de grupos metila de metoxila,  $1737\text{ cm}^{-1}$  estiramento C=O,  $1666\text{ cm}^{-1}$  e  $1550\text{ cm}^{-1}$  vibração de anéis aromáticos.

A Figura 4.3 apresenta imagens obtidas por MEV da lignina extraída da fibra de caju. A lignina apresenta uma superfície compacta, rígida, irregular e arenosa.

**Figura 4.3** Fotomicrografias obtidas por MEV da lignina extraída durante o pré-tratamento da fibra de caju com peróxido de hidrogênio alcalino 4,3% v/v, pH 11,5, 5% de FB, 35 °C, 250 rpm por 6 h. (A) ampliação de 100x e barra de escala de 500 µm; (B) ampliação de 500x e barra de escala de 100 µm; (C) ampliação de 2000x e barra de escala de 30 µm; e (D) ampliação de 10 000x e barra de escala de 5 µm.



#### 4.2 Análise comparativa da SSF realizada com FC-PHA seco e úmido

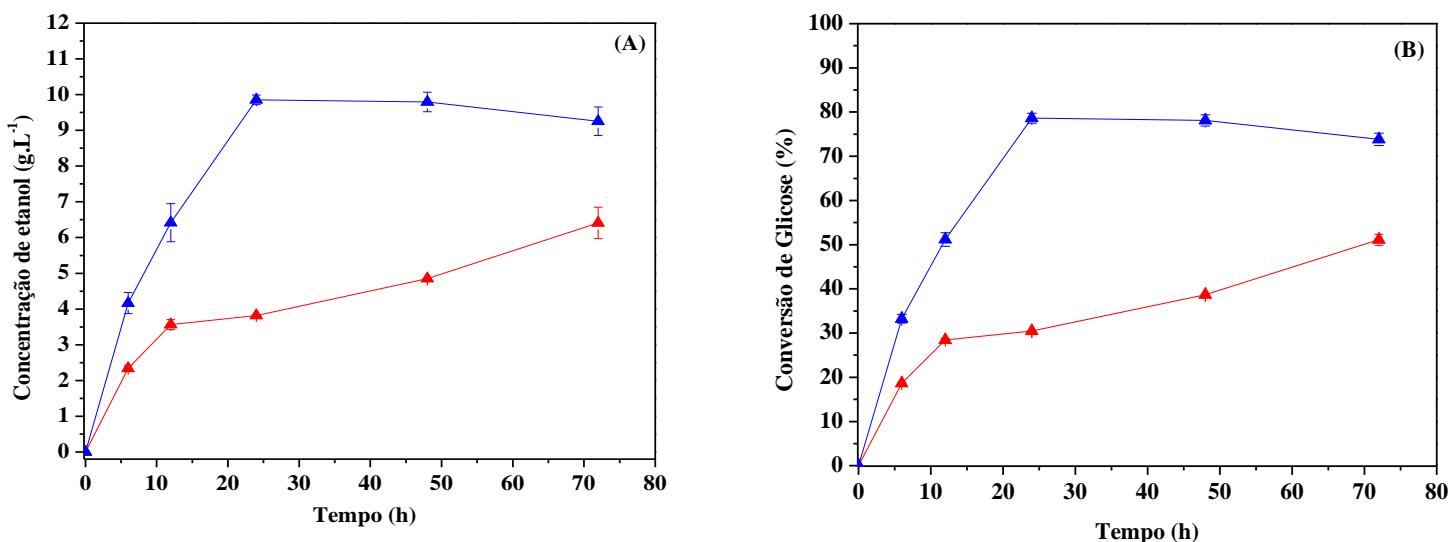
Este estudo foi realizado visando uma economia no processo de produção de etanol de segunda geração, com a eliminação da etapa de secagem que ocorre após o pré-tratamento, diminuindo o tempo do processo.

Inicialmente, calculou-se o teor de umidade da fibra de caju após o pré-tratamento. FC-PHA apresentou teor de umidade de 90,72%, sendo este um elevado

teor, indicando que se trata de um material bastante higroscópico, o que poderá dificultar a transferência de massa no processo SSF. Portanto ao se realizar o processo SSF com a fibra de caju úmida foi possível uma adição de matéria-prima de somente 50% ao meio reacional, o que de acordo com o teor de umidade obtido, corresponde a uma SSF utilizando 5% m/v em fibra seca.

A Figura 4.4 apresenta os resultados do processo de SSF utilizando os FC-PHA úmido e seco, utilizando a mesma base de seca.

**Figura 4.4** Perfil da concentração de etanol (A) e da Conversão de glicose (B) com o tempo para o processo de sacarificação e fermentação simultânea conduzida em agitador orbital a 45 °C, 150 rpm por 72 horas, utilizando 30 FPU.g<sub>FC-PHA</sub><sup>-1</sup>da enzima Cellic Ctec 2; 5 g.L<sup>-1</sup> de inóculo (*K. marxianus* ATCC36907). (▲) 5% fibraseca e (▲) 50% fibra úmida.



De acordo com a Figura 4.4 (A), pode-se perceber uma diferença na produção de etanol quando comparados à utilização da fibra pré-tratada úmida e seca. Os perfis apresentados na Figura 4.4 (A e B) mostram que ao se realizar o bioprocesso com o substrato úmido, a produção de etanol foi menor quando comparada à produção com fibra seca, possivelmente devido ao elevado teor higroscópico evidenciado e relatado na

literatura por CORREIA *et al.* (2013) e no que se refere à conversão de glicose, o processo utilizando fibra seca atingiu 80% de conversão após 24 h (Figura 4.4B). Este comportamento pode também ser explicado pelo fato de na fibra úmida haver uma maior dificuldade de contato entre a enzima e a celulose presente na estrutura da fibra, devido à transferência de massa e efeitos difusionais reduzidos pela maior viscosidade presente no meio reacional. A produção de etanol foi maior quando se utilizou o FC-PHA seco no processo de SSF, obtendo  $9,85 \pm 0,13 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol após 24 horas de processo, já no processo utilizando fibra de caju úmida a maior produção obtida foi  $6,40 \pm 0,43 \text{ g.L}^{-1}$  após 72 h de processo.

Em vários estudos relatados na literatura utiliza-se o material seco para a produção de etanol por SSF, como relatado por (PESSANI *et al.*, 2011; YEH *et al.*, 2016; LEE E JIN, 2017). Portanto, nos processos de SSF desenvolvidos no presente trabalho foi utilizada como matéria-prima a fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino e seca após etapa de lavagem.

Assim como no estudo comparativo de utilização do material úmido ou seco, para a realização dos experimentos posteriores no presente trabalho, realizou-se um teste para verificar se há inibição pelo etanol no processo de crescimento de *K. marxianus* ATCC36907.

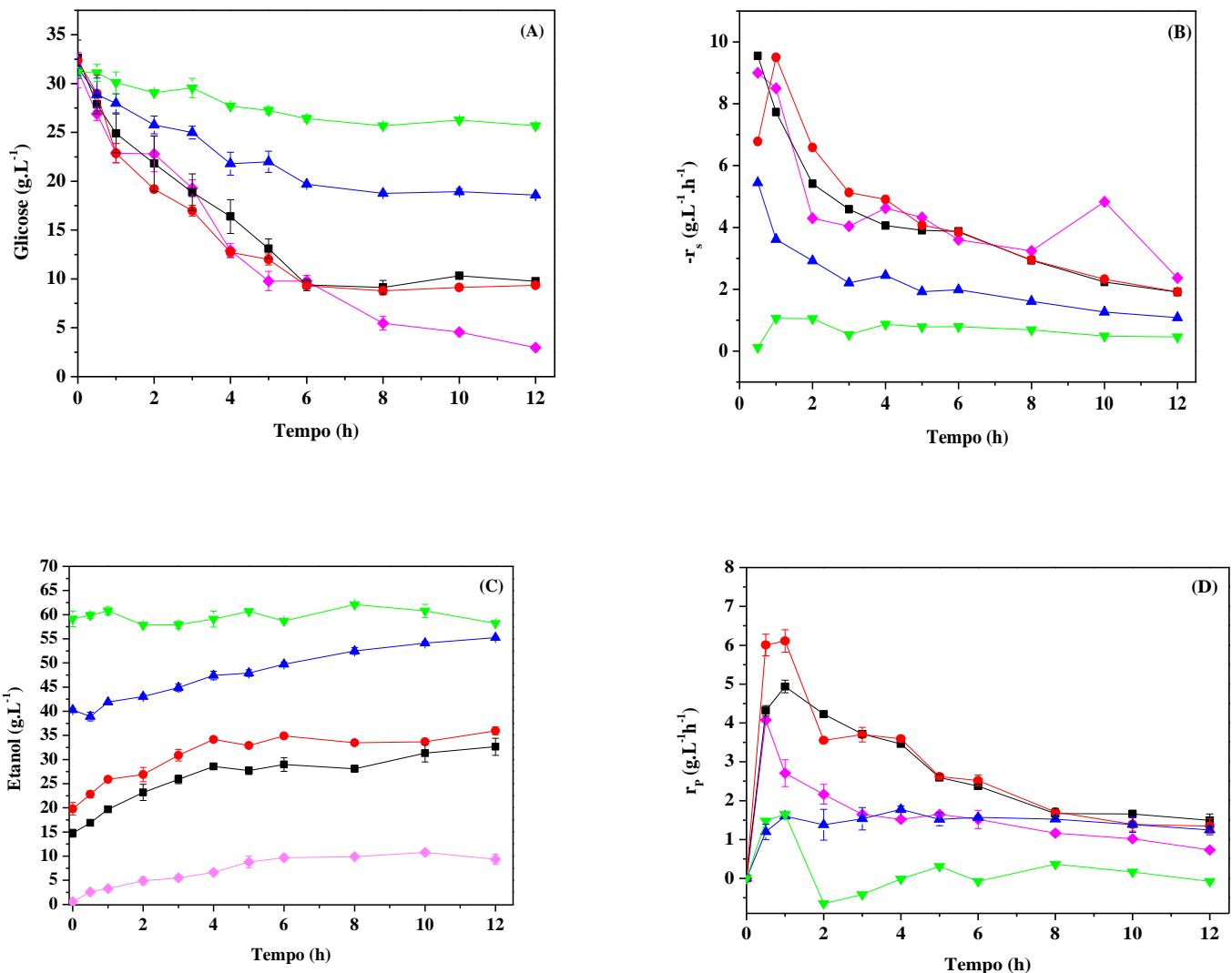
Esse estudo teve como principal objetivo analisar o efeito inibitório do etanol ao microrganismo *K. marxianus* ATCC36907, avaliando as concentrações  $15 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $20 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $40 \text{ g.L}^{-1}$  e  $60 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol e  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose no início do processo. A taxa de consumo de glicose, Figura 4.5 (B), e a taxa de produção de etanol, Figura 4.5 (D), foram parâmetros utilizados como resposta nesta etapa do estudo. Perfis de concentração de glicose e etanol em função do tempo encontram-se apresentados nas Figuras 4.5 (A e B) e o perfil de conversão de glicose na Figura 4.5 (E).

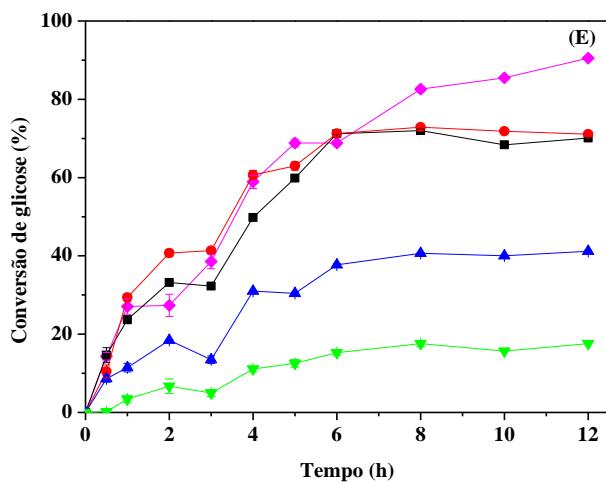
No ensaio utilizado como controle do processo (sem adição de etanol em 0 h) observa-se uma elevada conversão da glicose (90%) em 12 h de processo (Figura 4.5E). Os resultados mostram que para concentrações de etanol de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  e  $20 \text{ g.L}^{-1}$  houve um rápido consumo de glicose nas primeiras 6 h e consequentemente um aumento na taxa de produção de etanol. No entanto, para os ensaios contendo  $40 \text{ g.L}^{-1}$  e  $60 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol no meio houve um retardamento na conversão de glicose e baixa produção de etanol. No que se refere à concentração de etanol durante o tempo, foi possível concluir

---

que quanto maior concentração inicial de etanol no meio, menor é sua taxa de produção, e para concentrações iniciais de etanol de  $40 \text{ g.L}^{-1}$  e  $60 \text{ g.L}^{-1}$  há inibição, observando uma taxa de consumo de glicose ( $-r_s = dS/dt$ ) aproximadamente igual a zero (Figura 4.5B).

**Figura 4.5** Perfis de concentração de glicose (A), taxa de consumo de glicose (B), concentração de etanol (C), taxa de produção de etanol (D) e conversão de glicose, realizados com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose inicial,  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de inóculo (*K. marxianus* ATCC 36907) a  $45^\circ\text{C}$ , 150 rpm por 12 horas. Foram feitas adição de  $0 \text{ g.L}^{-1}$  (Controle) ( $\blacklozenge$ ),  $15 \text{ g.L}^{-1}$  ( $\blacksquare$ ),  $20 \text{ g.L}^{-1}$  ( $\bullet$ ),  $40 \text{ g.L}^{-1}$  ( $\blacktriangle$ ) e  $60 \text{ g.L}^{-1}$  ( $\blacktriangledown$ ) de etanol no início do processo.





No ensaio controle e adicionando 15 g.L<sup>-1</sup>e 20 g.L<sup>-1</sup> de etanol, as taxas de consumo de glicose foram diferentes de zero até 6 h de processo, e foram diminuindo ao aumentar a concentração de etanol inicial do meio de cultivo. Já nos ensaios utilizando uma concentração inicial de 40 e 60 g.L<sup>-1</sup> de etanol inicial, essas taxas caíram, com valores próximos a zero.

A Figura 4.5D mostra que no processo com 60 g.L<sup>-1</sup>, a taxa de produção de etanol foi praticamente nula, portanto conclui-se que 60 g.L<sup>-1</sup> de etanol inicial e 30 g.L<sup>-1</sup> de glicose cedida ao meio como substrato para crescimento e metabolismo da *K. marxianus* ATCC 36907 tem-se uma concentração crítica, onde a partir da qual não se observa o consumo de glicose. Estudo de inibição por etanol vem sendo fonte de estudo na literatura, ajudando na interpretação de resultados obtidos em processos fermentativos. JIN *et al.* (2012) relatou em seus estudos que a inibição por etanol possui potencial na limitação da taxa de hidrólise enzimática e, consequentemente, afeta na produtividade do processo.

