

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CAMPUS CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

ESTRATÉGIAS VISANDO À MELHORIA DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR
***Kluyveromyces marxianus* PELO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO SIMULTÂNEA À**
FERMENTAÇÃO DE CASCAS DE ARROZ

LILLIAN VIEIRA LEONEL

CASCAVEL – PARANÁ – BRASIL

Março - 2020

LILLIAN VIEIRA LEONEL

**ESTRATÉGIAS VISANDO À MELHORIA DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR
Kluyveromyces marxianus PELO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO SIMULTÂNEA À
FERMENTAÇÃO DE CASCAS DE ARROZ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, Área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Profa Dra Luciane Sene.

CASCADEL – PARANÁ – BRASIL

Março – 2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Leonel, Lillian Vieira
ESTRATÉGIAS VISANDO À MELHORIA DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR
Kluyveromyces marxianus PELO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO
SIMULTÂNEA À FERMENTAÇÃO DE CASCAS DE ARROZ / Lillian
Vieira Leonel; orientador(a), Luciane Sene, 2020.
103 f.

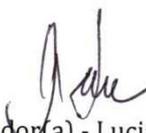
Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do
Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Exatas e
Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Agrícola, 2020.

1. Etanol de segunda geração. 2. Alta carga de sólidos.
3. Biomassa lignocelulósica. 4. Surfactantes. I. Sene,
Luciane. II. Título.

LILLIAN VIEIRA LEONEL

Estratégias visando melhoria da produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* pelo processo de sacarificação simultânea à fermentação de cascas de arroz

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, linha de pesquisa Saneamento Ambiental, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



Orientador(a) - Luciane Sene

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Priscila Vaz de Arruda

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Mário Antônio Alves da Cunha

Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)



Marina Kimiko Kadowaki

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Simone Damasceno Gomes

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Cascavel, 12 de março de 2020

Cascavel, 12 de março de 2020

BIOGRAFIA

Lillian Vieira Leonel, nascida em Ivaiporã – PR, ingressou no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL, no ano de 2006, o qual foi concluído em 2009. Em 2011, ingressou no Curso de Pós-graduação *Lato Sensu* em Educação e Gestão Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Londrina, e concluiu em 2012. Em 2014, obteve o título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola – Área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, com dissertação na área de Saneamento Ambiental, com bolsa Capes. Tem experiência em licenciatura, tendo ministrado as disciplinas de Ciências e Biologia para os ensinos Fundamental e Médio, pela Secretaria de Estado da Educação do Paraná. Em 2016, ingressou no curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola – Área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, com tese na área de Saneamento Ambiental, com bolsa Capes.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter permitido concluir mais esta etapa em minha vida;

À Professora Dra Luciane Sene, pela orientação, amizade, confiança e paciência durante a realização deste trabalho;

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, pela oportunidade e estrutura para a realização do curso e desta pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

A todos os Professores do Programa de pós-graduação, por todo conhecimento e aprendizado adquiridos durante a realização dos créditos e pelo auxílio sempre que precisei;

À minha colega de laboratório, Tania Claudia, pela parceria, por todas as conversas e pela paciência nos momentos difíceis;

Aos técnicos de laboratório Boni, Sircéia, Bia, Odete e Edison, por toda disponibilidade;

Às amigas: Danielle Camargo, Isamara Godoi, Bruna Tavares, Ana Paula Trevisan e Ana Caroline (do grupo do Dingo), pela agradável convivência, pela amizade e por toda a ajuda sempre que precisei;

Ao Prof. Dr. Paulo Rodrigo Stival Bittencourt, do Departamento Acadêmico de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Medianeira, pelas análises de espectrometria FTIR;

Ao Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura;

A todos os colegas da pós-graduação, pela convivência durante a realização do curso;

À Ariane Spiassi, pela realização das análises no HPLC;

Aos funcionários da UNIOESTE;

À minha família, por todo apoio;

Enfim, a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

ESTRATÉGIAS VISANDO À MELHORIA DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Kluyveromyces marxianus* PELO PROCESSO DE SACARIFICAÇÃO SIMULTÂNEA À FERMENTAÇÃO DE CASCAS DE ARROZ

A casca de arroz é um resíduo proveniente do beneficiamento do arroz, sendo um subproduto abundante em países produtores do cereal. Por apresentar teores consideráveis de celulose em sua composição, é uma potencial matéria-prima para utilização em vários bioprocessos, como a produção de etanol. No entanto, vários desafios técnicos precisam ser superados a fim de tornar o processo de produção de etanol de segunda geração economicamente viável e competitivo. Nesse contexto, o processo de sacarificação, simultânea à fermentação (SSF), associado ao aumento da concentração de sólidos, bem como à utilização de surfactantes na hidrólise enzimática, em processos fermentativos, que empregam biomassa lignocelulósica, são estratégias promissoras para a obtenção de maiores rendimentos de açúcares e, conseqüentemente, de etanol. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes estratégias, a fim de obter melhoria na produção de etanol, a partir da fração de celulose presente na casca de arroz, utilizando a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. A primeira estratégia consistiu em realizar a SSF em batelada alimentada, objetivando o aumento da carga de sólidos; a segunda foi avaliar o efeito da adição de surfactantes não iônicos durante a hidrólise enzimática no processo de SSF. Primeiramente, a biomassa de casca de arroz foi submetida à caracterização química quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, antes e após pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio (NaOH) 8% (m/v). A casca de arroz tratada foi submetida à hidrólise enzimática com diferentes cargas enzimáticas (5, 11 e 22 FPU/g_{celulose}) e 10% de sólidos (m/v), a fim de determinar a condição com maior liberação de açúcares redutores para posterior utilização na SSF em batelada alimentada com alta carga de sólidos. Para a SSF em batelada alimentada, foram realizados quatro experimentos com diferentes concentrações de biomassa de cascas de arroz, sendo os experimentos E1 e E2, com carga inicial de 10% e final de 20% (m/v) e E3 e E4 com carga inicial de 15% e final de 25% (m/v), respectivamente, em pH 5,5, 40 °C, 200 rpm, 96 horas. Para isso, foram estabelecidos intervalos de alimentação, sendo duas alimentações a cada 24 horas (E1 e E3) e quatro alimentações a cada 12 horas (E2 e E4). Como segunda estratégia, foi realizada a hidrólise enzimática, com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes cargas de enzima (5; 8; 13,5; 19 e 22 FPU/g_{celulose}), em associação aos surfactantes Polisorbato 80 (PS80) (7,0; 10; 15; 20 e 23 mg/L), Polietilenoglicol 4000 (PEG) (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 3,5 g/L) e Triton X-100 (TX-100) (75; 100; 150; 200 e 225 mg/L), na liberação de glicose, por meio de três experimentos, seguindo um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2², que inclui 4 ensaios nas condições axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 12 ensaios para cada surfactante, além de um experimento controle (com adição de enzima e sem surfactante), em triplicata. A terceira estratégia consistiu na adição de surfactante na SSF, objetivando avaliar a influência do surfactante na produção de etanol. Para isso, foram realizados três experimentos: controle (sem surfactante+19 FPU/g_{celulose}), com adição de Polisorbato 80 (10,0 mg/L+19 FPU/g_{celulose}) e com Polietilenoglicol 4000 (3,0 g/L+19 FPU/g_{celulose}), sendo o tipo de surfactante e respectivas concentrações e carga enzimática selecionados a partir dos resultados da

hidrólise enzimática, que foram significativos. Os experimentos foram feitos com uma proporção de sólidos de 10% (m/v), pH 5,5, 40 °C, 200 rpm, 96 horas, em triplicata. A casca de arroz *in natura* apresentou 36,03% de celulose, 14,71% de hemicelulose e 26,47% lignina e, após o tratamento com NaOH 8% (m/v), os teores dessas frações foram 70,27; 8,39 e 21,34% de celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente. Na SSF em batelada alimentada com alta carga de sólidos, obteve-se produção de etanol de 9,57; 9,92; 13,99 e 12,77 g/L, rendimentos ($Y_{E/C}$) de 0,16; 0,17; 0,18 e 0,18 g/g e produtividade volumétrica (Q_P) de 0,27; 0,28; 0,39 e 0,53 g/L.h⁻¹, para os experimentos E1, E2, E3 e E4, respectivamente. Com relação ao efeito da adição de surfactantes na hidrólise enzimática, as concentrações de glicose variaram de 32,36 a 79,57 g/L, com adição de PS80, de 45,14 a 74,60 g/L, com PEG e 32,28 a 47,89 g/L, com adição de TX-100, enquanto o controle apresentou de 20,36 a 47,77 g/L, em 96 horas. Apenas os surfactantes PS80 e PEG, em associação a diferentes cargas de enzimas, promoveram efeitos significativos ($p < 0,05$), sendo a carga enzimática o fator que mais influenciou o aumento da produção final de glicose. Em relação à SSF com surfactante, a adição de PS80 (10 mg/L) e PEG (3,0 g/L), em associação a 19 FPU/g_{celulose}, resultou em 6,73 e 8,17 g/L de etanol, $Y_{E/C}$ de 0,17 e 0,21 g/g e Q_P de 0,56 e 0,68 g/L.h⁻¹, em 12 horas de fermentação, respectivamente. No controle, com adição da mesma carga enzimática (19 FPU/g_{celulose}) e sem surfactante, a produção de etanol foi 5,02 g/L, com $Y_{E/C}$ de 0,13 g/g e Q_P de 0,14 g/L.h⁻¹, em 36 horas. Os resultados sugerem que a casca de arroz é uma matéria-prima que pode ser utilizada como substrato em bioprocessos, por apresentar teor de celulose semelhante ao de outras biomassas lignocelulósicas. As diferentes estratégias de alimentação com casca de arroz, utilizadas na SSF em batelada alimentada, não resultaram aumentos substanciais na produção de etanol. A adição dos surfactantes PS80 e PEG, durante a hidrólise enzimática, resultou aumentos significativos à produção final de glicose. Na SSF, os mesmos surfactantes contribuíram para um ligeiro aumento na produção de etanol em um tempo menor de fermentação, comparado ao controle.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica. Hidrólise enzimática. Batelada alimentada. Surfactantes.

ABSTRACT

ESTRATEGIES FOR THE IMPROVEMENT OF ETHANOL PRODUCTION BY *Kluyveromyces marxianus* BY SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION PROCESS OF RICE HUSKS

Rice husk is a waste derived from rice milling and is an abundant byproduct in cereal producing countries. Due to the considerable contents of cellulose in its composition, it is a potential raw material for use in various bioprocesses, such as ethanol production. However, several technical challenges must be overcome to make the second-generation ethanol production process economically viable and competitive. In this context, the process of simultaneous saccharification and fermentation (SSF), associated with the increase of solids concentration, as well as the use of surfactants in enzymatic hydrolysis in fermentation processes that employ lignocellulosic biomass are promising strategies to obtain higher sugar yields and consequently ethanol. Thus, the objective of this work was to evaluate different strategies to obtain an improvement in ethanol production from rice husk cellulose, using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. The first strategy was to carry out the fed batch SSF to increase the solids load; the second was to evaluate the effect of adding nonionic surfactants during enzymatic hydrolysis in the SSF process. First, rice husk biomass was subjected to chemical characterization for cellulose, hemicellulose, and lignin content, before and after alkaline pretreatment with 8% (w/v) sodium hydroxide (NaOH). The pretreated rice husk was subjected to enzymatic hydrolysis with different enzyme loading (5, 11, 22 FPU/g_{cellulose}) and 10% solids (w/v) to determine the condition with increased release of reducing sugars for subsequent SSF use in batch fed with high solids loading. For the SSF in fed batch, four experiments were performed with different biomass concentrations of rice husk, being E1 and E2 experiments with initial load of 10% and final 20% (w/v) and E3 and E4 with initial load 15% and final 25% (w/v), respectively, at pH 5.5; 40 °C, 200 rpm, 96 hours. Thus, feeding intervals were established, with two feedings every 24 hours (E1 and E3) and four feedings every 12 hours (E2 and E4). As a second strategy, enzymatic hydrolysis was carried out, with the objective of evaluating the effect of different enzyme loads (5; 8; 13.5; 19 and 22 FPU/g_{cellulose}) it was evaluated in association with Polysorbate 80 (PS80) surfactants (7.0, 10, 15, 20 and 23 mg/L), Polyethylene glycol 4000 (PEG) (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 3.5 g/L) and Triton X-100 (TX-100) (75; 100; 150, 200 and 225 mg/L) in glucose release through three experiments following a central rotational composite design (DCCR) 2², including 4 axial conditions and 4 center point repetitions, totaling 12 assays for each surfactant, besides a control experiment (with enzyme addition and without surfactant), in triplicate. The third strategy consisted of adding the surfactant SSF, to evaluate the influence of the surfactant in the production of ethanol. For this, three experiments were performed: control (without surfactant + 19 FPU/g_{cellulose}), with addition of Polysorbate 80 (10.0 mg/L + 19 FPU/g_{cellulose}) and with Polyethylene Glycol 4000 (3.0 g/L + 19 FPU/g_{cellulose}), the type of surfactant and respective concentrations and enzyme load selected from the results of enzymatic hydrolysis that were significant. The experiments were carried out with a solids ratio of 10% (m / v), pH 5.5, 40 °C, 200 rpm, 96 hours, in triplicate. The chemical composition of rice husk was 36.03% cellulose, 14.71% hemicellulose and 26.47% lignin and after pretreatment with 8% NaOH (w/v) the content of these fractions was 70.27; 8.39 and 21.34% cellulose, hemicellulose, and lignin, respectively. In the fed batch SSF with high solids loading, an ethanol production was obtained of 9.57; 9.92; 13.99 and 12.77 g/L, yields ($Y_{E/C}$) of 0.16; 0.17; 0.18 and 0.18 g/g and volumetric productivity (Q_p) of 0.27; 0.28; 0.39 and 0.53 g/L.h⁻¹ for the experiments E1, E2, E3 and E4, respectively. For the enzymatic hydrolysis, glucose concentrations ranged from 32.36 to 79.57 g/L with PS80 addition, from 45.14 to 74.60 g/L with PEG and 32.28 to 47.89 g/L with addition of TX-100, while the control showed from 20.36 to 47.77 g/L in 96 hours. Only the

surfactants PS80 and PEG in association with different enzyme loads promoted significant effects ($p < 0.05$), the enzymatic load being the factor that most influenced the increase of final glucose production. Regarding SSF with surfactant, the addition of PS80 (10 mg/L) and PEG (3.0 g/L) in association with 19 FPU/g_{cellulose} resulted in 6.73 and 8.17 g/L of ethanol, $Y_{E/C}$ of 0.17 and 0.21 g / g and Q_p of 0.56 and 0.68 g/Lh⁻¹, in 12 hours of fermentation, respectively. The results suggest that rice husk is a raw material that can be used as a substrate in bioprocesses because it has a cellulose content similar to that of other lignocellulosic biomasses. The different rice husk feeding strategies used in fed batch SSF did not result in substantial increases in ethanol production. The addition of surfactants PS80 and PEG during enzymatic hydrolysis resulted in significant increases in final glucose production. In SSF, the same surfactants contributed to a slight increase in ethanol production in a shorter fermentation time, compared to the control.