### 4.3. Efeito da carga de sólidos na SSF

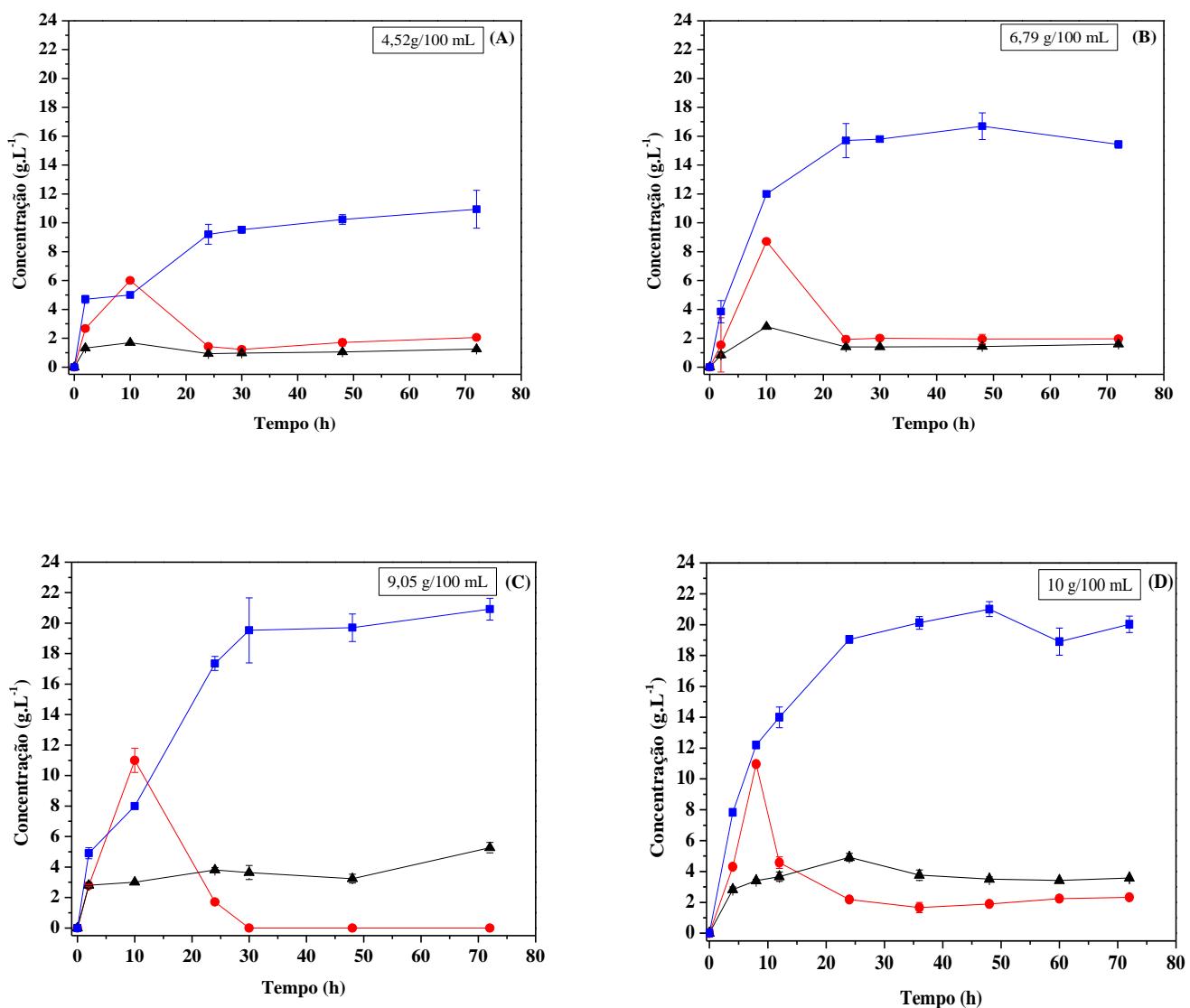
Foi realizada a avaliação da carga de fibra de caju pré-tratada no processo de SSF, visando uma maior produção de etanol. Nas Figuras 4.6 (A-D) são apresentados os perfis de concentração de glicose, xilose e etanol ao longo do tempo utilizando cargas de 4,52; 6,79; 9,05 e 10,0 g FC-PHA/100 mL meio. Em todos os experimentos, a glicose produzida foi convertida em etanol, com uma pequena acumulação nas primeiras horas de processo, isso implica em uma fase de adaptação da levedura ao meio em que foi inserida. Após as primeiras 24 h de processo, observa-se que a levedura metabolizou a glicose em concomitância disponibilização desse açúcar pela hidrólise enzimática da celulose oferecida ao processo (vide perfils Figuras 4.6 A-D). PESSANI *et al.* (2011) estudaram a produção de etanol por SSF e seus resultados também mostraram um acúmulo de glicose nas primeiras horas e após 24 h pode-se considerar que toda a glicose foi consumida.

Com o aumento da carga de sólidos houve uma maior disponibilidades dos açúcares e consequentemente, uma maior produção de etanol. No entanto, ensaios utilizando cargas maiores de sólidos não foram possíveis ser realizados, devido ao entumescimento da fibra de caju pré-tratada que aumenta consideravelmente a viscosidade do meio, dificultando o processo de transferência de massa e impossibilitando a realização dos experimentos em agitador orbital.

Em relação à concentração de xilose, observa-se que houve um acúmulo do açúcar durante todas as fermentações, indicando que não houve consumo de xilose durante o processo. Resultados semelhantes foram também obtido por outros autores (LANE E MORRISSEY, 2010; LEE *et al.*, 2013). ALBUQUERQUE *et al.* (2015) estudaram o metabolismo da *K. marxianus* frente ao açucar xilose e concluíram que algumas cepas de *K. marxianus*, incluindo a cepa utilizada no presente estudo: *K. marxianus* ATCC 36907, apresentam o metabolismo de xilose reprimido na presença de glicose.

---

**Figura 4.6** Perfis de concentrações de glicose (●), xirole (▲) e etanol (■) com o tempo para o processo de sacarificação e fermentação simultânea conduzido em agitador orbital a 150 rpm, 45 °C, utilizando 30 FPU/g<sub>FC-PHA</sub> (Cellic Ctec 2), 5 g.L<sup>-1</sup> de inóculo (*K. marxianus* ATCC36907), por 72 horas usando diferentes cargas de sólidos: 4,52 (A), 6,79 (B), 9,05 (C) e 10,0 (D) g<sub>FC-PHA</sub>/100 mL meio.



As maiores concentrações de etanol obtidas para cada carga de sólidos foram 10,9; 15,4; 20,9 e 21,0 g.L<sup>-1</sup> correspondendo a 96,27; 90,54; 92,20 e 83,84% do rendimento teórico (Tabela 4.2), com base no teor de celulose presente nos substratos adicionados ao meio 4,52, 6,79, 9,05 e 10,0 g<sub>FC-PHA</sub>/100 mL de meio. Os resultados apresentados mostram que uma menor carga de sólidos favorece no rendimento do processo, pois se tem uma melhor interação entre enzima e substrato quando se trabalha com uma baixa carga. Por outro lado, uma maior carga de fibra permite a obtenção de uma maior produção de etanol, no que se refere à concentração (g.L<sup>-1</sup>), isto ocorre devido haver no meio uma maior quantidade de celulose a ser hidrolisada em glicose porém a maior viscosidade apresentada pelo meio reacional, dificulta o acesso da enzima ao substrato e com isso diminui o rendimento no processo. Uma maior concentração de etanol também favorece a etapa posterior do processo, a destilação. A maior concentração de etanol (21 g.L<sup>-1</sup>) foi obtida na carga de 10% m/v em 48 horas de processo, correspondendo a uma maior produtividade (0,43 g.L.h<sup>-1</sup>) quando comparadas todas as cargas estudadas.

**Tabela 4.2** Efeito da carga inicial de sólido nos parâmetros de produção de etanol por SSF a 45 °C, utilizando 30 FPU/g<sub>FC-PHA</sub> (Cellic Ctec 2), 5 g.L<sup>-1</sup> de inóculo (*K. marxianus* ATCC36907), por 72 horas. Valores com as mesmas letras, em sobreescrito, e na mesma coluna, não são significantemente diferentes um do outro com um nível de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ).

Carga de fibra (g <sub>FC-PHA</sub> / 100 mL)	Concentração Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento (g <sub>Etanol</sub> /g <sub>celulose</sub> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Eficiência n(%)
<b>4,52</b>	10,9 ± 1,31 <sup>a</sup>	0,54	0,15 <sup>ii</sup>	96,27 <sup>a</sup>
<b>6,79</b>	15,4 ± 0,26 <sup>b</sup>	0,51	0,32 <sup>i</sup>	90,54 <sup>b</sup>
<b>9,05</b>	20,9 ± 0,72 <sup>c</sup>	0,52	0,29 <sup>ii</sup>	92,20 <sup>b</sup>
<b>10,00</b>	21,0 ± 0,48 <sup>c</sup>	0,46	0,43 <sup>i</sup>	83,84 <sup>c</sup>

i) Produtividade determinada com t = 48 h.

ii) Produtividade determinada com t = 72 h.

Segundo LI *et al.* (2014) uma carga sólida de 10% m/v não representa uma carga pequena para a produção de etanol, uma vez que uma carga elevada de sólidos em SSF reduz a capacidade hidrolítica da celulase. VARGA *et al.* (2004), concluiram em seu trabalho que devido à alta viscosidade dos substratos lignocelulósicos, é difícil operar com cargas de sólidos superiores a aproximadamente 10% m/v. Os resultados obtidos pelos autores corroboram com o obtido no presente estudo.

BARROS *et al.* (2017) estudou o processo de produção de etanol utilizando 10 % m/v de fibra de caju pré-tratada com ácido-base e obteve rendimento de 98,41%, sendo este um bom rendimento de processo. O elevado rendimento de etanol foi obtido devido ao pré-tratamento utilizado no trabalho, pois disponibilizou ao processo fermentativo 74% de celulose para conversão em glicose, percentual superior quando comparado ao percentual de 44% de celulose presente na fibra de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino.

De acordo com os dados relatados pela Tabela 4.2, observa-se que não houve uma diferença significativa na concentração de etanol utilizando 9,05 e 10% de fibra no meio, porém o ensaio com 10% obteve-se uma de concentração de 21,0 g.L<sup>-1</sup> em um menor tempo devido a maior disponibilidade de celulose no meio. No entanto, apresenta-se uma menor eficiência no processo, reduzindo de 92,20% para 83,84%, atribuído ao acúmulo de glicose no meio que não foi metabolizada. Dados da literatura relatam a existência da inibição do processo de sacarificação e fermentação simultâneas em batelada devido à elevada concentração de substrato que pode afetar simultaneamente o metabolismo da levedura e a hidrólise enzimática (RUDOLF *et al.*, 2005; SURYAWATI *et al.*, 2008). Visando estudos posteriores de diferentes estratégias de fermentação, utilizou-se a carga inicial de sólidos de 10FC-PHA/100 mL de meio nas próximas etapas.

#### **4.4 Estudo do efeito da temperatura no processo de SSF**

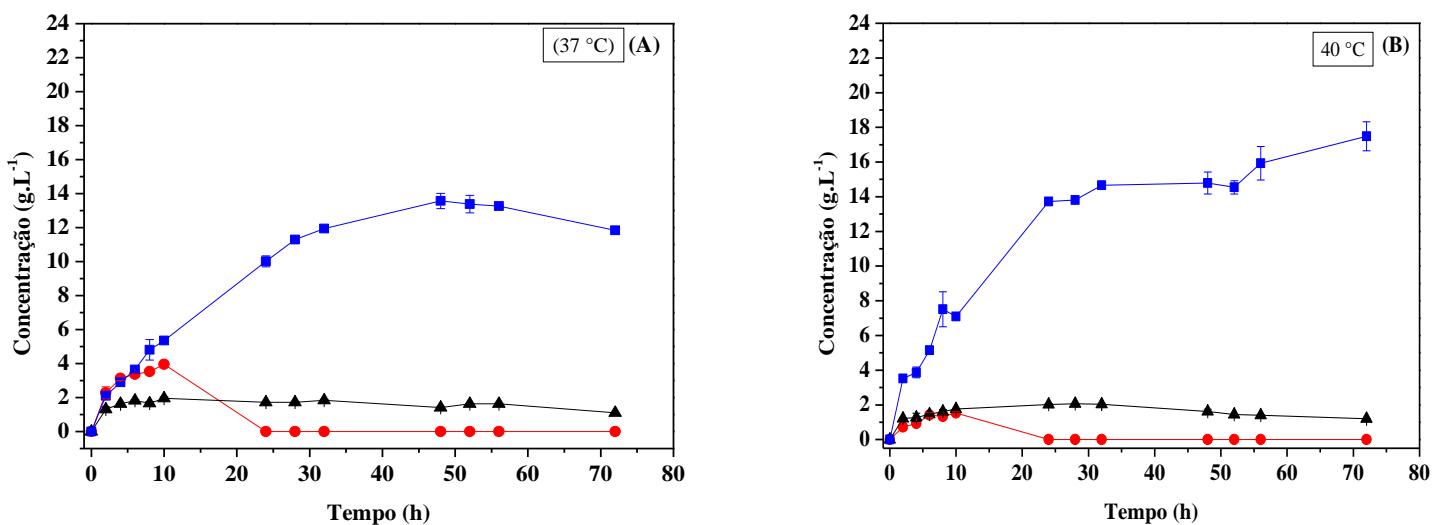
Considerando que a sacarificação tem uma temperatura ótima em torno de 50 °C e que a maioria das leveduras tem uma temperatura ótima variando de 30 °C a 37 °C (ALFANI *et al.*, 2000), o estudo do efeito da temperatura busca uma melhor condição de operação da SSF. Nesse contexto, a levedura *K. marxianus* ATCC 36907 vem

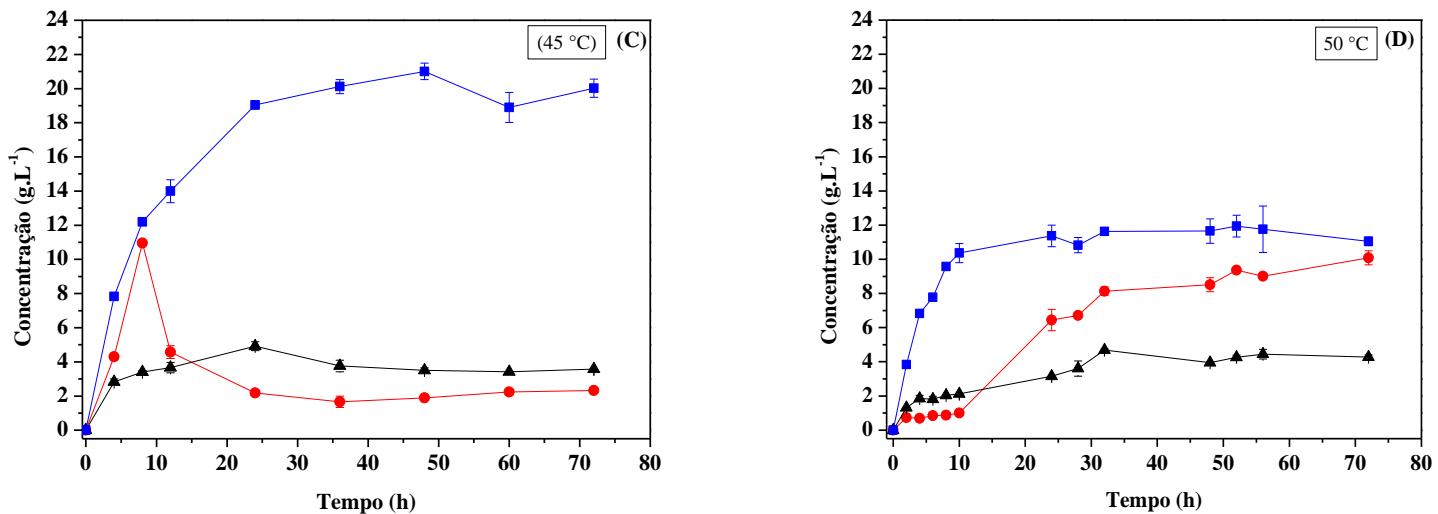
---

ganhando bastante importância neste tipo de processo, devido à sua capacidade de crescimento e fermentação a temperaturas acima de 40 °C, por tratar-se de um microrganismo termotolerante, próximo à temperatura ótima de hidrólise enzimática (TOMÁS-PEJÓ *et al.*, 2009; LANE E MORYSSEY, 2010).