Key-words: Lignocellulosic biomass, Enzymatic hydrolysis, Fed batch, Surfactants.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 A casca de arroz.....	19
3.2 Biomassa lignocelulósica: potencial aplicação como matéria prima em bioprocessos ...	19
3.3 Produção de etanol de segunda geração.....	21
3.3.1 Hidrólise enzimática da celulose	23
3.3.2 Fermentação dos açúcares.....	25
3.3.2.1 A levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	26
3.3.2.2 Sacarificação simultânea à fermentação com altas cargas de sólidos	27
3.3.3 Uso de surfactantes na hidrólise enzimática e na sacarificação simultânea à fermentação.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Matéria-prima.....	32
4.1.1 Casca de arroz.....	32
4.1.2 Determinação da composição química da casca de arroz	32
4.2 Pré-tratamento da casca de arroz.....	33
4.2.1 Espectrometria de absorção na região infravermelha (FTIR)	33
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	34
4.3 Microrganismo e preparo do inóculo	34
4.4 Parte I - Efeito da alimentação no processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) da celulose de casca de arroz	34
4.4.1 Determinação da carga enzimática	35
4.4.2 Sacarificação simultânea à fermentação em batelada alimentada	36
4.5 Parte II - Efeito da adição de surfactante durante a hidrólise enzimática da celulose de casca de arroz	37
4.6 Parte III - Efeito da adição de surfactante no processo de sacarificação simultânea à fermentação da celulose de casca de arroz.....	39
4.6.1 Sacarificação simultânea à fermentação com adição de surfactante	39
4.7 Métodos analíticos	41
4.7.1 Determinação do teor de cinzas total	41
4.7.2 Determinação do teor de umidade	41

4.7.3 Determinação do teor de proteínas	42
4.7.4 Determinação de extrativos.....	42
4.7.5 Determinação de celulose, hemicelulose e lignina	43
4.7.5.1 Determinação da lignina insolúvel.....	43
4.7.5.2 Determinação da lignina solúvel.....	44
4.7.5.3 Lignina total	44
4.7.5.4 Determinação dos teores de celulose e hemicelulose	45
4.7.6 Determinação da concentração de glicose, xilose, celobiose, ácido acético, glicerol e etanol.....	45
4.7.7 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural	46
4.7.8 Determinação da concentração de fenóis	46
4.7.9 Determinação da atividade enzimática.....	46
4.7.10 Determinação da concentração celular	47
4.7.11 Determinação do pH	47
4.8 Cálculo dos parâmetros fermentativos	48
4.8.1 Produtividade volumétrica em etanol (Q_p).....	48
4.8.2 Fator de conversão da celulose em etanol ($Y_{E/C}$).	48
4.8.3 Eficiência de conversão de celulose (ECC).....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Análise da composição química da casca de arroz antes e após tratamento alcalino	50
5.2 Parte I - Efeito da alimentação no processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) da celulose de casca de arroz	55
5.2.1 Determinação da carga enzimática	55
5.2.2 Sacarificação simultânea à fermentação com elevada carga de sólidos	57
5.2.2.1 Variação nas concentrações de açúcares e produção de etanol.....	57
5.2.2.2 Formação de ácido acético e glicerol	62
5.3 Parte II - Efeito da adição de surfactante durante a hidrólise enzimática da celulose de casca de arroz	64
5.3.1 Variação nas concentrações e rendimentos de glicose.....	64
5.3.2 Análise dos perfis cinéticos da hidrólise enzimática com adição de Polisorbato 80 e Polietilenoglicol-4000	68
5.3.3 Avaliação do efeito da adição dos surfactantes por meio da análise estatística do Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR)	72
5.4 Parte III - Efeito da adição de surfactante no processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) da celulose de casca de arroz.....	76
5.4.1 Variação nas concentrações de açúcares e produção de etanol.....	76
5.4.2 Formação de ácido acético e glicerol	80
6 CONCLUSÕES	83

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
8 REFERÊNCIAS	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Estratégias de alimentação de carga de sólidos empregadas nos quatro experimentos de SSF com biomassa de casca de arroz pré-tratada	37
Tabela 2 Matriz de planejamento para avaliação da adição dos diferentes surfactantes em associação a diferentes cargas enzimáticas, utilizados durante a hidrólise enzimática da celulose da casca de arroz	38
Tabela 3 Composição química da casca de arroz in natura e após pré-tratamento com NaOH 8% (m/v)	50
Tabela 4 Comparação da composição química da casca de arroz usada neste trabalho em relação a diferentes biomassas lignocelulósicas.....	51
Tabela 5 Bandas de vibração no infravermelho observadas na casca de arroz após pré-tratamento alcalino (NaOH 8%, 121 °C, 30 min, autoclave) e grupos funcionais atribuídos.	55
Tabela 6 Número de células, pH e parâmetros obtidos no processo de SSF conduzido a 40 °C, 200 rpm por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 utilizando diferentes estratégias de alimentação com cargas de sólidos (concentração de biomassa).....	60
Tabela 7 Concentração de glicose e rendimentos obtidos durante a hidrólise enzimática da celulose da casca de arroz com e sem adição do surfactante Polisorbato 80 (PS80).....	65
Tabela 8 Concentração de glicose e rendimentos obtidos durante a hidrólise enzimática da celulose da casca de arroz com e sem adição do surfactante Polietilenoglicol 4000 (PEG)	66
Tabela 9 Concentração de glicose e rendimentos, obtidos durante a hidrólise enzimática da celulose da casca de arroz com e sem adição do surfactante Triton X-100 (TX-100).....	67
Tabela 10 Análise de variância (ANOVA) para concentração de glicose (g/L) ao nível de 95% de confiança	74
Tabela 11 Número de células, pH e parâmetros obtidos no processo de SSF conduzido a 40 °C, 200 rpm e 10% sólidos (m/v) por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907, com e sem adição de surfactante.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Principais frações que compõem a biomassa lignocelulósica e as respectivas estruturas das moléculas de: (A) celulose; (B) hemicelulose e (C) lignina..	20
Figura 2 Representação das etapas de produção de etanol de segunda geração..	22
Figura 3 Representação simplificada da atuação das celulases.....	24
Figura 4 Aspecto macroscópico da casca de arroz utilizada nos experimentos.	32
Figura 5 Esquema das etapas para realização dos experimentos de SSF em batelada alimentada com alta carga de sólidos.	35
Figura 6 Esquema das etapas para realização dos experimentos de hidrólise enzimática com e sem adição de surfactantes.....	39
Figura 7 Esquema das etapas para realização dos experimentos de SSF com e sem adição de surfactantes.	40
Figura 8 Micrografias eletrônicas da casca de arroz reduzida a partículas de 50 mesh, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
Figura 9 Espectro FTIR da casca de arroz <i>in natura</i> e após pré-tratada com NaOH 8% (121 °C, autoclave, 30 min.).....	54
Figura 10 Perfil de liberação de AR durante a hidrólise enzimática da celulose da casca de arroz, após 96 horas de processo utilizando diferentes quantidades de enzima.	56
Figura 11 Concentração de glicose, celobiose e produção de etanol por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 durante a SSF em batelada alimentada.	58
Figura 12 Formação de ácido acético e glicerol em comparação ao perfil de consumo de glicose por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 durante a SSF em batelada alimentada.....	63
Figura 13 Perfis cinéticos da hidrólise enzimática da casca de arroz com e sem a adição do surfactante Polisorbato 80 (PS80) e diferentes cargas enzimáticas.....	70
Figura 14 Perfis cinéticos da hidrólise enzimática da casca de arroz com e sem a adição do surfactante Polietilenoglicol 4000 (PEG) e diferentes cargas enzimáticas	71
Figura 15 Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados para os fatores investigados e suas interações sobre a concentração de glicose ao nível de 95% de confiança.....	73
Figura 16 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para concentração de glicose obtida a partir da hidrólise enzimática da casca de arroz em função das concentrações de Polisorbato 80 e enzima.	75
Figura 17 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para concentração de glicose obtida a partir da hidrólise enzimática da casca de arroz em função das concentrações de Polietilenoglicol 4000 e enzima.....	76
Figura 18 Concentração de açúcares e produção de etanol por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 durante a SSF com e sem a adição de surfactantes.....	77

Figura 19 Formação de ácido acético e glicerol por *K. marxianus* ATCC 36907 durante a SSF com e sem a adição de surfactantes..... 81

1 INTRODUÇÃO

A casca de arroz é um subproduto do beneficiamento de arroz, sendo abundante em países produtores desse cereal. Características relacionadas à baixa digestibilidade, devido à presença de sílica e altos teores de cinzas, além do baixo valor nutricional, dificultam a aplicação desse resíduo na alimentação animal. A principal destinação da casca de arroz ainda é a sua queima para produção de energia, gerando como resíduo grandes volumes de cinzas, que também necessitam de uma destinação adequada. No entanto, outras aplicações tecnológicas da casca de arroz vêm sendo avaliadas em diversas áreas, como biotecnologia, ambiental, construção civil, dentre outras. Porém, a maioria das biomassas lignocelulósicas apresenta potencial para utilização como matéria-prima, em vários bioprocessos, a exemplo da produção de etanol, por apresentar teores consideráveis de celulose em sua composição.

O aproveitamento de matérias-primas residuais, não apenas para a produção de energia e calor, mas também para a geração de produtos tecnológicos, é uma alternativa para minimizar os impactos negativos da destinação inadequada desses materiais ao meio ambiente. Nesse sentido, são crescentes os estudos referentes à produção biotecnológica de etanol, a partir de biomassa lignocelulósica, por caracterizar uma fonte de energia limpa, renovável e abundante no meio ambiente. Além disso, a produção de etanol, a partir de biomassa lignocelulósica, contribui para o aumento de recursos energéticos, sem competir com a produção de alimentos, além de reduzir a emissão de gases poluentes para a atmosfera.

No entanto, a produção de etanol de segunda geração, até agora, enfrenta muitos desafios para tornar-se um processo economicamente viável. Os custos ainda são elevados, se comparados aos do etanol de primeira geração, pois a tecnologia ainda não está consolidada, havendo vários desafios técnicos a serem superados que possibilitem a integração dos processos de produção.

Para isso, as etapas de pré-tratamento para a separação das frações que compõem a biomassa lignocelulósica, a hidrólise enzimática e a fermentação precisam ser otimizadas, de forma a se obter maiores rendimentos de etanol e redução de custos. Alguns dos maiores gargalos estão na obtenção de altos rendimentos em açúcares, na etapa de hidrólise, com reduzidas cargas de enzimas.

Diferentes estratégias fermentativas têm sido pesquisadas para melhorar a produção de etanol de segunda geração. A utilização de altas concentrações de sólidos (fração celulósica de casca de arroz), em processos fermentativos de sacarificação, simultânea à fermentação (SSF), é uma alternativa promissora para aumentar os rendimentos de açúcares, no entanto, encontrar a melhor condição de alimentação e

otimizar a concentração de enzimas, de forma a melhorar o desempenho, são ainda desafios a serem enfrentados.

O emprego de surfactantes, durante a sacarificação ou SSF, é uma forma de potencializar a ação enzimática, contribuindo para a redução da carga enzimática, pois os surfactantes minimizam problemas de adsorção improdutivo de enzimas que, conseqüentemente, resultam em baixas conversões de celulose em açúcares.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização da casca de arroz, como matéria-prima para produção de etanol, pela levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus*, empregando diferentes estratégias, como SSF em batelada alimentada, visando incrementar a carga de sólidos, bem como o uso de surfactantes durante a SSF, com o intuito de melhorar a sacarificação enzimática.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar diferentes estratégias para melhorar a produção de etanol por sacarificação, simultânea à fermentação (SSF) de cascas de arroz, utilizando a levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Para isso, os objetivos específicos foram:

- Analisar a composição química da casca de arroz, antes e após tratamento alcalino com NaOH 8% (m/v), quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina residuais;
- Determinar a melhor carga enzimática durante a hidrólise enzimática da fração celulósica da casca de arroz pré-tratada, para utilização na SSF, em batelada alimentada com alta carga de sólidos;
- Avaliar o efeito da estratégia de alimentação na SSF, em batelada alimentada com diferentes cargas de sólidos (fração celulósica da casca de arroz tratada);
- Avaliar o efeito da adição dos surfactantes Polisorbato 80, Polietilenoglicol 4000 e Triton X-100, no desempenho da hidrólise enzimática da fração celulósica da casca de arroz;
- Avaliar a influência da adição do surfactante na produção de etanol, durante a SSF da fração celulósica da casca de arroz.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A casca de arroz

O arroz (*Oryza sativa*) é um cereal consumido mundialmente, sendo o Brasil um dos maiores produtores, pois concentra a maior parte da produção (82,7%) na região Sul (CONAB, 2019). No Brasil, a safra 2018/2019 atingiu uma produção de 10.428,1 milhões de toneladas do cereal, segundo dados da CONAB (2019). Considerando que, para cada tonelada de grãos colhidos, são gerados, em média, 220 kg de cascas (DIAS et al., 2012), pode-se estimar que cerca de 2.294 mil toneladas de cascas de arroz poderão ser disponibilizadas.

A casca de arroz é um subproduto abundante nos países produtores de arroz (DUTTA et al., 2014). É resultado da etapa de moagem durante o beneficiamento do grão e corresponde a 20% do peso do grão, porém, apresenta baixo valor agregado para utilização em ração animal, devido a características como baixo teor nutricional e baixa digestibilidade (WEI et al., 2009); isso tendo em vista a presença de elevados teores de sílica e cinzas em sua composição (BAZARGAN et al., 2015).

Por apresentar um alto poder calorífico, a principal destinação para a casca de arroz é a sua queima direta para a geração de energia, na forma de calor (DELLA; KHÜN; HOTZA, 2001; FOLLETO et al., 2005). Porém, outras aplicações tecnológicas para esse resíduo vêm sendo estudadas, como extração de sílica pura (BAKAR; YAHYA; GAN, 2016), produção de cerâmicas refratárias (SOBROSA et al., 2017), bio-óleo e biochar (BISWAS et al., 2017), ingrediente para baterias de lítio (JUNG et al., 2013), adsorção de metais pesados em solução aquosa (NAIYA et al., 2009), materiais de construção (HOSAIN; SARKER; BASAK, 2014) e tijolos (ELICHE-QUESADA et al., 2017).

Com uma composição média de 33-36% de celulose, 12-18% de hemicelulose e 24-29% de lignina (HICKERT et al., 2013; CABRERA et al., 2014; ZHANG et al., 2015 e MONTIPÓ et al., 2019), a casca de arroz apresenta-se como uma fonte em potencial de carboidratos para processos fermentativos, a exemplo da produção de etanol, dentre outros produtos biotecnológicos.

3.2 Biomassa lignocelulósica: potencial aplicação como matéria-prima em bioprocessos

A biomassa lignocelulósica consiste na mais abundante fonte renovável de carbono, contendo cerca de 70% de polissacarídeos em peso seco (ZHANG et al., 2016). As principais frações que compõem a biomassa lignocelulósica são a celulose, a hemicelulose e a lignina, que estão ligadas fortemente por ligações covalentes e não covalentes (SUN et

al., 2016), além de pectina, cinzas, sais e minerais (RAVINDRAN e JAISWAL, 2016). Os seus teores na biomassa podem variar de acordo com a espécie vegetal.

A celulose (Figura 1A) é a fração mais abundante na biomassa, sendo um polímero constituído por moléculas de glicose ($C_6H_{12}O_6$), unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4, formando uma cadeia linear, com alto grau de polimerização, que contém vários radicais hidroxila, unidos por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, o que resulta em uma estrutura cristalina (SUN et al., 2016). A celulose cristalina constitui a maior proporção da celulose, enquanto que uma pequena percentagem de cadeias de celulose não organizadas forma a celulose amorfa, a qual consiste na região mais suscetível à degradação enzimática (BAJPAI, 2016).

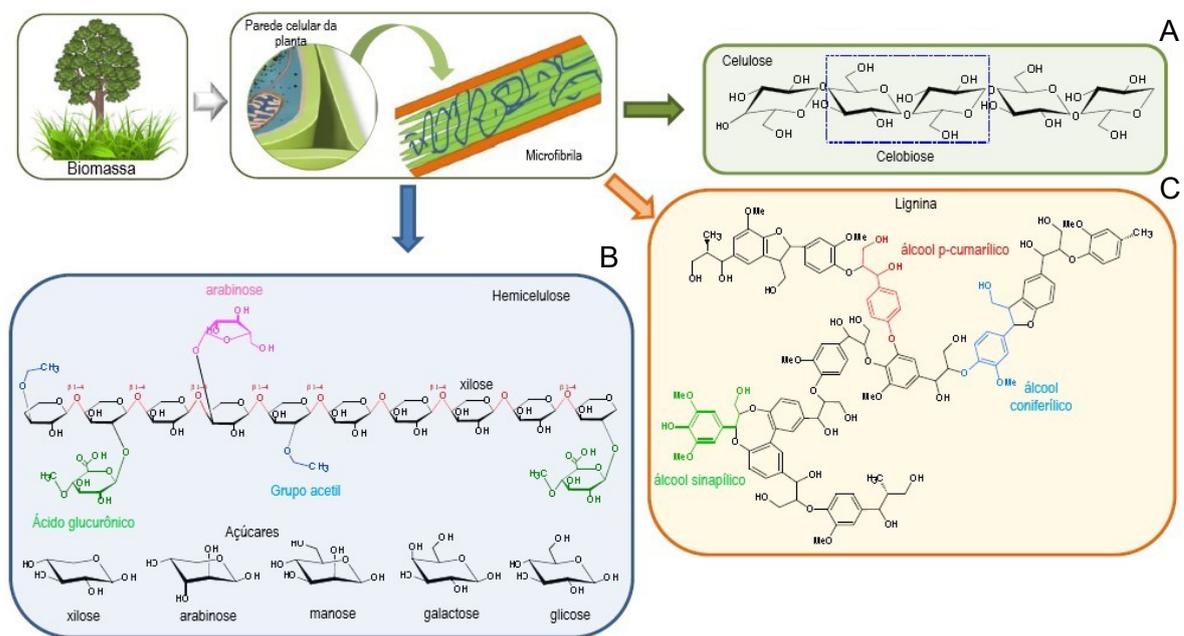


Figura 1 Principais frações que compõem a biomassa lignocelulósica e as respectivas estruturas das moléculas de: (A) celulose; (B) hemicelulose e (C) lignina. Fonte: Adaptado de Mussato; Dragone (2016).

A hemicelulose (Figura 1B) consiste em um polissacarídeo ramificado, intimamente associado à celulose, formado por pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), além de ácidos urônicos (GÍRIO et al., 2010). De acordo com a biomassa vegetal, a hemicelulose difere na sua composição quanto ao tipo de açúcar presente na cadeia principal do polímero, podendo ser classificada como xilana (formada por xilose e arabinose), ou como glicomanana (formada por glicose e manose) (BAJPAI, 2016).

Já a lignina, é uma macromolécula polifenólica (Figura 1C), formada a partir de precursores fenilpropanoides, como guaiacil (G), siringil (S) e p-hidroxifenil (H), sendo considerada a fração mais recalcitrante presente na parede celular vegetal; confere rigidez e desempenha papel de resistência a patógenos, regulação de água e manutenção da integridade estrutural da parede celular (PU et al., 2013). Segundo Barbosa et al. (2008), os monômeros que compõem a lignina são derivados dos alcoóis coniferílico (G), sinapílico (S) e p-cumarílico (H). De acordo com a espécie vegetal, a composição e o conteúdo de lignina pode variar (BECKER; WITTMANN, 2019).

A biomassa lignocelulósica é uma potencial matéria-prima de baixo custo, sendo alvo de pesquisas para aplicação em bioprocessos e obtenção de diversos produtos biotecnológicos, como enzimas celulases em cultivo sólido e submerso de bagaço de cana-de-açúcar (CUNHA et al., 2012), digestão anaeróbica de palha de trigo para produção de biogás (MANCINI et al., 2018), acetona, butanol e etanol, a partir do hidrolisado hemicelulósico de polpa de madeira (GUAN et al., 2018), ácido láctico, a partir de sacarificação simultânea e co-fermentação (SSCF) de diferentes biomassas (GREWAL; KHARE, 2018), ácido succínico, a partir da celulose de bagaço de sorgo sacarino (LO et al., 2020), síntese de poliéster (Poli-hidroxicanoato), utilizando hidrolisado de madeira (KUCERA et al., 2017), entre outras.

Além da fração de carboidratos da biomassa lignocelulósica, a lignina também pode ser utilizada nos bioprocessos, como substrato para produção de ácido cis, cis-mucônico, usado na produção do Nylon (KOHLSTEDT et al., 2018), ácido dicarboxílico aromático para síntese de bioplástico (MYCROFT et al., 2015) e produção de resina de fenol-formaldeído (QIAO et al., 2015).

Esses processos não apenas consistem em alternativas verdes às rotas fósseis (BECKER; WITTMANN, 2019), como estão de acordo com o conceito de biorrefinaria, gerando energia, produtos químicos e materiais, a partir de biomassa renovável sob condições de sustentabilidade (CHANDEL et al., 2018).

3.3 Produção de etanol de segunda geração

O etanol de segunda geração é um biocombustível obtido a partir da biomassa lignocelulósica, sendo uma alternativa sustentável de energia limpa em relação ao modelo extrativista dos recursos fósseis. O Brasil apresenta-se em uma posição de destaque em relação à inserção de renováveis na matriz energética nacional, com uma participação de 45,3%, em 2018, de 43%, em 2017, enquanto que a média mundial, em 2016, foi de 13,7% (BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL, 2019).

A produção de etanol, a partir da biomassa lignocelulósica, requer etapas, como mostra a Figura 2. O processo convencional envolve pré-tratamento, hidrólise ácida ou enzimática para obtenção de monômeros de açúcares, fermentação dos açúcares a etanol por micro-organismos e a destilação (CHOUDHARY; SINGH; NAIN, 2016).

No caso da hidrólise ácida da biomassa, o processo é conduzido em dois estágios; no primeiro, utiliza-se ácido diluído, pois a hemicelulose é mais facilmente solubilizada, enquanto que a celulose é hidrolisada em um segundo estágio, podendo ser utilizado ácido mais concentrado, o qual tem como desvantagens a dificuldade na recuperação e reciclagem de ácidos. Isso resulta em aumentos no custo de produção (AZHAR et al., 2017), pois a formação de inibidores do metabolismo microbiano, provenientes da degradação de açúcares, como furfural e HMF (HANLY; HENSON, 2014), também podem ser degradados originando outros subprodutos tóxicos, como ácido fórmico e levulínico (KANCHANALAI et al., 2016), além da corrosão de equipamentos (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

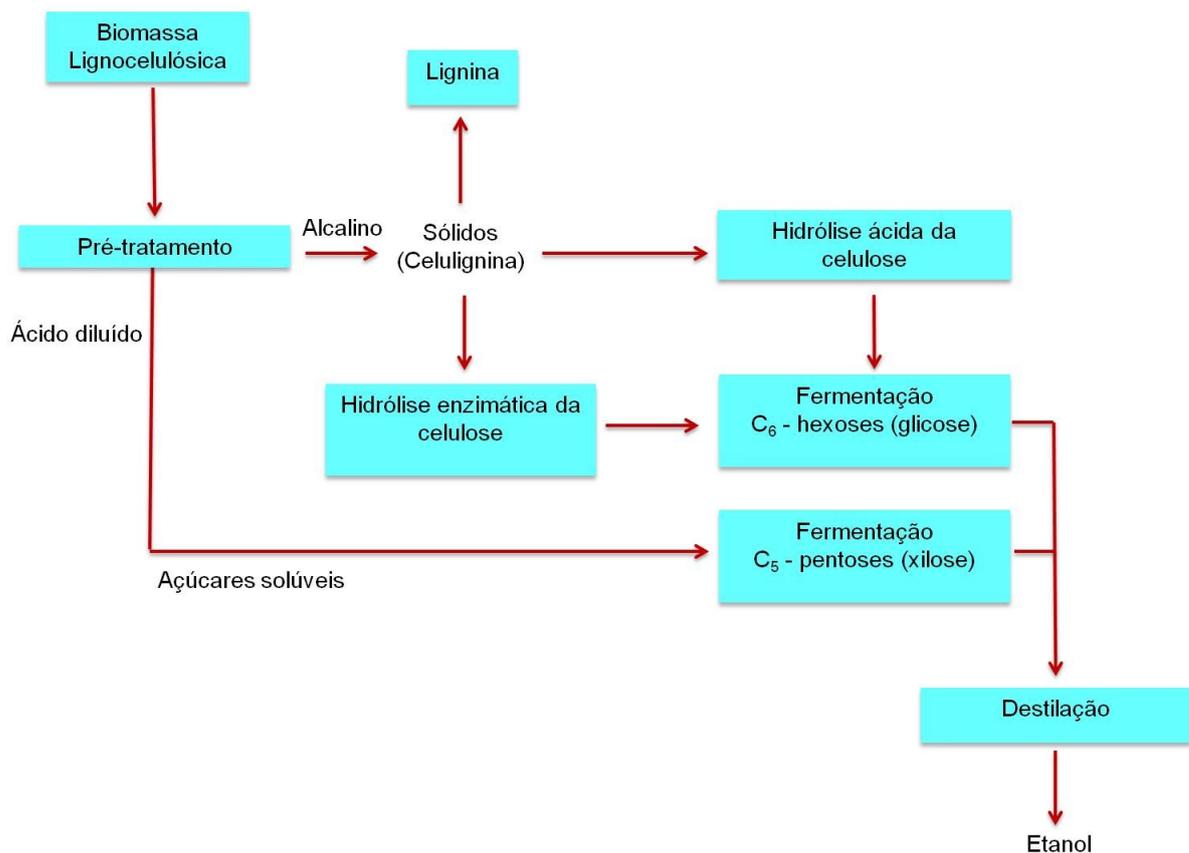


Figura 2 Representação das etapas de produção de etanol de segunda geração. Fonte: Adaptado de Wingren et al. (2003) e Pereira Jr. et al. (2008).