Os perfis dos processos a diferentes temperaturas (37, 40, 45 e 50 °C) estão apresentados na Figura 4.7 (A-D). Observa-se que na temperatura mais baixa, houve uma menor produção de glicose, uma vez que as enzimas celulolíticas apresentam maiores taxas de catálise a temperaturas mais elevadas, entre 45 °C e 50 °C. Nas temperaturas de 37 °C, 40 °C e 45 °C avaliadas, os resultados indicaram que, após 30 horas de fermentação, a concentração de glicose foi aproximadamente zero e não houve aumento da concentração de etanol após esse período, inferior a 2g.L<sup>-1</sup>, indicando que de a maior parte de glicose formada foi metabolizada pela levedura em etanol nas primeiras 30 h.

**Figura 4.7** Perfis de concentrações de glicose (●), xirolese (▲) e etanol (■) com o tempo para o processo de sacarificação e fermentação simultânea conduzido em agitador orbital a 150 rpm por 72 horas, utilizando 30 FPU celulase /gFC-PHA (Cellic Ctec 2), *K. marxianus* ATCC36907, 10,0 gFC-PHA/100 mL, a diferentes temperaturas: (A) 37 °C, (B) 40 °C, (C) 45 °C e (D) 50 °C.





Nas Figuras 4.7A e B observa-se uma menor concentração de glicose nas primeiras horas de ensaio, correspondendo a uma menor taxa de conversão em açúcares por parte da enzima, logo verifica-se que não há acúmulo de glicose nas primeiras horas de SSF. As temperaturas (37 °C e 40 °C) favorecem ao crescimento celular e a adaptação é mais rápida quando comparada a temperaturas maiores, em contra-partida há um comprometimento no que se refere à atividade enzimática, afetando a conversão em açúcares, o que pode ser concluído ao verificar a eficiência do processo em temperaturas ideais para atividade enzimática. Ao aumentar a temperatura de 37 °C para 45 °C, a eficiência do processo aumentou consideravelmente de 69,80% para 83,84%, respectivamente (Tabela 4.3), pois trata-se de uma temperatura favorável tanto para a ação de enzimas quanto para o metabolismo da *K. marxianus* ATCC36907.

Quando os experimentos foram conduzidos a 50 °C (Figura 4.7D) observou-se um menor rendimento da produção de etanol (52,78%), podendo ser uma temperatura que afetou no metabolismo da levedura durante o processo pelo acúmulo de açúcar observado (LIMTONG *et al.*, 2007; WATANABE *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2013)

**Tabela 4. 3** Efeito de diferentes temperaturas nos parâmetros de produção de etanol por SSF utilizando 10,0 g<sub>GFC-PHA</sub>/100 mL meio, 30 FPU/g<sub>GFC-PHA</sub> (Cellic Ctec 2), 5 g.L<sup>-1</sup> de inóculo (*K. marxianus* ATCC36907), por 72 horas. Valores com as mesmas letras, em sobrescrito, e na mesma coluna, não são significantemente diferentes um do outro com um nível de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ).

Temperatura (°C)	Concentração Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento (g <sub>Etanol</sub> /g <sub>celulose</sub> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Eficiência η (%)
37	15,8 ±0,01 <sup>a</sup>	0,39	0,23 <sup>i</sup>	69,80 <sup>a</sup>
40	16,9 ±0,01 <sup>a</sup>	0,43	0,22 <sup>iii</sup>	75,63 <sup>b</sup>
45	21,0 ±0,48 <sup>b</sup>	0,46	0,43 <sup>i</sup>	83,84 <sup>c</sup>
50	11,9 ±0,64 <sup>c</sup>	0,29	0,22 <sup>ii</sup>	52,78 <sup>d</sup>

i) Produtividade determinada com  $t = 48$  h.

ii) Produtividade determinada com  $t = 54$  h

iii) Produtividade determinada com  $t = 72$  h

RODRIGUES *et al.* (2016) avaliaram o efeito da temperatura (30, 35, 40, 45 e 50 °C) na produção de etanol utilizando glicose PA e *K. marxianus* ATCC36907. Os autores observaram que os perfis de produção de etanol foram semelhantes para todas as temperaturas estudadas, indicando que a levedura termotolerante é capaz de produzir etanol (23,65 g.L<sup>-1</sup>) a 50 °C em 4h de fermentação em processo de fermentação e hidrólise separados (SHF), diferente do que foi obtido no presente estudo realizado em SSF.

De acordo com os resultados expressos na Figura 4.7 A-D e na Tabela 4.3, conclui-se que melhores resultados foram obtidos com a temperatura de 45 °C (Figura 4.8C) com rendimento no processo de 83,84%. Segundo YANASE *et al.* (2010), operar um processo fermentativo a 45 °C apresentam vantagens, como redução da possibilidade de contaminação por microrganismos mesófilos e também o aumento da atividade de enzimas hidrolíticas. Logo, as próximas etapas do presente trabalho foram realizadas a 45 °C.

Na literatura, estudos relatam a existência da inibição do processo de sacarificação e fermentação simultâneas em batelada devido à elevada concentração de substrato que pode afetar simultaneamente o metabolismo da levedura e a hidrólise enzimática (RUDOLF *et al.*, 2005; SURYAWATI *et al.*, 2008). Portanto, assim como BARROS *et al.* (2017) e MORENO *et al.* (2013) seguiu-se os estudos de produção de etanol com adição de uma etapa de pré-sacarificação (PSSF), visando minimizar os efeitos da viscosidade no meio reacional, permitindo uma melhor interação entre a enzima e o substrato, favorecendo o processo de hidrólise enzimática.

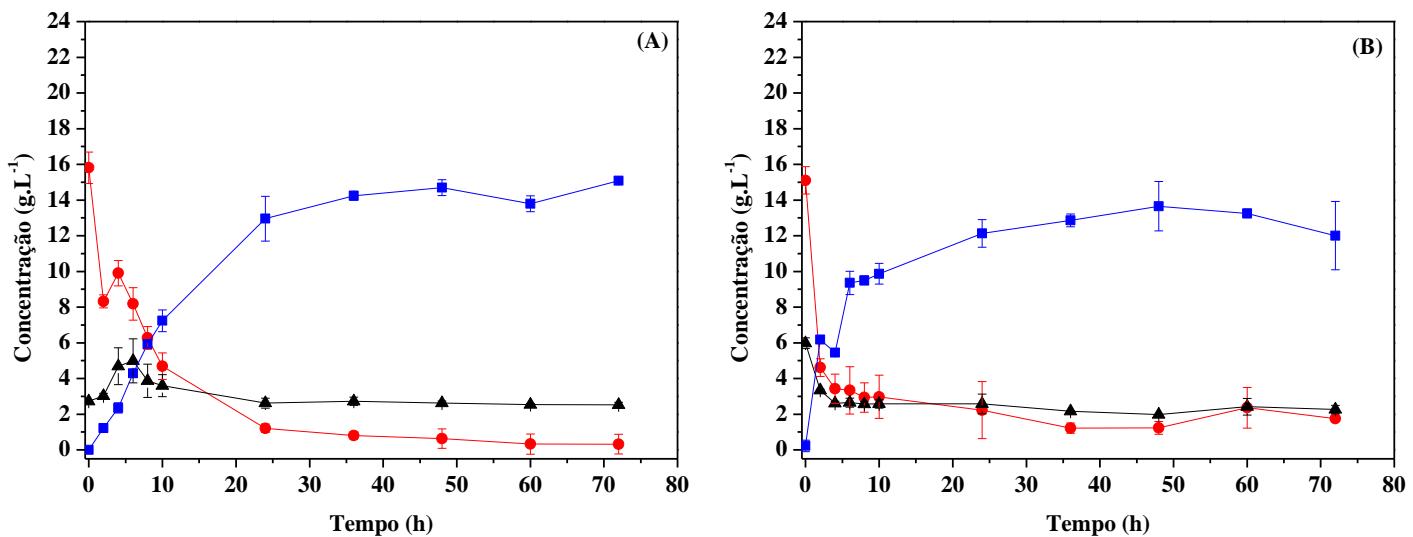
#### **4.5 Adição da etapa de pré-sacarificação no processo SSF (PSSF)**

Baseado nos resultados da SSF obtidos nos ensaios anteriores de cargas de sólido e temperatura e na dificuldade de se trabalhar com uma elevada concentração de substrato devido à alta viscosidade impressa pelo FC-PHA no meio fermentativo, foi então realizado um estudo do efeito da pré-sacarificação, a diferentes tempos: 12 h e 24 h no processo de SSF (PSSF) visando uma maior produção de etanol, uma diminuição na viscosidade do meio, facilitando assim a transferência de massa durante a fermentação. Além disso, na etapa de adição de inóculo no processo de PSSF, o meio reacional já apresenta uma considerável quantidade de açúcares, o que pode vir a melhorar o metabolismo da levedura nas primeiras horas do processo.(GARCÍA *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2017).Segundo MANZANARES *et al.* (2011) o objetivo de uma pré-sacarificação é hidrolisar parcialmente a celulose e hemicelulose em açúcares antes da adição da levedura, aumentando, com isso, a taxa de produção de etanol durante a fase inicial da SSF.

Nas Figuras 4.8A e 4.8B são apresentados os perfis de concentração de glicose, xilose e etanol, para o processo de PSSF com 12 h (Figura 4.8A) e 24 h (Figura 4.8B) realizada a 45 °C e com 10,0 gFC-PHA/100 mL de meio, sendo estas as melhores condições obtidas nos estudos de carga de sólidos e temperatura, anteriormente discutidos.

---

**Figura 4.8** Perfis de concentrações de glicose (●), xilose (▲) e etanol (■) com o tempo para o processo PSSF conduzido em agitador orbital a 150 rpm, 45 °C, utilizando 30 FPU celulase /gFC-AHP (Cellic Ctec 2), *K. marxianus* ATCC36907, 10,0 gFC-PHA/100 mL, por 72 horas, 45 °C. PSSF 12 horas (A) e PSSF 24 horas (B). O tempo de 0 h representa o momento em que a levedura é adicionada ao meio, após o tempo de pré-hidrólise.



A realização da PSSF com 12 h (Figura 4.8A) e 24 h (Figura 4.8B) disponibilizou 15,81 g.L<sup>-1</sup> e 15,10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, respectivamente. No entanto, o processo de PSSF não incrementou a produção de etanol durante o processo. A produção máxima obtida em etanol para as pré-hidrólise foram: 15,08 g.L<sup>-1</sup> (PSSF 12 h) e 13,65 g.L<sup>-1</sup> (PSSF 24 h), correspondendo a rendimentos de 66,54% e 60,23%, respectivamente. Portanto, a adição da etapa de pré-sacarificação influenciou negativamente na produção de etanol, diminuindo assim o rendimento. A baixa produção de açúcar após o tempo de pré-hidrólise pode ser explicada por uma possível inibição pelo substrato sofrida pela enzima no meio reacional, a elevada viscosidade apresentada pelo meio nas primeiras horas também influenciou negativamente na ação enzimática.

ÖGREN *et al* (2007) estudaram processos PSSF para a produção de etanol por palha de milho, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* comercial. Os autores realizaram estudos com diferentes complexos enzimáticos e utilizaram a temperatura de hidrólise enzimática ideal para cada um dos complexos, em torno de 48 °C e 55 °C. O tempo de

pré-sacarificação foi de 16 h e depois desse tempo, a temperatura foi diminuída para 35°C para o início do processo SSF. Os resultados mostraram que, apesar de ter apresentado maior produtividade (medida com 24 horas para todos os processos), os processos PSSF não proporcionaram uma melhora nas produções máximas de etanol em relação aos processos SSF. Os resultados desses autores estão de acordo com os resultados obtidos no presente estudo.

Segundo BARROS *et al.* (2017) um dos principais motivos para explicar o efeito negativo da adição da etapa de sacarificação antes da inoculação (PSSF), é o fato das leveduras sofrerem um efeito de regulação metabólica chamado de Efeito-Crabtree ou Contre-effect Pasteur. Para leveduras que sofrem a ação desse efeito (Crabtree-positivas), quando estão submetidas a elevadas concentrações de substrato, ocorre a repressão do efeito Pasteur (inibição da atividade fermentativa pela respiração), favorecendo, desse modo, a fermentação alcoólica (DEKEN, 1966) e segundo FONSECA *et al.* (2008) as *K. marxianus* são classificadas como Crabtree negativas, pois na presença de elevadas concentrações de substrato, o efeito Pasteur é favorecido e a atividade fermentativa é reprimida pela respiração. Essa teoria, apesar de bastante interessante, não se aplica ao processo em estudo, pois não foram obtidas elevadas concentrações de glicose após a PSSF para que seja identificado tal efeito.

DEVANTIER *et al.* (2005) relataram que na produção de etanol, a etapa de pré-sacarificação da biomassa é realizada com o objetivo de otimizar a fermentação, mas que essa etapa acaba sendo uma etapa não desejada por diminuir a simplicidade do processo como um todo e aumentar o risco de contaminação em processos industriais. Logo se ressalta a preferência por processo de SSF sem a adição desta etapa, haja vista que esses apresentaram resultados satisfatórios frente aos processos PSSF, o tempo de operação é menor, resultando em um menor custo operacional.

O efeito negativo da adição da etapa de pré-sacarificação na produção de etanol concordou também com resultados na literatura obtidos por LINDE *et al.* (2007) e BARROS *et al.* (2017), os autores afirmaram que uma das razões para esse efeito negativo deve-se ao fato de uma possível inibição do substrato sofrida pela enzima. LIU *et al.* (2010) afirmaram que uma concentração inicial de substrato elevada pode interferir negativamente na hidrólise da celulose e que se faz necessário o uso de estratégias de alimentação de substrato de forma a evitar inibições no processo. Portanto

---

nas próximas etapas do presente trabalho foram realizados processos de produção de etanol com alimentação de substrato ao longo do processo visando uma maior produção de etanol e uma redução nas inibições até então identificadas no processo.

#### **4.6 Avaliação de estratégias de alimentação da fibra de caju pré-tratada no processo de sacarificação e fermentação simultâneas**

Buscando um aumento no rendimento do processo e uma economia, no que se refere ao volume do complexo enzimático utilizado nos estudos anteriores, estudou-se o processo de sacarificação e fermentação simultânea por batelada alimentada, avaliando quatro estratégias de alimentação apresentadas na Tabela 3.1. Para a realização desse estudo de batelada alimentada, os ensaios foram iniciados com apenas 5% (m/v) e atingiram carga final de 10% (m/v) em sólidos após as alimentações.

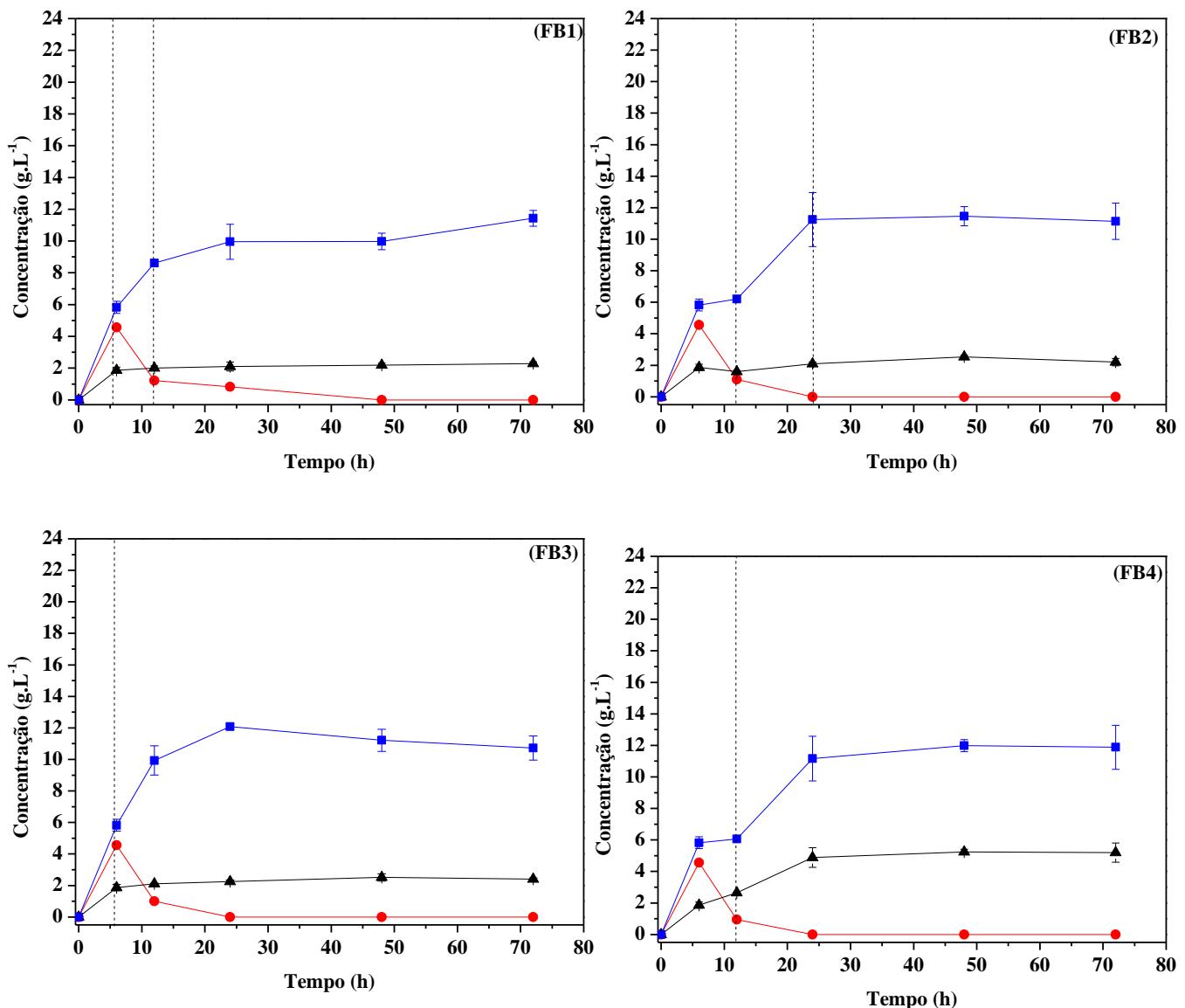
A alimentação gradual de substrato pode ser uma alternativa para aumentar a concentração de etanol e ao mesmo tempo eliminar problemas de inibição relacionados a altas concentrações de substrato em processos de SSF realizados em batelada (PAULOVÁ *et al.*, 2014; HOYER *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2010).

Na Figura 4.9 são apresentados os perfis de concentração de glicose, xilose e etanol para as estratégias de alimentações iniciadas com 5% de carga de fibra (FC-PHA) e terminadas com carga final de 10%. O Processo de alimentação foi realizado somente com adição de fibra pré-tratada, a carga enzimática foi adicionada no início do processo com base na carga de substrato inicial.

Os gráficos apresentados na Figura 4.9 mostram um perfil de glicose semelhante para todas as estratégias estudadas, ao final do processo tem-se o consumo total de glicose produzida, no entanto, baseando-se na concentração final de etanol, conclui-se que nem toda a celulose adicionada ao processo foi convertida em glicose pela enzima adicionada no inicio do processo.

---

**Figura 4.9** Perfis de concentração de glicose (●), xilose (▲) e etanol (■) com o tempo, para os processos de sacarificação e fermentação simultânea por batelada alimentada, com diferentes estratégias de alimentação (FB1, FB2, FB3 e FB4). Os processos foram conduzidos a 45 °C, 150 rpm, 72 h com 30 FPU/ g<sub>FC-PHA</sub> inicial. As linhas tracejadas correspondem aos pontos de alimentações da fibra FC-PHA.



À medida que se adicionou a fibra pré-tratada durante o processo, percebe-se um aumento na produção de etanol, no entanto a produção de etanol manteve-se estável após 24 h e, portanto foi considerada baixa diante da eficiência do processo. A carga de enzima adicionada ao processo foi de 30 FPU/g<sub>FC-PHA</sub> inicial, ou seja, em todas a alimentações, a carga de enzima foi reduzida pela metade quando comparada a carga enzimática utilizada nos ensaios em batelada, pois nas alimentações citadas a carga inicial foi 5% (m/v) e portanto a enzima foi adicionada com base nessa massa. Devido à baixa carga de enzima adicionada ao meio, houve uma baixa conversão da celulose em glicose.

A produção de etanol mostrou-se estável após 24 h de processo em todos os ensaios, apresentando-se perfis bastante semelhantes. A máxima produção de etanol ( $12,07 \pm 0,17 \text{ g.L}^{-1}$ ) foi obtida em 24 h no ensaio FB3, em que se inicia o processo com carga de 5% (m/v) FC-PHA e decorridos 6 h foram adicionados 5% (m/v) FC-PHA. Portanto, conclui-se que durante esse processo a enzima adicionada em 0 h de processo hidrolisou mais celulose em glicose e logo o microrganismo metabolizou o substrato em etanol. Provavelmente, na alimentação com apenas 6 h, tem-se pouco tempo para que ocorra elevada adsorção de enzimas na matriz da fibra e assim têm-se mais enzimas livres no meio, resultando em uma maior taxa de conversão que podem atuar no substrato adicionado.

A Tabela 4.4 apresenta os resultados de produção de etanol, como:  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{celulose}}$ , produtividade e eficiência para as estratégias de alimentação avaliadas.

As estratégias de alimentação (FB1, FB2, FB3 e FB4) apresentaram resultados bastante semelhantes no que se refere a produção de etanol em  $\text{g.L}^{-1}$ . No entanto, as estratégias FB3 e FB4, em que foram alimentados 5% (m/v) de FC-PHA após 6 horas e 12 horas, respectivamente, apresentaram produção em torno de  $12 \text{ g.L}^{-1}$  e eficiência de 48% e, portanto não apresentaram diferença significativa entre si a um nível de confiança de 95%, diferindo significativamente na eficiência do processo das fermentações FB1 e FB2.

Ao comparar o processo de produção em batelada sem alimentação com carga de fibra de 10% (Figura 4.6 e Tabela 4.2) e as alimentações até então estudadas, tem-se que o processo de alimentação não favoreceu para uma maior produção de etanol, correspondendo a uma redução de 83,84% para 48% na eficiência no processo, podendo

---

ser resultado da alimentação somente com fibra e a maior necessidade de enzimas hidrolíticas.

**Tabela 4. 4** Efeito das estratégias de alimentação nos parâmetros de produção de etanol por SSF utilizando FC-PHA como substrato, a 45 °C, 150 rpm por 72 horas. Valores com as mesmas letras, em sobreescrito, e na mesma coluna, não são significantemente diferentes um do outro com um nível de confiança de 95 % ( $p<0,05$ ).

Estratégias de alimentação	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento (g <sub>Etanol</sub> /g <sub>celulose</sub> )	Produtividade (g.L <sup>-1.h</sup> )	Eficiência η (%)
<b>FB1</b>	11,40±0,50 <sup>a</sup>	0,26	0,15 <sup>i</sup>	45,51 <sup>a</sup>
<b>FB2</b>	11,45±0,60 <sup>a</sup>	0,26	0,24 <sup>ii</sup>	45,71 <sup>a</sup>
<b>FB3</b>	12,07±0,17 <sup>a</sup>	0,27	0,50 <sup>ii</sup>	48,19 <sup>b</sup>
<b>FB4</b>	11,98±0,38 <sup>a</sup>	0,27	0,50 <sup>ii</sup>	48,18 <sup>b</sup>

i) Produtividade determinada com  $t = 48$  h.

ii) Produtividade determinada com  $t = 54$  h

A fibra adicionada ao meio não apresentou considerável conversão em glicose, devido à deficiência de enzima no meio, isso pode ser comprovado com a quantidade de glicose ao final do processo que não acumulou e pela baixa concentração de etanol obtida no processo.

RUDOLF *et al.* (2005) compararam a produção de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas em batelada e batelada alimentada de madeira de uma conífera do gênero *Picea* com a carga de 10% (m/v) de sólidos no processo em batelada e carga inicial de 6% (m/v) e a final de 10 % (m/v) no processo alimentado, cargas essas muito semelhantes às estudadas. Os autores concluíram que não houve diferença significativa na eficiência e produção máxima de etanol entre os processos, atingindo uma produção de etanol em batelada alimentada de 42 g.L<sup>-1</sup>. Já nos resultados relatados por BARROS *et al.* (2017) ao realizarem estratégias de alimentação utilizando fibra de caju pré-tratado com hidróxido de sódio e adicionando enzima baseada na carga inicial de sólidos, conseguiram melhores resultados no processo de SSF alimentada quando comparada ao processo em batelada, com concentração de etanol em torno de 68 g.L<sup>-1</sup>,

resultado diferente do que foi obtido no presente trabalho. Os resultados da literatuta apresentaram-se superiores aos obtidos no presente trabalho.

Diante do apresentado, conclui-se que uma baixa carga inicial de sólido não favoreceu para uma maior produção de etanol e, portanto foram realizadas outras estratégias de alimentações segundo a Tabela 3.2 apresentada em materiais e métodos. Foram realizados estudos com carga inicial de 6% m/v e 10% m/v e carga final de até 18% m/v, totalizando sete ensaios visando um aumento na carga de sólidos e consequentemente uma maior produção de etanol.

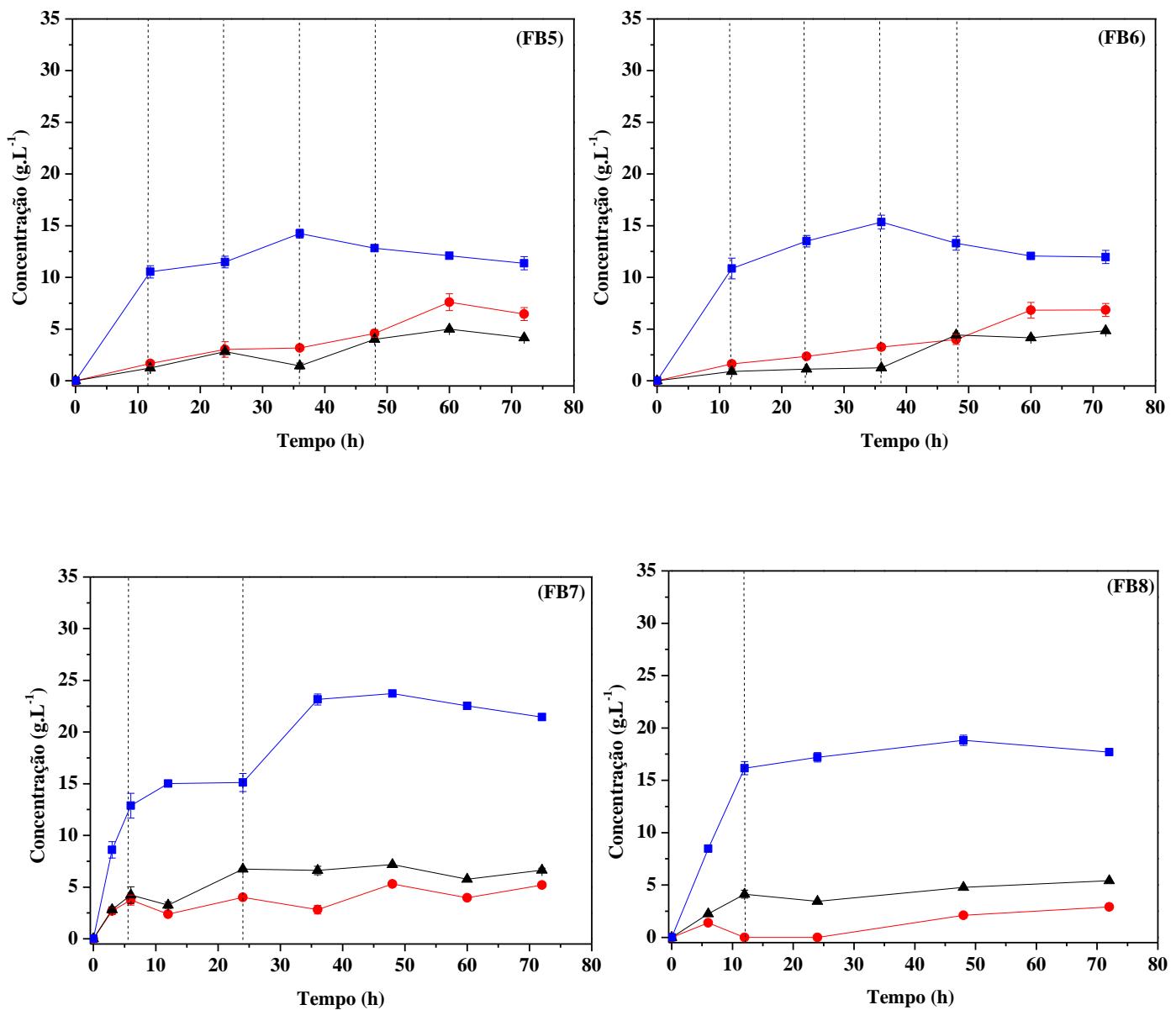
Observando as Figuras 4.10 verificam-se nas alimentações FB5, FB6 e FB7 que a cada adição de substrato, houve um concomitante aumento na produção de etanol, no entanto ao ser atingido o tempo de 36 horas de fermentação, têm-se um acúmulo dos açúcares glicose ( $7\text{g.L}^{-1}$ ) e xilose ( $5\text{g.L}^{-1}$ ) e consequentemente uma queda na concentração de etanol.