O pré-tratamento é uma etapa essencial para o desempenho e eficiência do processo, pois o uso da celulose nativa requer alta quantidade de enzimas e resulta em baixo rendimento da sua digestibilidade (MOOD et al., 2013).

Dentre os objetivos dos pré-tratamentos, destacam-se a redução da cristalinidade da celulose, separação do complexo celulignina, com conseqüente aumento da área de superfície à ação enzimática, preservação das pentoses (açúcares de cinco carbonos); com isso, há obtenção de maiores rendimentos em açúcares, com uma formação limitada de compostos inibidores, provenientes da degradação dos próprios componentes da biomassa (BEHERA et al., 2014). São diversos os tipos de pré-tratamentos utilizados, que atuam de diferentes formas sobre os componentes da biomassa, por exemplo, hidrólise ácida (DAGNINO et al., 2013), tratamento alcalino (CABRERA et al., 2014), explosão a vapor (NIEML et al., 2017) e hidrotérmico (SAHA et al., 2013).

Pré-tratamentos com ácidos diluídos promovem a hidrólise da hemicelulose em monômeros, tornando a celulose mais acessível, enquanto que o tratamento alcalino promove uma redução no grau de polimerização e cristalinidade da celulose, interrompendo a estrutura da lignina por meio da quebra das ligações entre a lignina e os polissacarídeos, o que os torna acessíveis (AGBOR et al., 2011). Os pré-tratamentos físico-químicos atuam promovendo modificações na estrutura física e química da biomassa, diminuindo a interação entre os componentes por meio da separação dos feixes de fibras e a solubilização da hemicelulose, além de aumentar a acessibilidade enzimática da celulose (DUANGWANG et al., 2016).

Nesse contexto, a seleção de um pré-tratamento adequado ao tipo de biomassa é necessária para superar a recalcitrância característica desses materiais, a fim de tornar os açúcares mais facilmente disponíveis para a hidrólise enzimática (SUN et al., 2016).

3.3.1 Hidrólise enzimática da celulose

Após o pré-tratamento da biomassa nas condições adequadas para remoção da lignina e exposição da celulose, o material segue para a etapa de hidrólise enzimática, para obtenção de monômeros de glicose a partir da celulose. Por ser altamente específica, não ocorre a formação de compostos inibidores que influenciam o desempenho da fermentação (BANERJEE et al., 2010).

A hidrólise enzimática é realizada por enzimas celulasas, com alta especificidade para a celulose (BANERJEE et al., 2010) e pode ser realizada em condições mais brandas de pH (4,8-5,0) e temperatura (45-50 °C) (CANILHA et al., 2012), de acordo com as condições otimizadas para a enzima.

Por se tratar de uma reação heterogênea, a hidrólise da celulose inicia pela porção insolúvel, numa interface líquido-sólido, ocorrendo uma hidrólise em fase aquosa de

intermediários solúveis de oligossacarídeos, pela ação sinérgica de enzimas (YANG et al., 2011).

As celulasas formam um complexo enzimático dividido em três classes de enzimas, que atuam sinergicamente: endoglucanases, exoglucanases (celobiohidrolases) e β -glucosidases. As endoglucanases atuam na clivagem aleatória das ligações glicosídicas β -1,4 da porção interna da cadeia, principalmente nas regiões amorfas, reduzindo o grau de polimerização, que origina novos terminais, enquanto que as exoglucanases atuam nos terminais das cadeias de celulose, liberando celobioses (KUMAR; MURTHY, 2016). As β -glucosidases realizam a clivagem da celobiose em monômeros de glicose (FENILA; SHASTRI, 2016). A Figura 3 mostra uma representação simplificada da atuação de cada enzima do complexo.

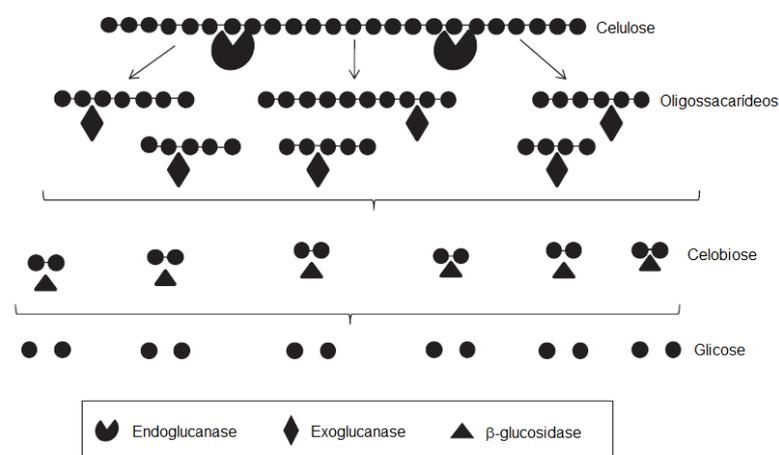


Figura 3 Representação simplificada da atuação das celulasas. Fonte: Adaptado de BINOD et al. (2011).

São diversos os fatores que interferem na hidrólise enzimática da celulose, sendo os principais divididos em dois grupos: fatores relacionados ao substrato e à enzima (BINOD et al., 2011).

Com relação ao substrato, a composição da biomassa lignocelulósica, como a presença de lignina e hemicelulose associada à celulose e o grau de cristalinidade da celulose, desempenham um papel importante na eficácia do pré-tratamento e, conseqüentemente, na hidrólise enzimática (ALVIRA et al., 2010). Esses elementos estruturais são responsáveis pela recalcitrância da biomassa, por formarem uma barreira física, o que dificulta a acessibilidade do complexo enzimático à superfície da celulose (SUN et al., 2016).

A remoção da lignina proporciona o aumento da acessibilidade enzimática às frações de carboidratos, como a hemicelulose e a celulose (BINOD et al., 2011). No entanto, Oliveira et al. (2014) não observaram diferenças significativas na conversão da celulose de bagaço

de cana-de-açúcar deslignificado, após pré-tratamento hidrotérmico, que alcança rendimentos máximos de 68% e 70% para o bagaço sem deslignificação e após deslignificação, respectivamente. Isso porque, segundo Donohoe et al. (2008), durante os pré-tratamentos, a lignina pode se redistribuir e migrar para a superfície do substrato, sendo um fator chave da recalcitrância da biomassa, que, provavelmente, está mais relacionado à eficiência da hidrólise enzimática do que ao teor total presente na biomassa (OLIVEIRA et al., 2014).

Os fatores referentes à enzima, tais como sua concentração, adsorção, o sinergismo entre essas enzimas que formam o complexo, a inativação térmica, a adsorção inespecífica da enzima à lignina, reduzem a hidrólise improdutiva da celulose, a inibição por produto (oligômeros e glicose), entre outros, os quais são fatores que, de forma conjunta, influenciam para a eficiência da hidrólise enzimática (KUMAR; MURTHY, 2016).

3.3.2 Fermentação dos açúcares

Após a conversão da celulose em monômeros de glicose pela ação enzimática, a biomassa lignocelulósica segue para a etapa de fermentação dos açúcares. A fermentação pode ser realizada em dois processos, ou seja, hidrólise separada da fermentação (SHF – do inglês “Separate Hydrolysis and Fermentation”) ou sacarificação simultânea à fermentação (SSF – do inglês “Simultaneous Saccharification and Fermentation”) (DAHNUM et al., 2015).

O processo de SHF tem como vantagem a realização da hidrólise nas condições ideais para a enzima (cerca de 50°C) e para a fermentação (30-35°C) (CHOUDHARY; SINGH; NAIN, 2016; SINDHU et al., 2014); no entanto, podem ocorrer problemas de inibição da enzima pela celobiose e glicose liberadas no meio reacional, durante a hidrólise da celulose, resultando em baixos rendimentos em etanol (OGEDA; PETRI, 2010). Além disso, a presença de elevadas concentrações de açúcares no meio reacional, liberadas durante a etapa de sacarificação, pode causar inibição osmótica da levedura e, conseqüentemente, reduzir a produtividade volumétrica específica de etanol (PARRONDO; GARCÍA; DÍAZ, 2009).

Nesse contexto, o processo de SSF é uma alternativa para minimizar a inibição enzimática pelo produto final da hidrólise, pois a glicose é rapidamente metabolizada pelo micro-organismo (LI et al., 2014), evitando, assim, seu acúmulo no meio, além de ser um processo que oferece menores riscos de contaminação, manuseio mínimo de equipamentos e baixo custo (JUNCHEN; IRFAN; LIN, 2012). No entanto, por ser realizado em uma mesma etapa, as condições deverão ser as mesmas para a enzima e o micro-organismo (37-40°C)

(CHAROENSOPHARAT et al., 2015; MURATA et al., 2015), sendo necessário utilizar micro-organismos termotolerantes.

3.3.2.1 A levedura *Kluyveromyces marxianus*

A espécie *Kluyveromyces marxianus* é uma das leveduras mais promissoras por apresentar tolerância a temperaturas elevadas, entre 40-45°C (WU et al., 2016; NACHAIWIENG et al., 2015; PESSANI et al., 2011) ou superior, dependendo da linhagem (MORRISSEY et al., 2015), característica vantajosa, considerando as necessidades de uma indústria. Como consequência, é muito empregada em processos de SSF (CAMARGO; GOMES; SENE, 2014; DAHNUM et al., 2015; BARROS et al., 2017). Além disso, possui uma das maiores taxas de crescimento entre as leveduras e alta capacidade de conversão de açúcar de biomassa lignocelulósica (FONSECA et al., 2007).

Castro e Roberto (2014) alcançaram maiores rendimentos de etanol (0,44 g/g) e produtividade (3,6 g/L.h-1), a partir de 40 g/L de glicose em meio semissintético, utilizando a levedura *K. marxianus* NRRL Y-6860, cultivada a 45°C. As respostas adaptativas contra o estresse térmico incluem a indução de proteínas do choque térmico para evitar a agregação de proteínas, a síntese de alguns solutos compatíveis, como a trealose, remodelação da parede celular e a interrupção transitória do ciclo celular (AUESUKAREE, 2017).

Por ter sido isolada de vários ambientes, *K. marxianus* apresenta alta diversidade metabólica e elevado grau de polimorfismo intraespecífico (LANE et al., 2011); em decorrência disso, é amplamente estudada em aplicações biotecnológicas, como produção de enzimas pectinases (PIEMOLINE-BARRETO; ANTÔNIO; ECHEVERRIGARAY, 2017), inulinases (JAIN; JAIN; KANGO, 2012), compostos aromáticos (MARTINEZ et al., 2017), peptídeos bioativos (LI et al., 2015), biofármacos (NAMBU-NISHIDA et al., 2018) e etanol (CAMARGO; GOMES; SENE, 2014; DINIZ et al., 2014; GOBARDO et al., 2015; WU et al., 2016).

K. marxianus, assim como *Saccharomyces cerevisiae*, é uma levedura respiratória fermentativa, apresentando capacidade de obter energia, tanto com base no ciclo do ácido tricarboxílico, por fosforilação oxidativa, como por fermentação alcoólica. No caso de *S. cerevisiae*, na presença de altas concentrações de açúcares, o metabolismo é direcionado à fermentação, o que significa que a célula utiliza, preferencialmente, o piruvato para a produção de etanol, embora o rendimento energético seja menor do que poderia ser obtido, a partir da respiração (LANE; MORRISSEY, 2010). Esse fenômeno é denominado efeito Crabtree, definido como a ocorrência de fermentação alcoólica em condições aeróbicas, que confere vantagem competitiva em certos nichos ecológicos (PISKUR et al., 2006). As leveduras convencionais, Crabtree-positivas, são capazes de produzir etanol sob condições aeróbicas, enquanto, nas mesmas condições, as cepas Crabtree-negativas usarão seu

metabolismo respiratório e formarão baixas quantidades de etanol (WILKOWSKA et al., 2015).

A levedura *K. marxianus* é classificada como uma levedura "Crabtree-negativa", direcionando o seu metabolismo preferencialmente para o ciclo dos ácidos tricarbóxicos com melhor rendimento energético, no entanto, existem relatos contraditórios na literatura quanto a essa classificação, pois alguns estudos referem-se à *K. marxianus* como "Crabtree-positiva" (LANE; MORRISSEY, 2010).

Ballesteros et al. (2004) verificaram que é possível alcançar rendimentos entre 50-72% do rendimento máximo teórico (0,51 g de etanol/g de glicose), com teores máximos de 16 a 19 g/L de etanol, com base no percentual de glicose (52-56,3%), presente em cada biomassa pré-tratada, utilizando a levedura *K. marxianus* CECT 10875, durante a SSF de biomassas lignocelulósicas lenhosa e herbácea, em condições de 42°C, com 10% (m/v) de concentração de substrato. A levedura *K. marxianus* ATCC 36907 produziu 27,88 g/L de etanol, a partir de 30,6 g de glicose, por SSF de farelo de girassol, a 38°C e 8% (m/v) de concentração de substrato (CAMARGO; GOMES; SENE, 2014).

3.3.2.2 Sacarificação simultânea à fermentação com altas cargas de sólidos

Para que a produção de etanol, a partir da biomassa lignocelulósica, seja eficiente e economicamente viável, é essencial a obtenção de altos rendimentos em açúcares, na etapa de sacarificação, para que a seguinte ocasione maiores rendimentos em etanol. Para isso, a maior concentração de sólidos, na etapa inicial de hidrólise enzimática, tem sido avaliada com a finalidade de atingir altas concentrações finais de etanol (LU et al., 2010).

O emprego de processos com elevada concentração de substrato pode resultar em maiores concentrações de açúcares, além de beneficiar etapas subsequentes, como a fermentação e a destilação (KRISTENSEN et al., 2009), ocasionando um efeito significativo sobre os custos de capital e operacional para a mesma produção de etanol (LU et al., 2010).

No entanto, a adição de altas cargas de sólidos enfrenta alguns desafios, principalmente, devido a limitações de transferência de massa, ao aumento da viscosidade inicial do meio, à inibição das enzimas, decorrente da dificuldade da mistura adequada do substrato, interferindo na eficiência da interação enzima-substrato, além da inibição da enzima pelo aumento da concentração de açúcares liberados, o que reduz os rendimentos da hidrólise (KOPPRAM et al., 2014).

Para avaliar o impacto da taxa de transferência de massa, alterando as condições dinâmicas de fluídos em um biorreator de tanque agitado (STBR – do inglês "stirred tank bioreactor"), sobre a sacarificação enzimática de palha de milho, Wojtusik et al. (2016) conduziram o processo de sacarificação em diferentes velocidades de agitação (50 e 500 rpm), com carga de sólidos de 20% (m/v), e compararam os valores globais da taxa de

processo de hidrólise com a taxa de transferência de massa estimada. Além disso, autores comparam os efeitos do aumento da concentração de enzima e do aumento da velocidade de agitação em três experimentos: um experimento com 15,5 mg de enzima/g de glicana e agitação variando de 50 a 500 rpm; um segundo, com duas alimentações de enzimas (15,5 mg de enzimas/g de glicana + 15 mg de enzima/g de glicana, em intervalos de 12 horas) e agitação de 50 rpm; e um terceiro, com adição inicial do volume total de enzimas (31 mg de enzimas/g de glicana) e agitação de 50 rpm. Os resultados mostraram que velocidades de agitação abaixo de 100 rpm resultaram em baixos rendimentos de glicose, independentemente da concentração de enzimas, enquanto, em velocidades acima de 300 rpm, maiores rendimentos de glicose e aumentos da taxa de transferência de massa foram alcançados.

Com base nesses resultados, Wojtusik et al. (2016) relataram que o efeito da velocidade de agitação no coeficiente de transferência de massa é muito mais importante do que a forma de alimentação de enzima, bem como o aumento da concentração de enzimas na reação de hidrólise.

Nesse contexto, uma estratégia para eliminar esses problemas é a alimentação gradual de carga de sólidos no processo de sacarificação simultânea à fermentação. A alimentação gradual ou batelada alimentada demonstra benefícios em vários aspectos, como maior facilidade de mistura, após sacarificação parcial, possibilitando a adição gradual de substrato e, conseqüentemente, a manutenção da viscosidade inicial mais baixa (RUDOLF et al., 2005), menor demanda de energia, devido à redução da viscosidade (DASARI et al., 2009), e manutenção de baixas concentrações de glicose no meio (ÖHGREN et al., 2006).

Liu et al. (2015) mostraram que, à medida em que foram adicionadas altas cargas de sólidos de bagaço de cana-de-açúcar, variando de 15-36%, aumentou a viscosidade do meio. No entanto, ao utilizarem a estratégia de batelada alimentada, iniciando com 15% de carga de sólidos, com posterior adição de 8%, 7% e 6%, sucessivamente, verificaram que a viscosidade do sistema diminuía para valores estáveis, até atingir um teor final de sólidos de 36%. Os autores também avaliaram duas formas de alimentação com enzimas: adição de carga total de enzimas, no início da hidrólise, e adição de enzimas, a cada alimentação com sólidos. Os resultados mostraram que a adição da carga total de enzimas, no início da reação, promoveu rendimentos de aproximadamente 231,7 g/L açúcares totais e uma concentração de glicose de 134,9 g/L, após 96 horas, com teor de sólidos de 36%, indicando a viabilidade do sistema operado, em batelada alimentada com altas cargas de sólidos, para obtenção de elevadas concentrações de açúcares.

Triwahyuni et al. (2015) conduziram o processo de SSF com resíduos de frutos de palmeira (pré-tratado com NaOH 10%), em frascos Erlenmeyer de 250 mL, com a levedura *S. cerevisiae* nas condições de 32°C, pH 4.8 e 150 rpm, por 72 horas. Os resultados

mostraram que, com uma carga de substrato de 25%, adicionada, gradualmente, 18 FPU da enzima Cellic® Ctec2, adicionada de 20% Cellic® Htec2 (com base no volume de Cellic® Ctec2), por g de substrato e 1% (g/mL) de células de *S. cerevisiae*, foi possível produzir 83,40 g/L de etanol, com rendimento de 80,21%.

A adição gradual com enzimas também é uma estratégia que, associada à alimentação de substrato, pode beneficiar processos de SSF. Ao estudarem diferentes estratégias de SSF em batelada e batelada alimentada, com alimentação de enzima e substrato, utilizando uma espécie de capim (pré-tratado por hidrotérmólise) e fermentado pela levedura *K. marxianus* IMB3, Pessani et al. (2011) observaram que a adição de 0,7 mL de carga enzimática por g de glicana (Acellerase 1500) e uma temperatura de fermentação de 45°C foram associados ao maior rendimento de etanol de 86%, com 8% de sólidos, após 168 horas, em SSF batelada. Apesar de uma carga enzimática 33% menor ter sido utilizada no tratamento SSF em batelada alimentada, com 12% de sólidos, observou-se uma produção similar de etanol (32 g/L) em todos os tratamentos realizados sem e com alimentação de substrato, após 72 horas, o que equivale a 82% de rendimento. Os autores atribuíram o maior rendimento de etanol com 8% de sólidos ao menor acúmulo de glicose, ao final da fermentação, em comparação com 12% de sólidos.

O processo de SSF em batelada alimentada foi avaliado empregando um biorreator convencional, com alimentação de substrato (palha de milho) e enzimas, utilizando uma levedura *S. cerevisiae* recombinante capaz de metabolizar glicose e xilose. Foram alcançados 47 e 40 g/L de etanol, a partir de 10,5% de sólidos, correspondendo a 68% e 58% do rendimento teórico de etanol, a partir de glicose e xilose disponíveis, respectivamente (KOPPRAM et al., 2013).

A melhoria nos processos de fermentação, como na SSF, está atribuída a maiores rendimentos de açúcares, com conseqüente aumento nos rendimentos em etanol, sendo necessária a otimização das operações envolvidas, visando tornar o processo economicamente viável.

3.3.3 Uso de surfactantes na hidrólise enzimática e na sacarificação simultânea à fermentação

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção apolar é, frequentemente, uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A presença das porções hidrofóbica e hidrofílica na mesma molécula faz com que os surfactantes se distribuam nas interfaces entre fases fluídas, com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio, como na interface água/óleo e ar/água (DESAI;

BANAT, 1997), de modo que a porção hidrofílica se oriente para a fase fluída e a porção hidrofóbica na direção oposta a esta fase, reduzindo a tensão superficial (OLIVEIRA; MEI, 2009). Devido a essas propriedades, os surfactantes apresentam diversas aplicações industriais, a saber, detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (NISCHKE; PASTORE, 2002).

Uma das formas de avaliar a eficiência de um surfactante é por meio da determinação da concentração micelar crítica (CMC). A CMC é definida como a solubilidade do surfactante em fase aquosa e pode ser determinada medindo as mudanças na tensão superficial ou interfacial pela adição de concentrações crescentes de surfactantes, levando a uma redução da tensão superficial até um nível crítico, acima do qual as moléculas anfífilas se associam, formando estruturas supramoleculares, como micelas, bicamadas e vesículas, sendo esse o valor da CMC (DESAI; BANAT, 1997).

A adição de surfactantes não iônicos à hidrólise enzimática ou a processos de fermentação tem como proposta promover melhorias que resultem na redução de custos operacionais da produção de etanol, aumento da atividade das enzimas, redução da carga enzimática e do tempo de fermentação. Pesquisas têm sido realizadas objetivando potencializar a ação de enzimas à hidrólise enzimática e fermentação, as quais empregaram surfactantes (BALLESTEROS et al., 1998; KRISTENSEN et al., 2007; LIU et al., 2014; KUMAR; DUTT; GAUTAM, 2016).

Vários mecanismos de ação foram propostos para explicar de que forma os surfactantes atuam na atividade das enzimas durante a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica. Os surfactantes podem promover alterações na estrutura do substrato, aumentando a área superficial da celulose, de forma a torná-la mais acessível à enzima (HELLE et al., 1993). Outro mecanismo proposto é a estabilização das enzimas, prevenindo a desnaturação durante a hidrólise enzimática (KIM et al., 1982). Também podem atuar reduzindo a adsorção inespecífica das enzimas à lignina, devido à interação hidrofóbica do surfactante com a lignina na superfície da biomassa, o que resulta em maior concentração de enzimas livres no meio (KRISTENSEN et al., 2007). No entanto, um mecanismo que pode explicar de forma consistente de que modo os surfactantes melhoram a hidrólise enzimática ainda não foi elucidado (QING; YANG; WYMAN, 2010).

A adição do surfactante Tween 20, durante a hidrólise de lascas de madeira de pinho, reduziu a adsorção inespecífica das enzimas β -glicosidases e aumentou a adsorção específica das celulasas (Celluclast 1,5L), resultando em aumentos da velocidade de conversão de celulose (SEO et al., 2011).

Em um estudo, Rocha-Martín et al. (2017) testaram o efeito da adição do surfactante polietilenoglicol (PEG 4000), entre 0-5 g/L, na hidrólise enzimática de palha de milho, palha de cana-de-açúcar e celulose cristalina (Avicel), em condições industriais com altas cargas de sólidos (20%), condições limitadas de mistura e baixas concentrações de enzimas

(9,0 mg/g de glicana). Os resultados mostraram aumentos nos rendimentos de glicose em 10% (palha de milho), 7,5% (palha de cana-de-açúcar) e 32% (Avicel), além de aumentos da atividade de β -glicosidase e endoglucanase em 20% e 60%, respectivamente.

Oladi e Aita (2018) obtiveram melhorias de 75,85% e 12,74% na digestibilidade da celulose de bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado com amônia líquida não lavado e lavado), utilizando o Tween 80. Os efeitos do surfactante Tween 80 sobre a hidrólise enzimática e subsequente fermentação de madeira de pinheiro, submetida a diferentes pré-tratamentos: explosão a vapor e pré-tratado com 1,1% de H_2SO_4 (m/m) etanol 65% (v/v), foram avaliados por Tu et al. (2009), sendo que verificaram que a adição do surfactante (0,2%), durante a hidrólise da biomassa pré-tratada, por explosão a vapor, resultou em um aumento de 32% no rendimento da conversão da celulose em glicose, o que ocasionou maiores rendimentos em etanol por SSF, enquanto que, na biomassa pré-tratada com etanol, a melhora foi menor com a mesma concentração de surfactante.

A utilização de Tween 20 na concentração de 2,5 g/L hidrólise aumentou em até 75% o rendimento de glicose durante a SSF de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com sulfito-alcálico (Na_2SO_3 e NaOH proporções fixadas em 2:1) e três cargas químicas crescentes de Na_2SO_3 (4 a 8% m/m), sendo que o rendimento de etanol também foi aumentado em função da severidade do pré-tratamento. O rendimento máximo de etanol foi de 56% para a amostra pré-tratada com a maior carga química. Para a amostra pré-tratada com as menores cargas químicas (2% m/m de NaOH e 4% m/m Na_2SO_3), adicionar Tween 20 durante o processo de hidrólise aumentou o rendimento de etanol de 25 para 39,5% (MESQUITA; FERRAZ; AGUIAR, 2016).

No entanto, Zhou et al. (2015) observaram que o aumento da concentração do surfactante não-iônico, durante a hidrólise da celulose pura, causou efeitos negativos, levando a um efeito inibidor na fase tardia da hidrólise. Contudo, os autores verificaram que a adição de surfactantes, em concentrações adequadas, pode melhorar a conversão da celulose até certo ponto, por reduzir a adsorção improdutiva das enzimas e aumentar a adsorção produtiva durante a hidrólise. No entanto, a ação benéfica do surfactante na hidrólise da celulose pura também é influenciada por vários fatores, incluindo o tipo de surfactante e sua concentração, a estrutura da celulose, como grau de polimerização e cristalinidade, formulação das enzimas e as condições de hidrólise.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização dos experimentos, foram utilizados o Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAETF) e o Laboratório de Análises Agro-Ambientais (LAAA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Cascavel.