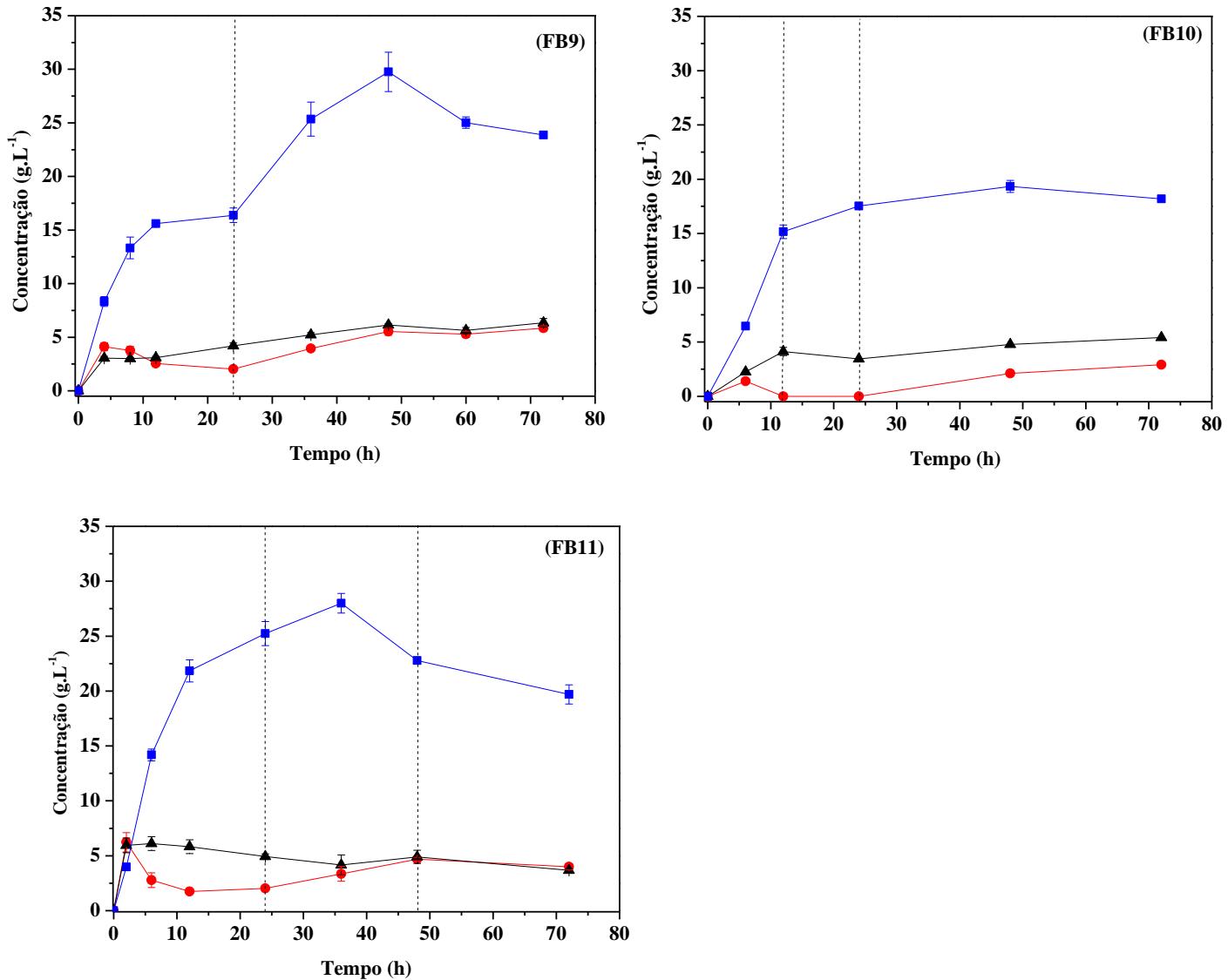
Nos primeiros ensaios Figura 4.10 (FB5 e FB6) foram adicionados 6% FC-PHA no inicio do processo e realizadas quatro alimentações de 2% para o FB5 e quatro alimentações de 3% para o FB6, totalizando em uma carga final de 14% m/v e 18 % m/v, respectivamente. Essas estratégias não foram promissoras no que se refere à produção de etanol, atingindo produção máxima de  $14,2\text{ g.L}^{-1}$  (FB5) e  $15,3\text{ g.L}^{-1}$  (FB6). Na Tabela 4.5 estão apresentados os dados de rendimento do processo, produtividade e eficiência. A eficiência do processo nas estratégias FB5 e FB6 foram muito baixas, 40,49% e 33,93% respectivamente, apresentando redução de 52,40% e 59,80%, quando comparados ao processo em batelada sem alimentação, no qual foi obtido eficiência de 83,84% (vide Tabela 4.2).

Os autores HOYER *et al.* (2013) e ZHANG *et al.* (2010) estudaram elevadas cargas de sólidos e concluíram que o acúmulo de açúcares ocorre devido a efeitos de inibição da atividade microbiana causada pela elevada concentração de sólidos, além da elevada viscosidade do meio. Nos estudos realizados no presente trabalho, podemos concordar pelo menor rendimento em etanol no processo com carga final de 18% FC-PHA (FB6) quando comparado ao ensaio FB7 com carga final de 14% FC-PHA.

---

**Figura 4. 10** Perfis de concentração de glicose (●), xilose (▲) e etanol (■) com o tempo para as estratégias de alimentação: (FB5, FB6, FB7, FB8, FB9,FB10 e FB11) iniciadas com 6% e 10% de carga de fibra (FC-PHA) e terminados com carga final de 14 % e 18%, conduzidos a 45 °C, 150 rpm, 72 h com 30 FPU/ gFC-PHA inicial. As linhas tracejadas correspondem aos pontos de alimentações de fibra FC-PHA.





Nas estratégias com carga inicial de 6% (FB5 e FB6), foram realizadas quatro alimentações no decorrer do processo e observou-se, que ao passo de cada alimentação, houve um acúmulo de glicose estendendo-se até o final do processo, indicando que a cada alimentação houve uma conversão enzimática do substrato, porém a glicose produzida não foi metabolizada pela levedura.

As outras cinco estratégias de alimentações (FB7, FB8, FB9, FB10 e FB11) foram todas iniciadas com 10% de FC-PHA (melhor carga de sólidos conseguida nos estudos de carga de fibra em batelada, anteriormente discutido) e de acordo com resultados apresentados, a estratégia de alimentação FB9 (com alimentação de 4% FC-PHA após

24 horas de processo) apresentou uma maior produção de etanol quando comparada a todas as estratégias de alimentação estudadas no presente trabalho.

A alimentação com 4% m/vFC-PHA a cada 12 h de processo (FB8) não apresentou resultados favoráveis ao processo. Uma possível justificativa seria a quantidade de sólidos não hidrolisados que se encontrava presente no meio reacional, e na adição de uma nova carga prejudicou a transferência de massa, dificultado a ação enzimática. WANG *et al.* (2011) relataram que a formação mais lenta do produto na hidrólise enzimática está associada à diminuição da capacidade de ligação das enzimas à celulose e difusão tridimensional mais lenta de enzimas na solução.

Na estratégia com a adição de 4% FC-PHA com 12 h e 24 h (FB10), resultados semelhantes foram obtidos comparando-se com o processo FB8, na qual a elevada carga de sólidos adicionada afetou negativamente o processo, ocorrendo já uma perda da eficiência catalítica da enzima celulase.

A maior concentração de etanol (29,7 g.L<sup>-1</sup>) foi obtida no processo em batelada alimentada iniciado com 10% FC-PHA e uma única alimentação (4% FC-PHA) após 24 horas do processo, estratégia FB9 (resultados apresentados na Figura 4.10). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.5, esse ensaio apresentou maior eficiência no processo e foi possível uma produção em etanol 32% maior quando comparada a produção de etanol em batelada. Foram relatados na literatura resultados semelhantes de melhor rendimento em etanol com a mesma carga final de sólidos 14% m/v, no entanto, a alimentação foi realizada em menor tempo de processo (TOMÁS-PEJÓ *et al.*, 2009 e RUDOLF *et al.*, 2005). Nos estudos com de carga de substrato inicial de 10% m/v e adição de substrato a 2% m/v às 6 h e 24 h (FB7) também refletiu numa maior concentração de etanol (23,1 g.L<sup>-1</sup>) em comparação com a melhor produção de etanol em batelada. Estes resultados indicam que a adição de baixa carga de sólidos favorece a transferência de massa, e que o tempo influênciam nos resultados, pois adicionando 4% m/v FC-PHA apenas com 24 h (FB9), já tinha ocorrido a hidrólise do sólido adicionado no início do processo, diminuindo os efeitos difusionais e o efeito inibitório do substrato.

Observa-se na estratégia FB9 que ocorreu uma aumento na concentração de etanol no período de 24 h a 48 h de processo, então, visando uma maior concentração de etanol, realizou a estratégia FB11 baseando-se na estratégia FB9, em que adicionou-se

---

4% m/v de FC-PHA em 48 h de processo. No entanto, não foi obtido um resultado favorável com essa nova estratégia de alimentação (FB11). A adição de 4% m/v FC-PHA em 24 h e 48 h consecutivas de ensaio não favoreceu para uma maior concentração de etanol, apresentando, portanto, segundo a Tabela 4.5 uma redução na eficiência do processo de 84,69 % (FB9) para 61,88 % (FB11). Observa-se no perfil da Figura 4.11 (FB11) que não ocorreu acúmulo de glicose e não houve produção de etanol, provavelmente devido à baixa quantidade de enzima celulase livre no meio reacional e assim não ocorreu a hidrólise da celulose à glicose, para que posteriormente fosse convertida a etanol pela levedura. A adsorção de celulase sobre o substrato é citado como o primeiro passo para hidrolisar a biomassa lignocelulósica e à medida que a hidrólise ocorre, a celulase adsorvida seria gradualmente libertada para a solução reacional (QIet al., 2011), porém como a quantidade de substrato inicial é baixo e a quantidade de enzima adicionada é baseada nesta massa, haverá pouca enzima e muito substrato, influenciando assim o efeito catalítico.

**Tabela 4. 5** Efeito das estratégias de alimentação nos parâmetros de produção de etanol por SSF em batelada alimentada utilizando FC-PHA como substrato, a 45 °C, 150 rpm por 72 horas. Valores com as mesmas letras, em sobreescrito, e na mesma coluna, não são significantemente diferentes um do outro com um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

Estratégias de alimentação	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento(g <sub>Eta</sub> nol/g <sub>celulose</sub> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Eficiência η (%)
<b>FB5</b>	14,2±0,43 <sup>a</sup>	0,23	0,39 <sup>i</sup>	40,49 <sup>a</sup>
<b>FB6</b>	15,3±0,66 <sup>a</sup>	0,19	0,42 <sup>i</sup>	33,93 <sup>b</sup>
<b>FB7</b>	23,1±0,53 <sup>b</sup>	0,37	0,64 <sup>ii</sup>	65,87 <sup>c</sup>
<b>FB8</b>	18,8±0,49 <sup>c</sup>	0,23	0,39 <sup>i</sup>	41,70 <sup>a</sup>
<b>FB9</b>	29,7±0,84 <sup>d</sup>	0,48	0,61 <sup>ii</sup>	84,69 <sup>d</sup>
<b>FB10</b>	19,3±0,54 <sup>c</sup>	0,24	0,40 <sup>ii</sup>	42,87 <sup>a</sup>
<b>FB11</b>	27,9±0,90 <sup>d</sup>	0,35	0,77 <sup>i</sup>	61,88 <sup>c</sup>

i) Produtividade determinada com  $t = 36$  h.

ii) Produtividade determinada com  $t = 48$  h

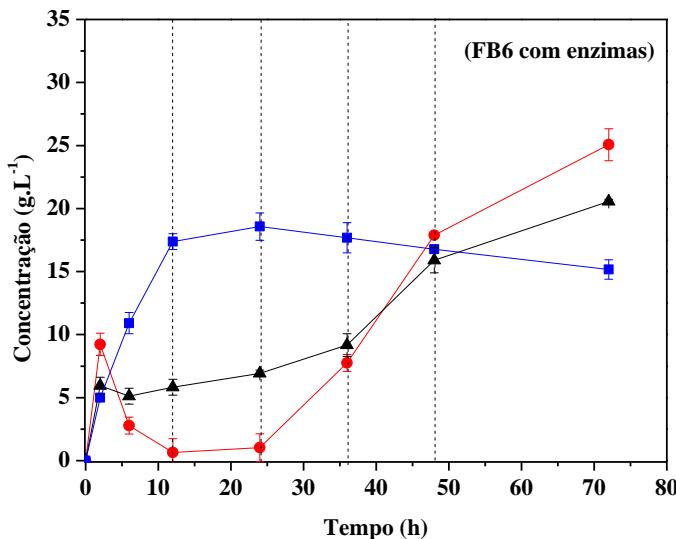
JORGENSEN *et al.* (2006), RAMACHANDRIYA *et al.*(2013) e KOSSATZ *et al.* (2017) também observaram um efeito negativo na alimentação com alta carga de sólidos, o que poderia ser atribuído a dificuldades reológicas sofridas pela fibra no processo de liquefação ou aumento dos efeitos inibitórios que afetaram o metabolismo das enzimas e da levedura. Corroborando com os resultados observados nos experimentos FB6 e FB10 deste estudo, no qual se observou uma relação negativa entre a carga de sólidos e a conversão de celulose em etanol, nas estratégias de alimentação com carga final de sólidos de 18% m/v, sendo obtidas as menores conversões em etanol. Independentemente da carga inicial do substrato e da estratégia de alimentação, em todas as estratégias que se obteve uma carga final de 14% ou 18% m/v FC-PHA, mostraram acúmulo de glicose e xilose constante a partir de 48 h até o final do processo. BARROSO *et al.* (2017) também realizaram estudo de batelada alimentada com fibra de caju pré-tratado com ácido seguido de álcali e ao obter acúmulo de açúcares no processo, concluiram que este efeito ocorre devido à continuidade da atividade hidrolítica em detrimento da cessão da atividade microbiana.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios FB5 e FB6, foi realizado um ensaio reproduzindo o FB6 com a adição de 30FPU/g FC-PHA em cada alimentação de fibra. Os resultados obtidos encontram-se apresentados da Figura 4.11.

Com a adição de enzimas durante as alimentações, aumentou-se a taxa de hidrólise e esta suplementação permitiu uma produção de etanol maior nas primeiras horas, refletindo em um aumento na produtividade de  $0,42 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  para  $0,77 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , com a máxima concentração de etanol de  $18,56 \text{ g.L}^{-1}$ . Porém, comparando este processo com o ensaio sem a suplementação do complexo enzimático (FB6,  $15,3 \text{ g.L}^{-1}$  etanol), não foi obtido um aumento considerável na concentração de etanol. Além disso, houve um elevado acúmulo de glicose e xilose no final do processo, indicando que a levedura *K. marxianus* não metabolizou estes carboidratos para a produção do biocombustível de interesse.

---

**Figura 4. 11** Perfis de concentração de glicose (●), xilose (▲) e etanol (■) com o tempo para a estratégia de alimentação FB6 com adição de 30 FPU/g<sub>FC-PHA</sub> durante as alimentações, com o processo de SSF a 45 °C, 150 rpm, 72 h. As linhas tracejadas correspondem aos pontos de alimentações de fibra FC-PHA.



Resultados obtidos por PESSANI *et al.* (2011) corroboram que a adição de enzimas somente no início do processo de sacarificação e fermentação simultâneas em batelada da alimentada e com volume equivalente à quantidade inicial de sólidos já presentes no meio, sem adições durante as alimentações, não influiu negativamente na eficiência do processo, além de permitir uma economia no custo do processo SSF, e que outros fatores, como tempo e quantidade de sólidos, apresentam um maior efeito.