4.1 Matéria-prima

4.1.1 Casca de arroz

A casca de arroz foi obtida da Empresa de Alimentos Itasa, localizada no município de Santa Tereza do Oeste - PR. O material foi acondicionado em embalagens plásticas com capacidade para 5 L e armazenadas a -4°C até o início dos experimentos. Antes de cada procedimento experimental, o material foi descongelado, triturado em moinhos de facas, a uma granulometria de 20 mesh, e seco em estufa a uma temperatura de 60°C até peso constante. A Figura 4 mostra o aspecto da casca de arroz utilizada em todos os experimentos.



Figura 4 Aspecto macroscópico da casca de arroz utilizada nos experimentos. Fonte: A autora.

4.1.2 Determinação da composição química da casca de arroz

Para a determinação da composição química da casca de arroz, foram realizadas análises do teor de cinzas totais, umidade, proteínas, extrativos e as porcentagens das

principais frações quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina (solúvel e insolúvel), de acordo com método descrito pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (NREL - National Renewable Energy Laboratory, USA) (SLUITER et al., 2008a; 2008b; 2008c).

4.2 Pré-tratamento da casca de arroz

Para a obtenção da fração celulósica da casca de arroz, foi realizado um pré-tratamento alcalino, selecionado a partir de experimentos preliminares realizados por Pintro (2019), utilizando hidróxido de sódio (NaOH) 8% (m/v), numa proporção de sólidos de 2% (m/v), baseado em condições descritas por Wang et al. (2016) com modificações, em autoclave a 121°C, por 30 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, o material foi filtrado e lavado com água deionizada para retirada do excesso de NaOH até atingir a neutralidade. Em seguida, o material resultante foi seco em estufa a 50°C até peso constante para então ser caracterizado quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina.

O percentual de redução da lignina foi calculado de acordo com a Equação 1 (XU et al., 2011):

$$\% \text{ Redução da lignina} = \frac{\% \text{ LB} - \% \text{ LP}}{\% \text{ LB}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que:

% LB – porcentagem de lignina presente na biomassa de casca de arroz;

% LP – porcentagem de lignina presente na biomassa de casca de arroz pré-tratada.

4.2.1 Espectrometria de absorção na região infravermelha (FTIR)

Para verificar possíveis mudanças na estrutura química, as cascas de arroz *in natura* e pré-tratada, com NaOH 8% (m/v), foram submetidas à análise de espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), em um espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 100, no modo refletância total atenuada (ATR). Todas as amostras foram analisadas na faixa entre 400 a 4000 cm⁻¹, com acumulação de 16 varreduras e com resolução de 2 cm⁻¹. As análises foram realizadas no Laboratório Central de Análises na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *Campus Medianeira*.

4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As cascas de arroz *in natura* e pré-tratadas foram submetidas à análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Departamento de Engenharia de Materiais - DEMAR, da EEL/USP, para verificar as mudanças estruturais causadas pela ação química durante o pré-tratamento. As amostras foram fixadas sobre uma placa de aço, por meio de uma fita de carbono, e aplicada uma fina camada de prata de, aproximadamente, 20 nm em uma metalizadora MED020 (BAL-TEC /MCS MULTICONTROL SYSTEM). As micrografias de MEV foram obtidas em um equipamento HITACHI TM3000, empregando sinal de elétrons secundários e voltagem de 20 kV.

4.3 Microrganismo e preparo do inóculo

Os experimentos foram realizados utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, adquirida da Coleção de Culturas Tropical André Tosello, Campinas – SP. A cultura foi mantida em tubo contendo “Malt Extract Ágar Base” – HIMedia (extrato de malte 3,0 g/L; peptona 5,0 g/L e ágar 15,0 g/L), a 4°C. Para o preparo do inóculo, a levedura foi cultivada em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio “Yeast Malt Peptone Medium” (YMP), com 10,0 g/L de glicose; 3,0 g/L de extrato de malte; 3,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de peptona, em incubadora, sob agitação rotatória a 200 rpm e 35°C, por 16 horas (CAMARGO et al., 2014). Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2000 x g por 20 minutos e ressuspensas em água destilada estéril para utilização como inóculo. A concentração celular inicial, inoculada nos ensaios, foi medida por meio de uma curva padrão que correlaciona absorvância, medida em espectrofotômetro a 600 nm, com a massa seca das células (g.L^{-1}) e o número de células obtido por contagem em Câmara de Neubauer (cél./mL).

4.4 Parte I - Efeito da alimentação no processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) da celulose de casca de arroz

A Figura 5 apresenta o esquema das etapas de realização dos experimentos relacionados à Parte I.

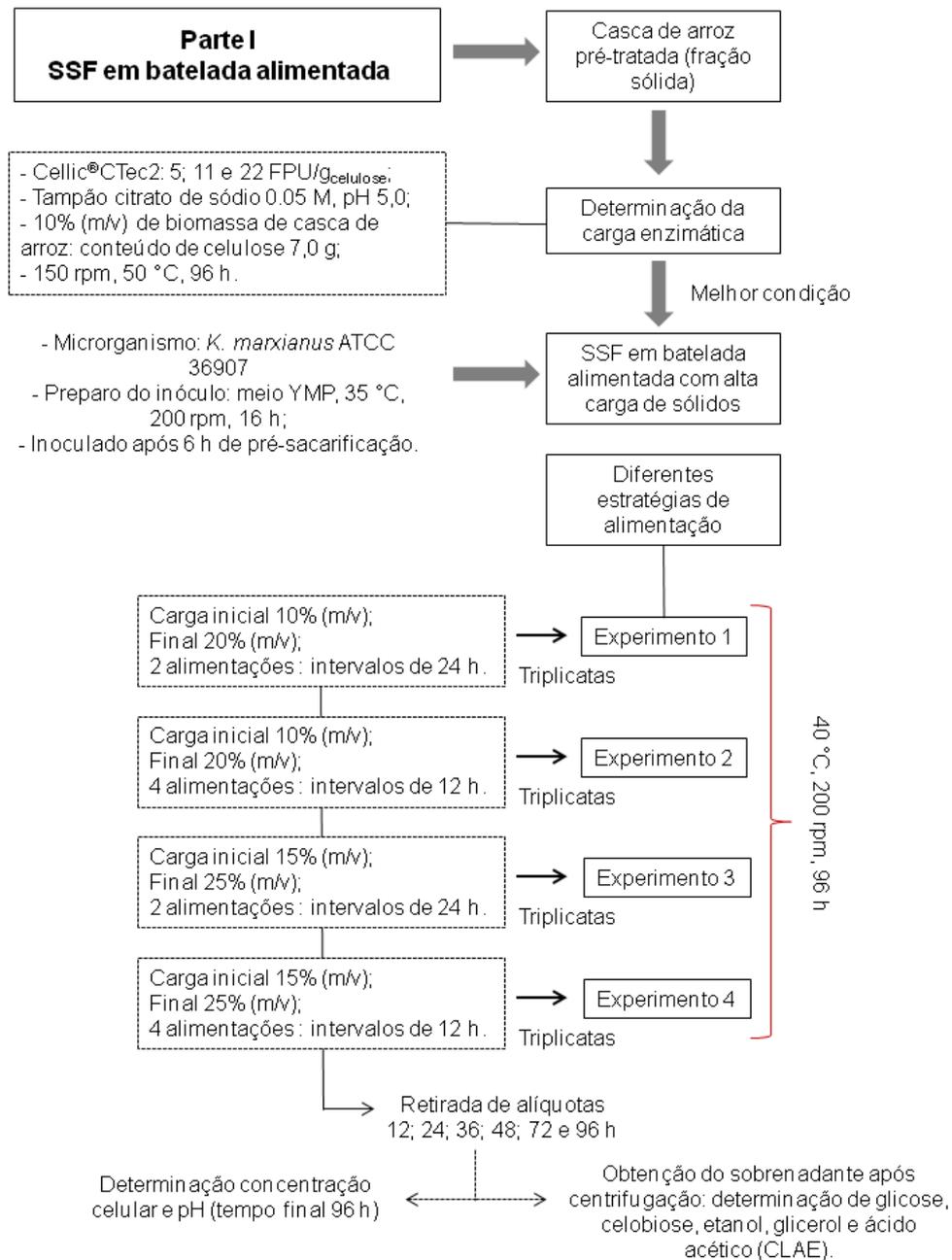


Figura 5 Esquema das etapas para realização dos experimentos de SSF em batelada alimentada com alta carga de sólidos.

4.4.1 Determinação da carga enzimática

A determinação da carga enzimática sobre a sacarificação da celulose, presente na biomassa de casca de arroz em glicose, foi realizada segundo metodologia do NREL “SSF Experimental Protocols – Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation” (DOWE; MCMILLAN, 2008), com modificação em relação à carga de sólidos, considerando o teor de celulose (%) presente na biomassa de casca de arroz pré-tratada.

A hidrólise enzimática foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL numa proporção de 10% (m/v) de biomassa de casca de arroz pré-tratada, em base seca, e

adicionados 50 mL de solução tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,0, previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos. Para cada ensaio, foram adicionadas três concentrações de celulases, 5; 11 e 22 FPU/g_{celulose}. Os frascos foram mantidos sob agitação rotatória a 150 rpm e temperatura de 50°C, por um período de 96 horas. As alíquotas foram coletadas em intervalos de 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Posteriormente, a enzima foi inativada termicamente e as amostras centrifugadas a 2000 g, por 20 minutos, para a quantificação dos açúcares redutores (AR), utilizando o reagente ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo Miller (1959).

Como controle, para cada ensaio, foram mantidos frascos contendo apenas o meio tamponado (sem o substrato) adicionado das enzimas. O experimento foi realizado em triplicata.

4.4.2 Sacarificação simultânea à fermentação em batelada alimentada

O processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) da biomassa de casca de arroz pré-tratada, conforme item 4.2, foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio, com 10 ou 15% (m/v) de carga de sólidos da biomassa pré-tratada, em solução tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,5, suplementado com 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte e 5 g/L de peptona, previamente esterilizados (CAMARGO et al., 2014). Em seguida, foi adicionada a carga enzimática de 22 FPU/g celulose do complexo comercial de celulases Cellic[®]CTec2 da Sigma-Aldrich (solução aquosa contendo celulases, β -glicosidasases e hemicelulases), definida no item 4.4.1, e os frascos incubados sob agitação rotatória a 200 rpm, a 50°C, por um período de 6 horas. Em seguida, foi adicionado 1 g/L ($1,13 \times 10^{10}$ /mL) de *K. marxianus* ATCC 36907 (SILVA et al., 2015) e os frascos foram incubados sob agitação de 200 rpm, a 40°C, por 96 horas (TAVARES al., 2019). Nas primeiras 48 horas de fermentação, foram coletadas alíquotas a cada 12 horas e, após esse período, a cada 24 horas, para quantificação de açúcares (glicose e celobiose), etanol, ácido acético e glicerol, após inativação térmica da enzima, as amostras foram centrifugadas.

Foram feitos quatro experimentos com diferentes cargas de alimentação de sólidos, sendo dois com carga inicial de 10% e final de 20% (E1 e E2), e dois experimentos com carga inicial de 15% e final de 25% (E3 e E4), conforme Barros et al. (2017). Nos experimentos 1 (E1) e 3 (E3), foram realizadas duas alimentações de 5,0% de carga em intervalos de 24 horas, enquanto que, nos experimentos 2 (E2) e 4 (E4), foram feitas quatro alimentações de 2,5% de carga em intervalos de 12 horas.

Os experimentos foram realizados em triplicata. A Tabela 1 apresenta as estratégias de alimentação que foram empregadas nos experimentos, de acordo com Barros et al. (2017).

Tabela 1 Estratégias de alimentação de carga de sólidos empregadas nos quatro experimentos de SSF com biomassa de casca de arroz pré-tratada

Experimentos	Carga inicial de sólidos (% m/v)	Carga final de sólidos (% m/v)	Número de alimentações (carga)	Intervalos de tempo entre as alimentações (h)
E1	10	20	2	24
E2	10	20	4	12
E3	15	25	2	24
E4	15	25	4	12

4.5 Parte II - Efeito da adição de surfactante durante a hidrólise enzimática da celulose de casca de arroz

Para avaliar o efeito dos surfactantes Polisorbato 80 (PS 80), Polietilenoglicol 4000 (PEG) e Triton X-100, em associação a diferentes cargas de enzima (FPU/g celulose), na liberação de glicose da celulose da casca de arroz pré-tratada, foram realizados três experimentos, seguindo um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , incluindo 4 ensaios nas condições axiais e 4 repetições no ponto central, o que totalizou 12 ensaios para cada surfactante (Tabela 2), além de um experimento controle (com adição de enzima e sem surfactante), em triplicata. As concentrações dos surfactantes adicionados no meio reacional tiveram como base a concentração micelar crítica (CMC), exceto para o Polietilenoglicol 4000, que teve como referência o trabalho de Rocha-Martín et al. (2017).

Na Figura 6, estão representadas as etapas para a realização dos experimentos de hidrólise enzimática com e sem adição dos surfactantes.

Tabela 2 Matriz de planejamento para avaliação da adição dos diferentes surfactantes em associação a diferentes cargas enzimáticas, utilizados durante a hidrólise enzimática da celulose da casca de arroz

Ensaio	Valores codificados		Valores reais			
	X1	X2	Polisorbato 80 (mg/L)	Poliétilenoglicol (g/L)	Triton X-100 (mg/L)	Enzima (FPU/g _{celulose})
01	-1	-1	10	1,0	100	8
02	+1	-1	20	3,0	200	8
03	-1	+1	10	1,0	100	19
04	+1	+1	20	3,0	200	19
05	-1,41	0	7,0	0,5	75	13,5
06	+1,41	0	23	3,5	225	13,5
07	0	-1,41	15	2,0	150	5
08	0	+1,41	15	2,0	150	22
09	0	0	15	2,0	150	13,5
10	0	0	15	2,0	150	13,5
11	0	0	15	2,0	150	13,5
12	0	0	15	2,0	150	13,5

Nota: X1= surfactante e X2= carga enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL, numa proporção de 10% (m/v) de biomassa pré-tratada em base seca, em 25 mL de solução tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,0, 50°C, 150 rpm por 96 h. Em intervalos de 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, foram coletadas alíquotas para quantificação de açúcares (glicose e celobiose), após inativação da enzima e centrifugação.

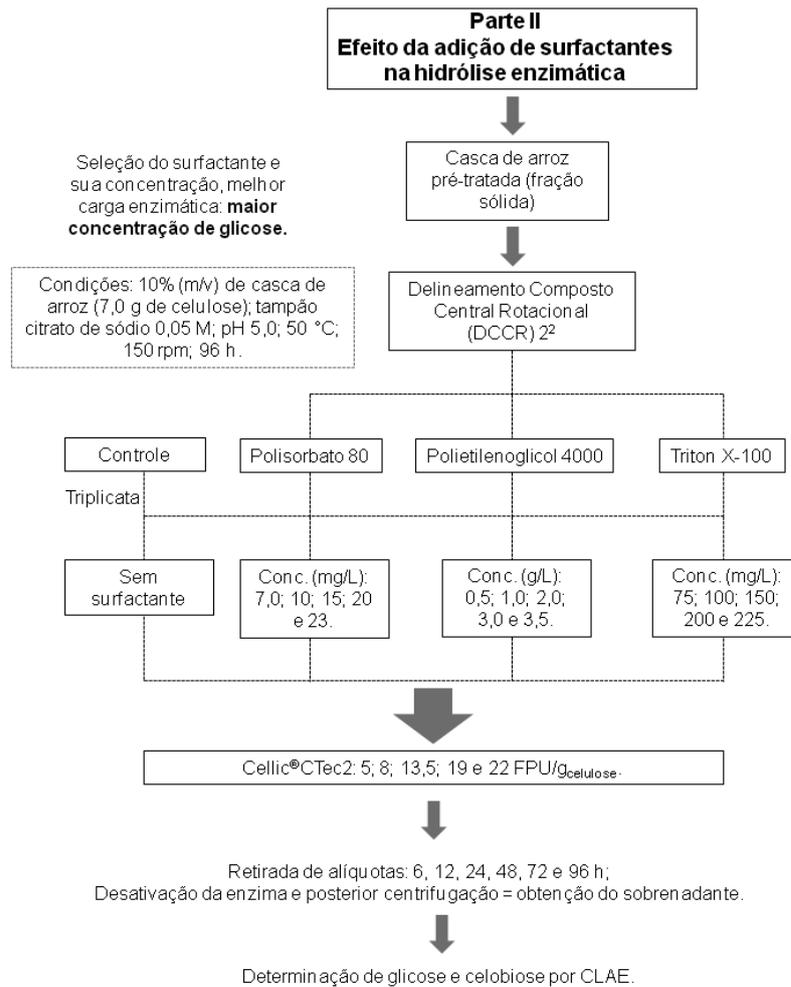


Figura 6 Esquema das etapas para realização dos experimentos de hidrólise enzimática com e sem adição de surfactantes.

4.6 Parte III - Efeito da adição de surfactante no processo de sacarificação simultânea à fermentação da celulose de casca de arroz

Os experimentos de sacarificação simultânea à fermentação com e sem a adição de surfactantes foram realizados seguindo as etapas apresentadas na Figura 7.

4.6.1 Sacarificação simultânea à fermentação com adição de surfactante

O processo de SSF da biomassa de casca de arroz pré-tratada, conforme item 4.2, foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio e 10% (m/v) de carga de sólidos da biomassa em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 5,5, suplementado com 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, segundo Camargo et al. (2014) e os surfactantes (conforme definido no item 4.5), previamente esterilizados. Após o preparo do meio, foram adicionados, aos frascos, 19 FPU/g_{celulose} do

complexo comercial Cellic[®]CTec2 da Sigma-Aldrich (solução aquosa contendo celulases, β -glicosidases e hemicelulases). Em seguida, os frascos foram incubados a 50°C, sob agitação de 200 rpm, durante 6 horas. Após a pré-sacarificação, foi inoculado 1 g/L ($1,47 \times 10^{10}$ /mL) (SILVA et al., 2015) de *K. marxianus* ATCC 36907, nos frascos, e incubados em shaker a 40°C, 200 rpm por 96 horas (TAVARES al., 2019). Nas primeiras 48 horas de fermentação, foram coletadas alíquotas a cada 12 horas e, após esse período, a cada 24 horas, para quantificação de açúcares (glicose e celobiose), etanol, ácido acético e glicerol, após inativação da enzima e centrifugação.

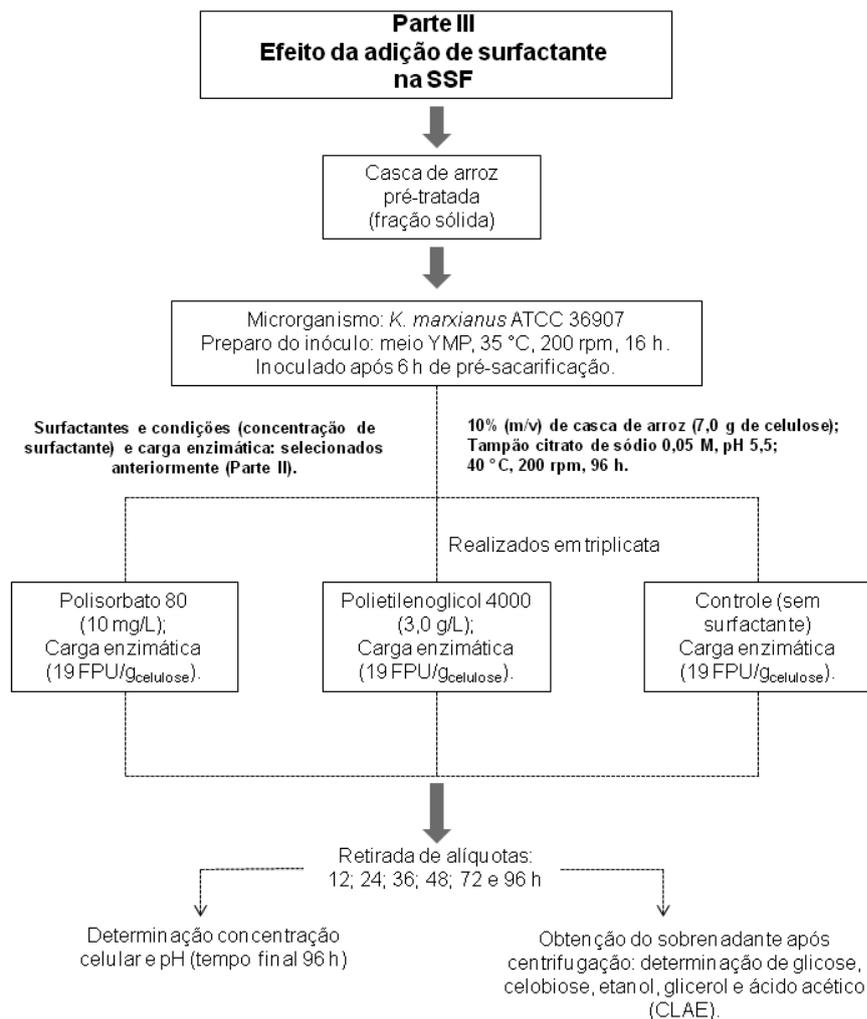


Figura 7 Esquema das etapas para realização dos experimentos de SSF com e sem adição de surfactantes.

4.7 Métodos analíticos

4.7.1 Determinação do teor de cinzas total

Para a determinação do teor de cinzas total na biomassa de cascas de arroz, 2 g de amostras de cascas de arroz secas (em triplicata) foram adicionadas em cadinhos de porcelana, previamente padronizados em mufla a 575°C, durante 4 horas, e submetidas à calcinação a 575°C, por 3 horas. Após esse período, os cadinhos foram retirados da mufla, resfriados em temperatura ambiente, transferidos para um dessecador e, então, pesados em balança analítica. O cálculo do teor total de cinzas foi feito segundo a Equação 2:

$$\% \text{ cinzas} = \left(\frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Em que:

M_1 – massa do cadinho calcinado vazio, em g;

M_2 – massa do cadinho + massa da amostra seca, em g;

M_3 – massa do cadinho com cinzas, em g.

4.7.2 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade da casca de arroz foi determinado segundo a metodologia “Determination of Total Solids in Biomass”, do NREL (SLUITER et al., 2008a), na qual 6,0 g de amostra de casca de arroz (em triplicata) foram adicionados em recipientes de 100 mL e secos em estufa, a 105°C, até peso constante. Foram obtidas as massas dos béqueres vazios, previamente secos e da amostra, antes e após secagem. O cálculo do teor de umidade foi realizado segundo a Equação 3:

$$\% \text{ umidade} = \left[1 - \left(\frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \right) \right] \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

Em que:

M_1 – massa do béquer vazio, em g;

M_2 – massa do béquer + massa da amostra úmida, em g;

M_3 – massa do béquer + amostra seca, em g.

4.7.3 Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo conteúdo de nitrogênio (N) total das amostras, utilizando o método microKjedahl, descrito por AOAC (1995). Para o procedimento, utilizou-se 0,2 g de amostra seca, pesada em balança analítica, com precisão de (0,0001 g). O método consiste em três passos, como descrito por Silva; Queiroz (2009): digestão da amostra em ácido sulfúrico, destilação e quantificação por titulação.

O fator de correção (6,25) foi utilizado para transformar a porcentagem de nitrogênio em proteína, considerando-se que as proteínas contêm, em média, 16% de nitrogênio, ou seja, $100 - 16 = 6,25$ (valor médio). Os resultados foram calculados, segundo a Equação 4, e expressos em massa seca (MS):

$$\begin{aligned} \% N &= \text{Volume de HCl gasto (mL)} \times N/10 \times 0,014 \times 100 / \text{peso amostra (g)} / 2 \times \text{MS} \times 100 \quad \text{Eq. (4)} \\ \% PB &= \% N \times 6,25 \end{aligned}$$

Em que:

Volume de HCl (ácido clorídrico) gasto na titulação = volume gasto de HCl 0,1N;

$N/10$ = valor da normalidade do HCl 1N, diluído por dez vezes (100 mL da solução de tritisol HCl 1N, adicionados em balão volumétrico de 1 L e completados com água destilada = 0,1 N);

Fator do ácido = 1 mL H_2SO_4 equivale a 0,014 de nitrogênio;

% PB = % de proteína bruta,

% N = % de nitrogênio multiplicado pelo fator de correção de 6,25.

4.7.4 Determinação de extrativos

A quantificação de extrativos na biomassa foi realizada de acordo com o procedimento "Determination of Extractives in Biomass" do NREL (SLUITER et al., 2008b). Para isso, 4,0 g de casca de arroz em base seca foram acondicionados em envelopes de papel filtro (em triplicata) e extraídos em aparelho de Soxhlet com éter de petróleo, seguida da evaporação do solvente, em estufa a 105°C , até massa constante. O cálculo do teor de extrativo foi feito conforme a Equação 5:

$$\% \text{ extrativos} = \left(\frac{M_a - M_b}{M_a} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (5)}$$

Em que:

M_a – massa da amostra em base seca, em g;

M_b – massa da amostra livre de extrativos, em g;

4.7.5 Determinação de celulose, hemicelulose e lignina

Os teores de celulose, hemicelulose e lignina foram determinados seguindo a metodologia “Determination of Structural Carbohydrates and lignin in Biomass”, do NREL (SLUITER et al., 2008c).

Para isso, foram adicionados, em um tubo de ensaio, 0,30 g de casca de arroz em base seca e 3 mL de H_2SO_4 a 72% (m/m). Em seguida, a mistura foi homogeneizada durante 1 minuto e incubada em banho termostático a 30°C por 60 minutos e, a cada 10 minutos, submetidos à agitação com bastão de vidro, a fim de uniformizar o meio.

Após esse processo, os tubos foram retirados do banho termostático e o conteúdo transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL, nos quais foram adicionados 84 mL de água destilada. Os frascos Erlenmeyer foram fechados com papel alumínio e autoclavados a 121°C, por 60 minutos. Ao fim dessa etapa, os frascos foram retirados da autoclave, resfriados à temperatura ambiente e filtrados em papel filtro.

Concluída a filtração, aproximadamente 50 mL do hidrolisado foram armazenados em freezer para determinação da lignina solúvel, açúcares (celobiose, glicose, arabinose e xilose), ácido acético, fenóis, furfural e hidroximetilfurfural. Os sólidos retidos foram utilizados para determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina.

4.7.5.1 Determinação da lignina insolúvel

Os sólidos retidos no papel filtro, na etapa anterior (item 4.7.5), foram lavados com aproximadamente 1,5 L de água destilada, para remoção de ácido residual, e submetidos à secagem, em estufa a 105°C, até peso constante para determinação de sua massa.