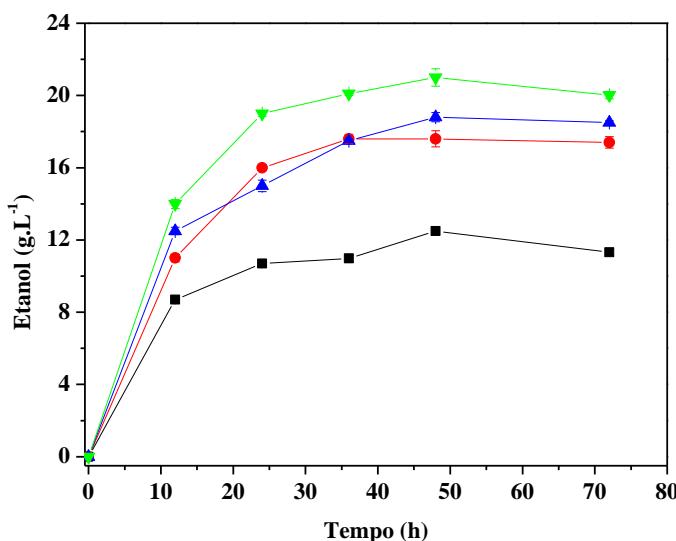
#### 4.7 Estudo do efeito da carga enzimática no processo SSF

Segundo NEWMAN *et al.* (2013) o custo com enzimas e a taxa lenta de hidrólise enzimática são os obstáculos mais importantes para a produção de etanol a partir de uma biomassa lignocelulósica, então foi realizado um estudo comparativo de quatro cargas enzimáticas (10 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>, 15 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>, 25 FPU/g<sub>FC-PHA</sub> e 30 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>) no processo de SSF. Os resultados desta etapa estão representados na Figura 4.12.

Observa-se um perfil semelhante para a produção de etanol para as cargas enzimáticas de 15, 25 e 30 FPU/g<sub>FC-PHA</sub>, com maior produção obtida após 48 de

processo, e ao utilizarmos uma carga menor, obteve-se uma redução de aproximadamente 50% na concentração de etanol. Também, foram calculados parâmetros de produção de etanol, os quais estão apresentados na Tabela 4.6. Percebe-se que não houve uma diferença significativa, com um nível de significância de 95%, na máxima concentração de etanol e na eficiência ao reduzirmos a carga enzimática pela metade (30 FPU/g<sub>F</sub>FC-PHA para 15 FPU/g<sub>F</sub>FC-PHA).

**Figura 4. 12** Perfil de concentração de etanol utilizando diferentes cargas enzimáticas de Cellic CTec2 no processo de SSF a 45°C, 150 rpm por 72 horas utilizando uma carga de sólidos de 10 g<sub>F</sub>FC-PHA/100 mL, 5 g.L<sup>-1</sup> de inóculo (*K. marxianus* ATCC36907). Cargas enzimáticas: (■) 10 FPU/g<sub>F</sub>FC-PHA, (●) 15 FPU/g<sub>F</sub>FC-PHA, (▲) 25 FPU/g<sub>F</sub>FC-PHA e (▼) 30 FPU/g<sub>F</sub>FC-PHA.



No entanto, uma redução da carga enzimática para 10 FPU/g<sub>F</sub>FC-PHA representou uma menor concentração de etanol, produtividade e eficiência. A redução na dosagem enzimática diminui a disponibilidade da enzima à celulose, diminuindo assim os rendimentos de celulose em glicose (RAMACHANDRIYA *et al.*, 2013).

LIU e CHEN (2017) investigaram a produção de etanol por SSF da palha de milho pré-tratada por explosão a vapor e assim como no presente estudo, utilizaram o coquetel enzimático Cellic CTec2 com carga de 15 FPU/g<sub>F</sub>palha tratada, obtendo rendimentos semelhantes porém em um maior tempo de processo.

**Tabela 4. 6** Efeito de diferentes cargas enzimáticas nos parâmetros de produção de etanol por SSF a 45 °C, 150 rpm por 72 horas, utilizando FC-PHA como substrato. Valores com as mesmas letras, em sobreescrito, e na mesma coluna, não são significantemente diferentes um do outro com um nível de confiança de 95 % ( $p<0,05$ ).

Carga enzimática (FPU/gFC-PHA)	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento(g <sub>Eta</sub> nol/g <sub>celulose</sub> )	Produtivida de (g.L <sup>-1</sup> .h)	Eficiência η (%)
<b>10</b>	12,50±0,21 <sup>a</sup>	0,28	0,26 <sup>i</sup>	49,90 <sup>a</sup>
<b>15</b>	17,65±0,45 <sup>b</sup>	0,39	0,36 <sup>i</sup>	70,46 <sup>b</sup>
<b>25</b>	18,80±0,25 <sup>b</sup>	0,42	0,39 <sup>i</sup>	75,06 <sup>b</sup>
<b>30</b>	21,0 ±0,48 <sup>b</sup>	0,46	0,43 <sup>i</sup>	83,84 <sup>b</sup>

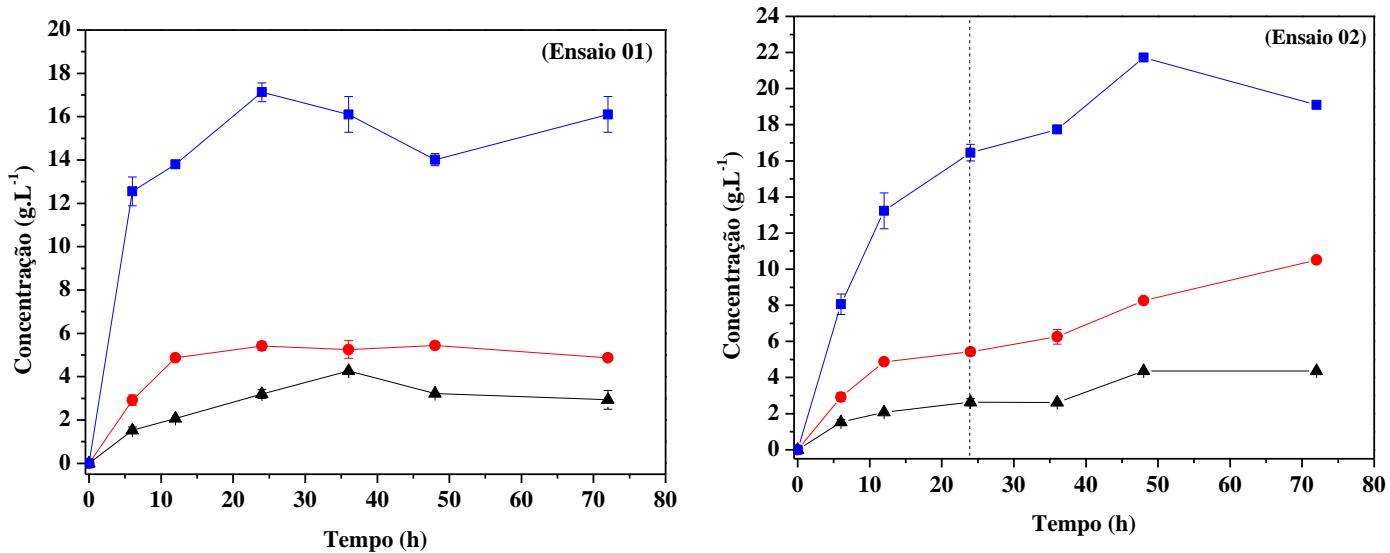
i) Produtividade determinada com  $t = 48$  h

Então, diante dos resultados apresentados, a carga de 15 FPU/gFC-PHA foi utilizada nos ensaios posteriores de produção de etanol em biorreator, visando uma maior produção de etanol e uma economia no processo.

#### 4.8 Estudo da produção de etanol por SSF em biorreator

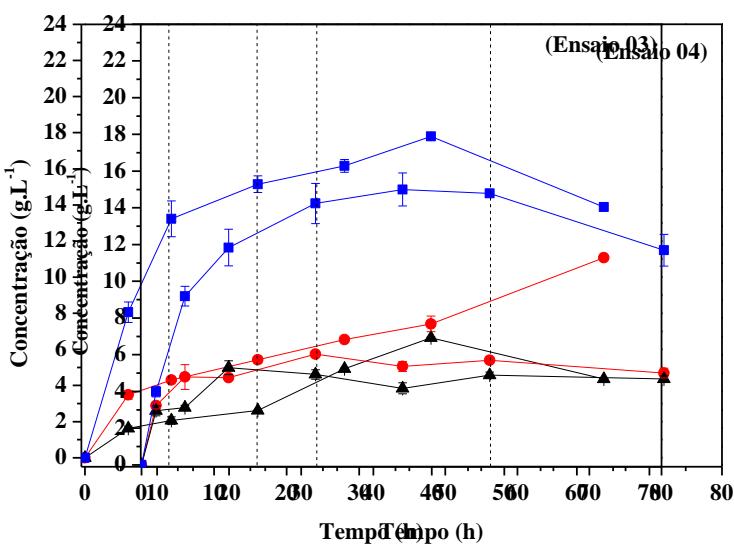
Estudos foram realizados em biorreator de 1 L, visando uma maior produção de etanol (vide resultados na Figura 4.13). No ensaio em batelada (Figura 4.13-Ensaio 01) obteve-se uma produção de etanol de  $17,12\pm0,42$  g.L<sup>-1</sup>, quando comparado ao realizado em mesa agitadora obteve-se uma pequena redução de 8,9% na concentração de etanol, utilizando metade da carga enzimática.

**Figura 4. 13** Perfis de concentrações de glicose (●), xilose (▲) e etanol (■) com o tempo para o processo de SSF conduzido em biorreator com carga inicial de 10% (FC-PHA), a 45 °C por 72 h operando com rampa de agitação: 500 rpm (12h) e 200 rpm (após 12 h) e adição de enzimas no inicio do processo: 15 FPU/gFC-PHA. Ensaio 01 (batelada), Ensaio 02 (batelada alimentada: 4% (FC-PHA) após 24 h), Ensaio 03 (batelada alimentada: 4% (FC-PHA) com 12 h e 24 h) e Ensaio 04: (batelada alimentada: 4% (FC-PHA) com 24 h e 48 h).



Nos Ensaios 02, 03 e 04 foram realizadas alimentações durante o processo. No ensaio 02 foi realizado a adição de 4% m/v (FC-PHA) nas primeiras 24 h, no ensaio 03 alimentou-se 4% m/v (FC-PHA) com 12 h e 24 h de processo e no ensaio 04 alimentou-se 4% m/v (FC-PHA) com 24 h e 48 h de processo. Os resultados apresentados na

Figura 4.13 mostram que houve um acúmulo de glicose (6 a 8 g.L<sup>-1</sup>) e com isso obteve-se um menor rendimento na produção de etanol (vide Tabela 4.7). Este fenômeno provavelmente deve-se a uma menor taxa de



transferência de massa, devido ao intumescimento apresentado pelo meio após adição de uma maior massa de sólidos no biorreator, necessitando de uma estrutura mais complexa de agitação e presença de hélice capaz de melhorar consideravelmente a agitação e a transferência de massa no início processo.

**Tabela 4. 7** Parâmetros obtidos na produção de etanol em Biorreator por SSF com carga inicial de 10% (FC-PHA) a 45°C por 72 h, operando com rampa de agitação: 500 rpm (12h) e 200 rpm (após 12 h). Ensaio 01: (batelada), Ensaio 02: (batelada alimentada: 4% (FC-PHA) após 24 h), Ensaio 03: (batelada alimentada: 4% (FC-PHA) com 12 h e 24 h) e Ensaio 04: (batelada alimentada: 4% (FC-PHA) com 24 h e 48 h).

Ensaios em Biorreator	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento (g <sub>Etanol</sub> /g <sub>celulose</sub> )	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Eficiência η (%)
<b>01</b>	17,12±0,42 <sup>a</sup>	0,38	0,71	68,34 <sup>a</sup>
<b>02</b>	21,71±0,07 <sup>b</sup>	0,49	0,45	61,92 <sup>a</sup>
<b>03</b>	17,79±0,05 <sup>a</sup>	0,40	0,37	39,46 <sup>b</sup>
<b>04</b>	14,99±0,87 <sup>c</sup>	0,18	0,41	33,25 <sup>b</sup>

De acordo com os gráficos apresentados na Figura 4.13 (01, 02,03 e 04) tem-se que em todos os ensaios realizados, sejam em batelada (01) ou batelada alimentada (02,03 e 04), há um acúmulo de glicose no final do processo e bem mais evidenciado nos processos 02 e 03, implicando, que na alimentação realizada em 48 h no ensaio 04, não houve conversão da celulose em glicose, ou seja, a enzima não agiu sobre a fibra adicionada. Já nos ensaios 02 e 03, o acúmulo de glicose pode estar associado à inibição do substrato, diminuindo o metabolismo da levedura *K. marxianus*, ocorrendo uma redução na formação do produto desejado (SASSNER *et al.*, 2006; NARRA E JAMES., 2015; BARROS *et al.*, 2017).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.7 pode-se concluir que o ensaio 01, apresentou a maior eficiência (68,34%), comparando-se com os ensaios 02,03 e 04. Dados de produtividade revelam que no ensaio em batelada há uma produção mais rápida de etanol, pois tem-se uma produtividade bem maior do que nos ensaios em batelada alimentada. Ensaios com batelada alimentada (02 e 03) apresentaram maior concentração de etanol, sendo o Ensaio 02, com alimentação de 4% em 24 h de processo, o que apresentou a maior concentração de etanol (21,71 g.L<sup>-1</sup>).

Essa configuração concorda com os melhores resultados obtidos nos ensaios realizados em mesa agitadora.

ZHANG et al. (2010) relataram que ao produzir etanol em batelada no biorreator 6.0 L (Biostat B.Braun Biotech International, Melsungen, Germany) utilizando 19% (m/v) de sabugo de milho pré-tratado com  $H_2SO_4$  e NaOH, foi identificado altaviscosidade e distribuição desigual de lamas no reator obtendo um rendimento de etanol muito inferior ao rendimento teórico. No entanto, os autores relataram um aumento significativo na produção de etanol ao produzi-lo utilizando o processo em batelada alimentada. A distribuição desigual de substrato nas primeiras horas do processo fermentativo, assim como relatado pela literatura, também foi identificada no presente trabalho. Portanto, uma maior agitação inicial fornecida ao processo com o intuito de minimizar esse efeito.

PAULOVÁ et al. (2014) concluíram que não é possível operar em batelada ou batelada alimentada utilizando biorreatore, pois forma-se uma pasta muito viscosa que se assemelhava a uma massa de difícil bombeamento. Diante do exposto, os autores realizaram um ensaio executado simultaneamente em dois biorreatores. Ao primeiro reator com capacidade de 1 L foi adicionada 20 g/L celulose. O segundo biorreatore, com capacidade de 2 L foi adicionado substrato na carga de 45 g/L de celulose e a mesma carga enzimática do primeiro. Os autores obtiveram 9 g.L<sup>-1</sup> de etanol no primeiro biorreatore e no segundo biorreatore, num processo subsequente alimentado por 10 h, a concentração de etanol foi aumentadas para 14,0 g.L<sup>-1</sup> e o rendimento de etanol a partir da celulose atingiu 0,41 g/g.

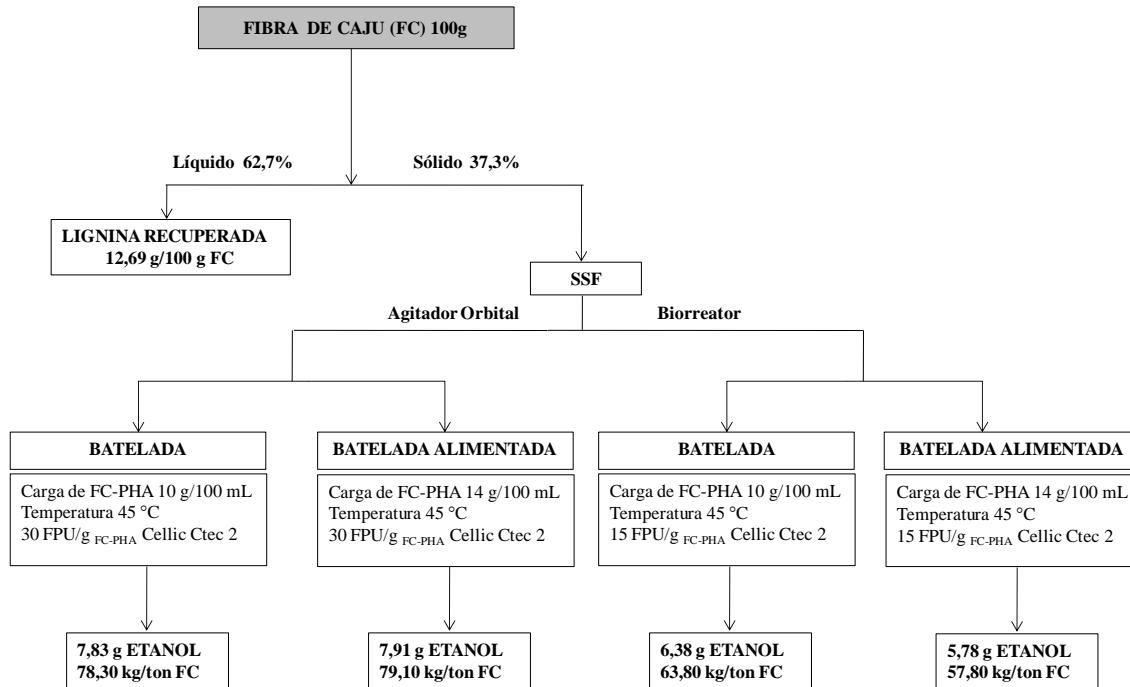
Poucos são os estudos de produção de etanol de segunda geração por sacariação e fermentação simultânea em biorreatore alimentada, sendo os resultados alcançados neste estudo promissores, pois apresentou rendimentos, eficiência, produtividade e concentração de etanol semelhantes aos obtidos em mesa agitadora e operando-se com metade da carga enzimática

#### **4.9 Balanço de massa do processo**

A Figura 4.14 apresenta o fluxograma no qual consta o balanço de massa dos melhores resultados obtidos em cada estratégia de produção de etanol a partir de 100 g de fibra de caju *in natura*. O processo de SSF em batelada alimentada (alimentação: 4%

m/v em 24 h), assim como nos resultados previamente obtidos, foi o ensaio que permitiu o maior rendimento (7,91 g etanol/ 100 g FC).

**Figura 4.14** Balanço de massa da produção de etanol por 100 g de fibra de caju *in natura*.



Embora nos estudos em biorreatore a concentração de etanol tenha sido 20% inferior, o consumo de enzimas foi metade quando comparado ao processo em que se obteve maior concentração de etanol. Isso implica em redução de 50% nos custos da etapa mais onerosa do processo de obtenção de etanol de segunda geração. Rendimentos inferiores foram obtidos nos ensaios em biorreatore, entretanto foi cedido ao processo metade da carga enzimática utilizada nos processos em agitador orbital.

A fibra de caju utilizada no presente trabalho vem sendo fonte de estudo por outros autores na produção de etanol de segunda geração, no entanto rendimentos inferiores foram obtidos por RODRIGUES *et al.* (2016), ao produzir etanol através do processo de SSF utilizando fibra de caju pré-tratada com ácido seguido de álcali, a 40 °C utilizando o mesmo microrganismo estudado *K. marxianus* ATCC 36907, obtendo rendimento de apenas 2,21g/100 g FC.

## 5.CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que de caju pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino apresentou-se como um substrato promissor para produção de etanol por processo de sacarificação e fermentação simultânea utilizando a levedura *K. marxianus* ATCC36907.

A lignina extraída do licor obtido após o pré-tratamento da fibra de caju com peróxido de hidrogênio alcalino apresentou características semelhantes às citadas na literatura.

No estudo da carga de sólidos e da influência da temperatura no processo de SSF obteve-se aproximadamente  $21,0 \text{ g.L}^{-1}$  de etanol e um rendimento de 83,84%, utilizando 10% m/v de sólidos a 45 °C. A pré-sacarificação não proporcionou um aumento na eficiência do processo.

O uso de estratégias de alimentação visando uma maior produção de etanol foi obtido no processo de batelada alimentada com 10 % (FC-PHA) no início do processo e 4 % (FC-PHA) alimentado após 24 h, obtendo-se uma concentração de etanol de 29,7g/L, representado um aumento de 30% na concentração de etanol quando comparada ao processo realizado em batelada.

A produção de etanol em biorreator usando a configuração em batelada e 10 % m/v de FC-PHA foi semelhante à produção obtida em mesa agitadora. Conduzindo o processo em batelada alimentada aumentou-se a produção, porém ainda inferior à obtida em mesa agitadora na mesma configuração de processo. No entanto, vale ressaltar que houve um consumo de metade das enzimas quando comparado ao processo em que se obteve maior concentração de etanol. As melhores estratégias de alimentação nos experimentos conduzidos em mesa agitadora e biorreator foram iguais, iniciando o processo com uma carga de sólido de 10% m/v e finalizando com 14% m/v, com alimentação de 4% m/v em 24 h.

Ao realizar um balanço de massa de todo o processo, foi obtido como melhor rendimento 7,91 g etanol/ 100 g FC para o ensaio em batelada alimentada realizado em agitador orbital.

---

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L.; JUNIOR, J. E. M.; JUNIOR, I. S.; ROCHA, M. V. P. Xylitol production from cashew apple bagasse by *K.marxianus* CCA510. **Catalysis Today.**, v. 255, p. 33- 40, 2015.
- ALFANI, F., GALLIFUOCO, A., SAPOROSI, A., SPERA, A., AND CANTARELLA, M. Comparison of SHF andSSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.**, v. 25, p. 184-192, 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.
- ARAÚJO, J.; GRANDE, C.; RODRIGUES, A. Vanillin production from ligninoxidation in a batch reactor. **Chemical Engineering Research and Design.**, v.88, n. 8, p. 1024-1032, 2010
- ARAUJO, J. R.; WALDMANB, J. R.; PAOLIA, M. A. Thermal properties of high density polyethylene composites with natural fibres: Coupling agent effect. **Polymer Degradation and Stability.**, v.93, p. 1770–1775, 2008.
- AZADFAR, M. Número de onda e diferentes atribuições para as principais bandas no IR das ligninas. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.75, p. 58–66, 2015.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnol Adv.**, v. 26, n. 1, p. 89-105. 2008.
- BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I., Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry.**, v. 39,p. 1843–1848, 2004.
- BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J.; HODGE, D.B.; WALTON, J.D. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. **Biotechnology for Biofuels.**, v. 4, p.16, 2011.
- BARROS E. M.; CARVALHO, V. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P. GONÇALVES L. R. B. Comparison of strategies for the 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.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management.**, v. 52, p. 858-875,2011.

BEGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol.**, v. 13, p. 25–58, 1994.

BOYLE, M.; BARRON, N.; MCHALE, A. P. Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Biotechnology Letter.**, v.19, n.1, p.48-51, 1997.

BRADY D, NIGAM P, MARCHANT R, MCHALE AP Ethanol production at 45°C by alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on lactose-containing media. **Bioproc Eng.**, v.16, p.101–104, 1997.

BRANDT, A.; GRÄSVIK, J.; HALLETT, J. P.; WELTON, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry.**, v. 15, n. 3, p. 550-583, 2013.

CAO, W. et al. Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Bioresource Technology.**, v. 111, p. 215–221, 2012.

CHEN, F.; DIXON, R. A.; Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nat Biotech.**, v.25, p.759-761. 2007.

CHEN, H.; HAN, Y.; XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. **Process Biochemistry.**, v.43, p. 1462-1466, 2008.

CORREIA, J. A. C.; JUNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. **Bioresource Technology.**, v. 139, p. 249–256, 2013.

CORREIA, J. A. C.; JUNIOR, J. E. M.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technology.**, v. 179, n. 0, p. 249–259, 2015.

DAGNINO, E. P.; CHAMORRO, E. R.; ROMANO, S. D.; FELISSIA, F. E.; AREA, M. C. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production, **Ind. Crops Prod.**, v. 42, p. 363–368, 2013.

DA SILVA, L.G.; RUGGIERO, R.; GONTIJO, P.M.; PINTO, R.B.; ROYER, B.; LIMA, E.C.; FERNANDES, T.H.M.; CALVETE, T. Adsorption of Brilliant Red 2BE dye from water solutions by a chemically modified sugarcanebagasse lignin. **Chemical Engineering Journal.**, v. 168, p. 620–628, 2011.

D'ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: **Celulose e papel – tecnologia de fabricação da pasta celulósica.**São Paulo: Senai/IPT, v.2, p.45- 106, 1988.

- CONSOLIN-FILHO, N.; VENANCIO, E. C.; BARRIQUELO, M.F.; HECHENLEITNER, A. A. W.; PINEDA, E. A. G. Methylene blue adsorption onto modified lignin from sugar cane bagasse. **Eclética Química.**, v. 32, p. 63–70, 2007.
- DEVANTIER, R.; PEDERSEN, S.; OLSSON, L., Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain. **ApplMicrobiolBiotechnol**, v. 68, p. 622–629, 2005.
- DUFF, S. J .B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.**, v.55, p. 1-33, 1996.
- FONSECA, G. G.; HEINLZE, E.; WITTMANN, C; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology Biotechnology.**, v. 79, p. 339-354, 2008.
- FROLLINI, E., CASTELLAN, A. Phenolic resins and composites. **Wiley Enciclopedia of Composites.**, Segunda edição, p. 1059-2068, 2012.
- GARCÍA, J. F.; ANCHEZ, S.; BRAVO, V.; CUEVAS, M.; RIGAL, L.; GASET, A.; Xylitol production from olive-pruning debris by sulphuric acid hydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*. **Holzforschung.**, v.65, p.59e65, 2011.
- GHOSE, T. K., Measurement of cellulose activities (recommendation of commission on biotechnology IUPAC), **Pure Applied Chemistry.**, v. 59, p.257-268, 1987.
- GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 101, p. 4775– 4800, 2010.
- GOMEZ , L. D.; STEELE-KING, C. G.; MCQUEEN-MASON, S. J., Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the wall. **New Phytol.**, v. 178, p. 473-485, 2008.
- GONDIM, D. R.; PACHEGO, A. M.; RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; GONCALVES, L. R. B. Use of Cashew Apple Bagasse as Support for *Saccharomyces cerevisiae* Cells Immobilization for Ethanol Production. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy.**, v. 8, p. 108-114, 2014.
- GORDOBIL, O.; EGÜÉS, I.; LLANO-PONTE, R.; LABIDI, J. Physicochemical properties of PLA lignin blends. **Polymer Degradation and Stability.**, v. 108, p. 330-338, 2014.
- GOUVEIA, E.R.; DO NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, G.J.M.; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de canade-açúcar. **Química Nova.**, v.32, p.1500–1503, 2009.
- GOVUMONI, S. P.; KOTI, S.; KOTHAGOUNI,Y. S.; VENKATESHWAR, S.; LINGA,V. R. Evaluation of pretreatment methods for enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production. **Carbohydrate Polymers.**,v. 91, p. 646–650, 2013.

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

HAN, J.; LUTERBACHER, J. S.; ALONSO, D. M.; DUMESIC, J. A.; MARAVELIAS, C. T.. A lignocellulosic ethanol strategy via nonenzymatic sugar production: process synthesis and analysis. **Bioresour. Technol.**, v.182, p.258–266. 2015.

HAQUE, M. A.; BARMAN, D. N., KANG, T. H.; KIM, M. K.; KIM, J.; KIM, H.; YUN, H. D., Effect of dilute alkali pretreatment on structural features and enhanced enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* at boiling temperature with low residence time. **Biosystems Engineering.**, v. 114 (3), p. 294-305, 2013.

HARMSEN, P. F. H.; HUIGEN, W. J. J.; BERMÚDEZ LOPEZ, L.M.; BAKKER, R. R. C. Review of physical and chemical pretreatment processes for lignocelulosic biomass. **Wageningen: Food & biobased research.**, p.54, 2009.

HASUNUMA T.; KONDO A., Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast trains. **Process Biochemistry.**, v. 47, p. 1287–1294, 2012.

HOYER, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The effect of prehydrolysis and improved mixing on high-solids batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce to ethanol. **Process Biochemistry.**, v. 48, n. 2, p. 289–293, 2013.

HUMBIRD, D.; DAVIS, R.; TAO, L.; KINCHIN, C.; HSU, D.; ADEN, A.; Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. National Renewable Energy Laboratory. **Technical Report NREL/TP-5100-47764**, Golden, CO, USA. 2011.

JARBOE, L. R.; GRABAR, T. B.; YOMANO, L. P.; SHANMUGAN, K. T.; INGRAM, L. O.. Development of ethanologenic bacteria. **Adv Biochem Eng Biotechnol.**, v. 108, p., 237-261, 2007.

JIN, M. J.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; LAU, M. W.; DALE, B. E. Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of AFEXTM pretreated corn stover for ethanol production using commercial enzymes and *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST). **Bioresour. Technol.**, v. 110, p. 587–594, 2012.

KAMM, B.; GRUBER, P.R.; KAMM, M. **Biorefineries – Industrial Processes and Products. Wiley-VCH, ISBN: 3-527-31027-4.**, Weinheim, German, 2006.

KARAGÖZ, P.; ROCHA, I. V.; ÖZKAN, M.; ANGELIDAKI, I. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by Same Vessel Saccharification and Co-Fermentation. **Bioresource Technology.**, v.104, p. 348-357, 2012.

KNAUF, M.; KRAUS, K.. Specific yeasts developed for modern ethanol production. **Sugar Industry.**, v. 131, p. 753-758, 2006.

KONDURI, M. K.; KONG, F.; FATEHI, P. Production of carboxymethylated lignin and its application as a dispersant. **European Polymer Journal.**, v. 70, p. 371–383, 2015.

KOPPRAM, R., TOMÁS-PEJÓ, E., XIROS, C., OLSSON, L., Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. **Trends Biotechnol.**, v. 32, p. 46–53, 2014.

KOSSATZ, H. L.; ROSE, S. H.; VILJOEN-BLOOM, M.; ZYL, W. H. V. Production of ethanol from steam exploded triticale straw in a simultaneous saccharification and fermentation process. **Process Biochemistry.**, v. 53, p. 10–16, 2017.

KRIA, A.; HAMDI, N.; SRASRA, E. Adsorption Studies of Methylene Blue Dye on Tunisian Activated Lignin. **Russian Journal of Physical Chemistry A.**, v. 85, n. 2, p. 279–287. 2011.

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

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biol.**, v. 24, p. 17–26, 2010.

LASER, M. ; SCHULMAN, D. ; ALLEN, S.G.; LICHWA, J. ; ANTAL, M. J.; LYND, L.R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugarcane bagasse for to ethanol. **Bioresour. Technol.**, v. 82, p. 33–34. 2002.

LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L. Chemical Modification Of Lignins: Towards Biobased Polymers. **Progress in Polymer Science.**, v.39, n.7, p. 1266-1290, 2014.

LEE, H. J.; LIM, W. S.; LEE, J. W. Improvement of ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysates by the removal of inhibitors. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry.**, v. 19, n. 6, p. 2010–2015, 2013.

LEE, W.H.; JIN, Y.S. Improved ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a mutated cellobiose transporter during simultaneous saccharification and fermentation. **Journal of Biotechnology.**, v. 245, p. 1–8, 2017.

LEITÃO, R. C.; CLAUDINO, R. L.; BRITO, C. R. F.; ALEXANDRE , L. C.; CASSALES, A. R.; PINTO, G. A. S.; SANTAELLA, S. T., Produção de Biogás a partir do Bagáço do caju. **Embrapa Agroindústria Tropical**, ISSN 1679-6543, 2011.

LI, J. et al. Effect of antioxidant extraction on the enzymatic hydrolysis and bioethanol production of the extracted steam-exploded sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal.**, v. 82, p. 91–96, 2014.

LI, H. Y.; SUN, S. N.; WANG, C. Z.; SUN, R. C. Structural and dynamic changes of lignin in Eucalyptus cell walls during successive alkaline ethanol treatments. **Industrial**

**Crops and Products.**, v.74, p.200–208, 2015.

LIN, Y. S.; LEE, W. C.; DUAN, K. J.; LIN, Y. H., Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation in rotary drum reactor using thermotolerant *Kluveromyces marxianus*. **Applied Energy**, v. 105, p. 389–394, 2013.

LIMTONG, S.; SRINGIEW, C.; YONGMANITCHAI, W., Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3367–3374, 2007.

LINDE, M.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1100–1107, 2007.

LIU, K. et al. High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4952–4958, 2010.

LIU, Z.; CHEN, H. Two-step size reduction and post-washing of steam exploded corn stover improving simultaneous saccharification and fermentation for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 47–58, 2017.

LOPES, A. M. C.; JOÃO, K. G.; RUBIK, D.; BOGEL-LUKASIK, E.; ANDREAUS, J.; DUARTE, L.C.; BOGEL-LUKASIK, R. Pretreatment of lignocellulosic biomass using ionic liquids: Wheat straw fractionation. **Bioresource Technology**, v.142, p. 198-208, 2013.

MANZANARES, P.; NEGRO, M. J.; OLIVA, J.M.; SAÉZ, F.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Different process configurations for bioethanol production from pretreated olive pruning biomass. **J Chem Technol Biotechnol.**, V. 86, P. 881–887, 2011.

MARTINS, D. B., DE SOUZA, C. G. J. R., SIMÕES DA, DE MORAIS, MA Jr The  $\beta$ -galactosidase activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 decreases by high concentrations of galactose. **Curr Microbiol.**, v.44, p.379–382, 2002.

MATSUSHIKA, A.; HIROYUKI, I.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S., Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: currentstate and perspectives. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 84, p. 37–53, 2009.

MCINTOSH, S.; VANCOV, T. Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. **Biomass Bioenergy**, v.35, p. 3094-3103, 2011.

MESA, L. et al. Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 175, n. 1, p. 185–191, 2011.

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

MOHAN, K.; KONG, F.; FATEHI, P. Production of carboxymethylated lignin and its application as a dispersant. **European Polymer Journal.**, v. 70, p. 371–383, 2015.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S.E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings-a review. **Biomass Bioenergy.**, v.56, p. 526–544, 2013.

MORENO, A. D.; IBARRA, D.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, M., Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase, **Bioresource Technology.**, v. 135, p. 239–245, 2013.

NEWMAN, R. H.; VAIDYA, A. A.; IMROZ SOHEL, M.; JACK, M. W. Optimizing the enzyme loading and incubation time in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Bioresour. Technol.**,v. 129, p. 33–38, 2013.

NIEMI, H.; LAHTI, J.; HATAKKA, H. Fractionation of Organic and InorganicCompounds from Black Liquor by Combining Membrane Separation andCrystallization. **Chemical Engineering & Technology.**, v. 34, n. 4, p. 593-598,2011.

OBEROI, H. S.; BABBAR, N.; SANDHU, S. K.; DHALIWAL, S. S.; KAUR, U.; CHADHA, B. S.; BHARGAV, V. K., Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneoussaccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v. 39, p. 557–566, 2012.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática da biomassa. **Quim. Nova.**,v. 33, No. 7, p.1549-1558, 2010.

ÖGREN, K.; VEHMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, M.; GALBE, M.; VIIKARI, L.; ZACCHI, G., High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneoussaccharification and fermentation of steam pretreated cornstover for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology.**, v. 40, p. 607–613, 2007.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – and interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnol Biofuels.**, 2008.

OLSSON, L., HAHN-HÄGERDAL, B.: Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates for ethanol production. **Enzyme Microb Technol.**, v. 18, p.312-331, 1996.

PAULOVÁ, L.; PATÁKOVÁ, P.; RYCHTERA, M.; MELZOCH., High solid fed-batch SSFwith delayed inoculation for improved production of bioethanol from wheat straw. **Fuel.**,v.122, p. 294–300, 2014.

PESSANI, N. K.; ATIYEH, H. K.; WILKINS, M. R.; BELLMER, D. D.; BANAT, I. M.,Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass bythermotolerant*Kluyveromyces marxianus* IMB3: The effect of enzyme loading, temperature and higher solidloadings. **Bioresource Technology.**,v. 102, p. 10618–

10624, 2011.

PIACENT, E. A. **Perspectivas do Brasil no mercado internacional de etanol**. 2006, Tese (Doutorado em Engenharia mecânica)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.

QI, B.; CHEN, Y, S.; WAN, Y. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose, **Bioresource Technology**, v.102, p.2881–2889, 2011.

RABELO, S. C.; ANDRADE, R. R.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 349–357, Nov. 2014.

RAMACHANDRIYA, K. D. et al. Bioresource Technology Effect of high dry solids loading on enzymatic hydrolysis of acid bisulfite pretreated Eastern redcedar. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 168–176, 2013.

RAMESH K. S.; JAN, B. W.; VICKI, L. B.; XUEHAO, L; CHAN, W. G.; MOHAMMAD, R. H. Characterization of chars from pyrolysis of lignin. **Fuel**, v.83 p. 1469-1482, 2004.

REIS, C. L.; ALEXANDRE-SILVA, L. M.; RODRIGUES, T. H. S.; FELIX, A. K. N.; SANTIAGO-AGUIAR, R. S.; CANUTO, K. M. Bioresource Technology Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids : Enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 694–701, 2016.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MACEDO, G. R.; GONÇALVES, L. R. B. Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Pretreated Cashew Apple Bagasse with Diluted Sulfuric Acid for Bioethanol Production, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, p. 407–417, 2009.

ROCHA, M.V.P.; RODRIGUES, T.H.S.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L.R.B.; MACEDO, G.R. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, v.38, p.1099-1107, 2011.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; ALBUQUERQUE, T. L.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 243, p. 234–243, 2014.

RODRIGUES, T. H. S.; DANTAS, M. A. A.; PINTO, G. A. S.; GONCALVES, L. R. B., Tannase Production by Solid State Fermentation of Cashew Apple Bagasse. **AppliedBiochemistry and Biotechnology**, v. 136, p. 675 – 688, 2007.

RODRIGUES, T. H. S.; ROCHA, M. V. P.; MACEDO, G. R.; GONÇALVES, L. R. B. Ethanol production from cashew apple bagasse: Improvement of enzymatic hydrolysis by microwave-assisted alkali pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 6, p. 929–943, 2011.

RODRIGUES, T. H. S.; BARRROS, E. M.; BRÍGIDO, J. S.; SILVA, W. M.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. The Bioconversion of Pretreated Cashew Apple Bagasse into Ethanol by SHF and SSF Processes. **Appl Biochem Biotechnol.**, v.178 p. 1167–1183, 2016.

ROGERS, P. L.; JEON, Y. J.; LEE, K. J.; LAWFORD, H. G. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. **Adv Biochem Eng Biotechnol.**, v. 108, p. 263-288, 2007.

RUDOLF, A.; ALKASRAWI, M.; ZACCHI, G.; LÍDEN, G., A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme and Microbial Technology.**, v. 37, p.195–204, 2005.

RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, M. A.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Hydro- thermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review. **Renew Sust Ener.**, v.21, p. 35e51, 2013.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. **Biotechnology Progress.**, v. 22, p. 449–453, 2007.

SAHA, B. C.; NUCHOLS, N. N.; QURESHI, N.; KENNEDY, G. J.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A. Pilot scale conversion of wheat straw to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology.**, v. 175, p. 17–22, 2015.

SELIG, M. J.; VINZANT, T. B.; HIMMEL, E. M.; DECKER, S.R. The effect of lignin removal by alkaline peroxide pretreatment on the susceptibility of corn stover to purified cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Appl Biochem Biotechnol.**, v.155, p. 397-406, 2009.

SERPA, J. F. **Produção da enzima xilose redutase por Candida tropicalis ATCC750 usando hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju**, 2016, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 2016.

SHEN, F., SADDLER, J.N., LIU, R., LIN, L., DENG, S., ZHANG, Y., YANG, G., XIAO, H., LI, Y. Evaluation of steam pretreatment on sweet sorghum bagasse of enzymatic hydrolysis and bioethanol production. **Carbohydr. Polym.**, 86, 1542–1548. 2011.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Quim. Nova.**, v. 32, p. 661-671, 2009.

SILVA, C. G.; GRELIER, S.; PICHAVANT, F.; FROLLINI, E.; CASTELLAN, A. Adding value to lignins isolated from sugarcane bagasse and Miscanthus. **Industrial**

**Crops and Products.**, v.42, p. 87– 95, 2013.

SILVA, N. C. G.; SOUZA M. C. M.; SILVA JR, I. J.; SANTOS, Z. M.; ROCHA, M. V. P. Removal of Reactive Turquoise Blue Dye from Aqueous Solution Using a Non-Conventional Natural Adsorbent. **Separation Science and Technology.**, v. 50, n. 11, p. 1616–1628, 2015.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass-an overview. **Bioresour. Technol.**, v. 199, p. 76–82, 2016.

SINGH, A.; BISHNOI, N. R.; Ethanol production from pretreated wheat straw hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* via sequential statistical optimization. **Industrial Crops and Products.**, v. 41, p. 221-226, 2013.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, A.; SLUITER, J.; TEMPLETON D.; WOLFE, J. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples **Laboratory Analytical Procedure (LAP)** Issue Date: 3/31/2008. Technical Report NREL/TP-510-42621 Revised March 2008a.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass **Laboratory Analytical Procedure (LAP)** Issue Date: 4/25/2008 Technical Report NREL/TP-510-42618Revised April 2008b.

SU, R.; MA, Y.; QI, W.; ZHANG, M.; WANG, F.; DU, R. Ethanol production from high-solid SSCF of alkaline-pretreated corncob using recombinant *Zymomonas mobilis* CP4. **Bioenergy Res.**, v. 6, p. 292–9, 2013.

SUN, Y.; CHENG, J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology.**, v. 96, n. 14, p. 1599–1606, 2005.

SURYAWATI, L.; WILKINS, M.R.; BELLMER, D.B.; HUHNKE, R.L.; MANESS, N.O.; BANAT, I.M., Simultaneous Saccharification and Fermentation of Kanlow Switchgrass Pretreated by Hydrothermolysis Using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. **Biotechnology and Bioengineering.**, v. 101, No. 5, 2008.

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

VANDERGHEM, C., RICHEL, A., JACQUET, N., BLECKER, C., PAQUOT, M., Impact of formic/acetic acid and ammonia pre-treatments on chemical structure and physico-chemical properties of *Miscanthus giganteus* lignin. **Polymer Degradation and Stability.**, v.96, p. 1761–1770, 2011.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I., A review of lignocellulose bioconversion using

enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy, **Biotechnology Advances.**, v. 30, p. 1458-1480, 2012.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA JR., M. B. e PEREIRA JR., N., Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation, **Applied Biochemistry and Biotechnology.**, v. 136, p. 141-154, 2007.

VARGA, E.; KLINKE, H.; RECZEY, K.; THOMSEN, A.; High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 88, p. 567–574, 2004.

VIMONSES, Vipasiri et al. Kinetic study and equilibrium isotherm analysis of Congo Red adsorption by clay materials. **Chemical Engineering Journal.**, Philadelphia, p. 354-364. 9 set. 2008.

ZHANG, Y. H.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnol Bioeng.**, v. 30, p. 797-824, 2004.

ZHANG, M. et al. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. **Bioresource Technology.**, v. 101, n. 13, p. 4959–4964, 2010.

ZHAO, J., XIA, L. Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain. **Fuel Processing Technology.**, v. 90, p. 1193–1197, 2009.

ZHU, J. Y., WANG, G. S., PAN, X. J. GLEISNER R. L. et al. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology.**, v. 99, n. 9, p. 3817–3828, 2008.

WANG, W.; KANG, L.; WIE, H.; ARORA, R.; LEE, Y. Y., Study on the decreased sugar yield in enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate at high solid loading. **Applied Biochemical Biotechnology.**, v. 164 (7), p. 1139-1149, 2011.

WATANABE, T.; SRICHUWONG, S.; ARAKANE, M.; TAMIYA, S.; YOSHINAGA, M.; WATANABE, I.; YAMAMOTO, M.; ANDO, A.; TOKUYASU, K.; NAKAMURA, T., Selection of stress-tolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash to ethanol. **Bioresource Technology.**, v. 101, p. 9710-9714, 2010.

WEN, F.; NAIR, N. U.; ZHAO, H., Protein engineering in designing tailored enzymes and microorganisms for biofuels production. **Current Opinion in Biotechnology.**, v. 20, p. 412– 419, 2009.

WILKINS MR, MUELLER M, EICHLING S, BANAT I M Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IBM2, IBM4 and IBM5 under anaerobic conditions. **Process Biochem.**, v.43, p.346-350, 2008.

YAMASHITA, Y.; SHONO, M.; SASAKI, C.; NAKAMURA, Y. Alkaline peroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of bamboo. **Carbohyd Polym.**, v. 79, p. 914–20, 2010.

YANASE, S.; HASUNUMA, T.; YAMADA, R.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA H. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. **Applied Microbiology Biotechnology.**, v. 88, p. 381-388, 2010.

YANG M, LI W, LIU B, LI Q, XING J. High-concentration sugars production from cornstover based on combined pretreatments and fed-batch process. **Bioresource Technol.**, v. 101,p. 4884–8, 2010

YEH, R.; LIN, Y. S.; WANG, E. H.; KUAN, W. C.; LEE, W. C. Bioethanol production from pretreated *Miscanthus fl oridulus* biomass by simultaneous saccharification and fermentation. **Biomass and Bioenergy.**, v. 94, p. 110–116, 2016.