Após a determinação da lignina insolúvel, os resíduos foram transferidos para cadinhos de porcelana, a fim de determinar a massa de cinzas, conforme descrito no item 4.7.1. O cálculo da porcentagem de lignina será feito com base na Equação 6:

$$L_{ki} = \frac{(M_{p+a} - M_p) - (M_{c+c} - M_c)}{M_a} \times 100 \quad \text{Eq. (6)}$$

Em que:

L_{ki} – lignina Klason insolúvel (%);

M_{p+a} – peso do papel filtro com amostra seca, em g;

M_p – peso do papel filtro, em g;

M_{c+c} – massa do cadinho com cinzas da lignina, em g;

M_c – massa do cadinho vazio, em g;

M_a – massa da amostra seca, em g.

4.7.5.2 Determinação da lignina solúvel

Para a determinação da lignina solúvel, as amostras foram adequadamente diluídas e, posteriormente, feitas as leituras em espectrofotômetro a 280 nm. O teor de lignina solúvel foi calculado de acordo com as Equações 7 e 8:

$$C_{lig} = 4,187 \times 10^{-2}(A_t - A_{pd}) - 3,279 \times 10^{-4} \quad \text{Eq. (7)}$$

$$A_{pd} = C_1 \varepsilon_1 + C_2 \varepsilon_2 \quad \text{Eq. (8)}$$

Em que:

C_{lig} – concentração de lignina solúvel, em g/L;

A_t – absorvância (280 nm) da solução de lignina com os produtos de degradação;

A_{pd} – absorvância, a 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (hidroximetilfurfural (HMF) e furfural), calculado a partir da Equação 7, cujas concentrações C_1 e C_2 foram previamente determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e ε_1 e ε_2 são as absorvâncias do HMF e furfural (114,0 e 146,85 L.g⁻¹cm⁻¹, respectivamente).

4.7.5.3 Lignina total

O teor da lignina total foi calculado com base nos resultados da lignina solúvel e insolúvel, conforme descrito abaixo:

$$\% \text{lignina total} = \% \text{lignina insolúvel} + \% \text{lignina solúvel}$$

4.7.5.4 Determinação dos teores de celulose e hemicelulose

A quantificação dos teores de celulose e hemicelulose foram feitas a partir da transferência de 20 mL do licor obtido da hidrólise (item 4.7.5) para um Erlenmeyer de 50 mL. Em seguida, foi adicionado, lentamente, carbonato de cálcio até pH 5. Após decantação, uma alíquota do sobrenadante foi retirada, filtrada em cartucho “Sep Pak” C18, para análise em CLAE das concentrações de açúcares, conforme descrito no método para determinação de açúcares (4.7.6).

As porcentagens de celulose ou hemicelulose foram obtidas a partir da concentração de açúcares monoméricos, de acordo com as Equações 9 e 10:

$$\% \text{ Celulose} = \left(\frac{C_{\text{CLAE}} \cdot \text{CA} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (9)}$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \left(\frac{C_{\text{CLAE}} \cdot \text{CA} \cdot V_{\text{filtrado}}}{M_1} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (10)}$$

Em que:

C_{CLAE} – concentração do açúcar quantificado por CLAE, em g/L;

CA – anidro correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares, dada a concentração monomérica dos açúcares, sendo, para glicose, celobiose, xilose e arabinose os fatores 0,90, 0,95, 0,88 e 0,88, respectivamente.

V_{filtrado} – volume do hidrolisado filtrado;

M_1 – massa da amostra seca utilizada na hidrólise, em g.

4.7.6 Determinação da concentração de glicose, xilose, celobiose, ácido acético, glicerol e etanol

Para quantificação dos açúcares, ácido acético, glicerol e etanol, as amostras foram purificadas em cartucho Sep Pak C18 e analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo 20A), com detector de índice de refração, empregando coluna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8%); 150 x 7.8 mm; fase móvel: H₂SO₄ 0,005 mol/L; fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura do forno 65°C (CAMARGO et al., 2014). Curvas de calibração foram obtidas para cada composto.

As concentrações de glicose, xilose, arabinose e celobiose, bem como ácido acético, glicerol e etanol, foram determinadas a partir de curvas padrão, obtidas com padrões de alta pureza (98-99%, SIGMA e VETEC).

4.7.7 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural

Para a determinação da concentração dos compostos furfural e HMF, as amostras foram filtradas em membrana HAWP 0,45 μm (MILLIPORE), para total remoção de partículas sólidas. O eluente foi filtrado a vácuo, empregando-se membrana GVWP 0,22 μm (MILLIPORE) e, em seguida, desgaseificado em banho de ultrassom (Microsonic SX-50) por 15 min.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido, empregando as seguintes condições: coluna Kinetex Phenomenex, C18, 5 μm 100Å 150 x 4,6 mm; temperatura ambiente (25°C); detector de ultravioleta (SPD-20A), a 208 nm; como fase móvel, foi utilizada solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; volume da amostra injetada, 20 μL (CAMARGO et al., 2019). As concentrações desses compostos foram determinadas a partir de curvas padrão obtidas com padrões de alta pureza (99%, SIGMA).

4.7.8 Determinação da concentração de fenóis

A concentração de fenóis totais no hidrolisado foi determinada conforme o método de Folin Ciocalteu. Nesse processo, foram adicionados 0,2 mL de reagente Folin Ciocalteu a 3 mL de amostra do hidrolisado. Após 5 minutos, foram adicionados 0,8 mL de solução de carbonato de sódio (150 g/L), seguido de agitação em vortex. As amostras foram mantidas no escuro por 30 minutos. Em seguida, foram feitas as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro a 750 nm.

As concentrações foram calculadas com base em uma curva padrão de vanilina (Sigma–98% de pureza) (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELARAVENTOS, 1999).

4.7.9 Determinação da atividade enzimática

A atividade celulásica total, expressa em unidades de papel filtro (FPU) por mL do complexo, foi determinada segundo a metodologia proposta por Ghose (1987). A conversão da celulose em glicose foi realizada utilizando o complexo comercial de celulases Cellic[®]CTec2 da Sigma-Aldrich.

Utilizando solução tampão citrato de sódio (0,05 mol/L, pH 4,8), foram preparadas quatro diferentes diluições do complexo enzimático. Foi confeccionada uma curva de calibração a partir de tubos (em duplicata), contendo 1 mL de solução tampão citrato e 0,5 mL de solução padrão de glicose (1 mg/0,5 mL; 1,65 mg/0,5 mL; 2,5 mg/0,5 mL e 3,35 mg/0,5 mL). Tubos de ensaio, em duplicata, foram preparados, adicionando 1 mL de solução tampão citrato, 50 mg de substrato (aproximadamente 1 x 4,55 cm de papel filtro

qualitativo, 80 g.m², 205 µm de espessura, 0,5% de cinzas, poro 14 µm, permeabilidade ao ar de 14 L.s⁻¹m²), e 0,5 mL da enzima adequadamente diluída. Como branco da enzima, foram adicionados, em diferentes tubos, 1 mL da solução tampão e 0,5 mL das respectivas diluições da enzima. Para o branco do substrato, foram preparados tubos, contendo 1,5 mL de solução tampão e o substrato (fita de papel filtro). O tubo correspondente ao branco foi preparado adicionando apenas 1,5 mL de solução tampão. Em seguida, todos os tubos foram incubados em banho-maria, a 50°C, por 60 minutos. Após esse período, foram adicionados 3 mL da solução de ácido dinitrosalícílico (DNS), homogeneizados e fervidos por 5 minutos, seguido de resfriamento. Em seguida, foram adicionados 20 mL de água destilada e, então, a determinação dos açúcares redutores; segundo Miller (1959), em espectrofotômetro (UV-VIS FEMTO 700 Plus) a 540 nm. A concentração de enzima, que liberou exatamente 2 mg de glicose, durante a reação, foi estimada por meio da equação da reta, correlacionando a concentração de glicose e o logaritmo da concentração de enzima, conforme protocolo descrito por Ghose (1987). Para o cálculo da atividade enzimática, foi utilizada a Equação 11, proposta por Ghose (1987):

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{Concentração de enzima que libera 2,0 mg de glicose}} \text{ unidade/mL} \quad \text{Eq. (11)}$$

4.7.10 Determinação da concentração celular

Para a avaliação do crescimento celular final de *K. marxianus* ATCC 36907, no processo de SSF, as amostras foram devidamente diluídas e submetidas à contagem direta das células livres em câmara de Neubauer, em microscópio óptico. Para cada amostra, a contagem foi realizada em cinco campos e em duplicata, para posterior obtenção dos valores médios.

4.7.11 Determinação do pH

A determinação do pH, nas amostras do tempo final (96 horas), foi realizada por leitura direta, utilizando-se potenciômetro de bancada da marca Luthon pH206.

4.8 Cálculo dos parâmetros fermentativos

4.8.1 Produtividade volumétrica em etanol (Q_p)

A produtividade volumétrica em etanol (Q_p), expressa em $g/L.h^{-1}$, foi calculada utilizando a Equação 12:

$$Q_P = \left(\frac{\Delta P}{\Delta t} \right) = \left(\frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \right) \quad \text{Eq. (12)}$$

Em que:

P_i e P_b - concentração inicial e final de etanol.

t_i e t_f - tempo inicial e final da fermentação.

4.8.2 Fator de conversão da celulose em etanol ($Y_{E/C}$).

O fator de conversão de celulose em etanol, por *K. marxianus*, foi calculado a partir da equação 13:

$$\% \text{ Conversão de celulose em etanol} = \frac{[ETOH]_f - [ETOH]_0}{0,51(f[Biomassa]^{1,111})} \times 100 \quad \text{Eq. (13)}$$

Em que:

$[ETOH]_f$ – Concentração de etanol no final da fermentação (g/L);

$[ETOH]_0$ – concentração de etanol no início da fermentação (g/L), que deve ser zero;

$[Biomassa]$ – Concentração da biomassa seca no início da fermentação (g/L);

f – Fração de celulose na biomassa seca (g/g);

0,51 – Fator de conversão para glicose em etanol com base na bioquímica estequiométrica de levedura;

1,111 – Fator de conversão de celulose em glicose equivalente.

4.8.3 Eficiência de conversão de celulose (ECC).

A eficiência de conversão de celulose (ECC), expressa em porcentagem, foi calculada, utilizando a Equação 14:

$$\% \text{ ECC} = \frac{[\text{Glicose}] + 1,053 [\text{Celobiose}]}{1,111 f [\text{Biomassa}]} \times 100 \quad \text{Eq. (14)}$$

Em que:

[Glicose] = Concentração de glicose (g/L);

[Celobiose] = Concentração de celobiose (g/L);

[Biomassa] = Concentração de biomassa seca no início da fermentação (g/L);

f = fração de celulose na biomassa seca (g/g);

1,053 = fator de conversão de celobiose em glicose equivalente;

1,111 = fator de conversão de celulose em glicose equivalente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da composição química da casca de arroz antes e após tratamento alcalino

A composição química da casca de arroz *in natura* e após o tratamento, bem como o percentual de remoção da lignina, são descritos na Tabela 3. A casca de arroz apresentou teores de celulose (36,03%), hemicelulose (14,71%), lignina (26,47%) e cinzas (18,94%). Esses valores estão de acordo com os obtidos em outros estudos com casca de arroz (HICKERT et al., 2013; CABRERA et al., 2014; ZHANG et al., 2015; MONTIPÓ et al., 2019), os quais apresentaram entre 33,79 – 36,0% de celulose, 12,0 – 18,20% de hemicelulose, 24,52 – 29,0% de lignina e 15,90 – 18,85% de cinzas.

Tabela 3 Composição química da casca de arroz *in natura* e após pré-tratamento com NaOH 8% (m/v)

	Casca de arroz antes do pré-tratamento	Casca de arroz após pré-tratamento
Celulose (%)	36,03 ± 1,11	70,27 ± 4,51
Hemicelulose (%)	14,71 ± 0,34	8,39 ± 0,40
Lignina (%)	26,47 ± 4,80	21,34 ± 2,89
Extrativos (%)	5,27 ± 0,21	nd
Cinzas (%)	18,94 ± 0,21	nd
Proteína (%)	2,63 ± 0,00	nd
Umidade (%)	8,44 ± 0,01	nd

Nota: nd = não determinado. Valores médios de triplicatas ± desvio padrão das amostras.

Após o tratamento alcalino com NaOH 8% (m/v), 121°C por 30 minutos em autoclave, a casca de arroz apresentou teores de celulose de 70,27%, 8,39% de hemicelulose e 21,34% de lignina (Tabela 3). O tratamento proporcionou um aumento de 95,03% na fração de celulose, indicando que não houve degradação desse carboidrato. Quanto às frações de hemicelulose e lignina, tiveram uma redução de 42,96% e 5,12%, respectivamente. A remoção de hemicelulose e lignina da biomassa favorece o desempenho enzimático durante a etapa de hidrólise, por aumentar a acessibilidade da enzima às fibras celulósicas. Isso porque as fibras de celulose são incorporadas a uma rede de hemicelulose e lignina, que são interrompidas quando a biomassa é pré-tratada (AGBOR et al., 2011; SAINI et al., 2016).

A Tabela 4 apresenta uma comparação da composição química da casca de arroz, utilizada neste estudo, em relação a diferentes biomassas lignocelulósicas. Verifica-se que o

conteúdo de celulose (36,03%), na casca de arroz utilizada neste trabalho, é muito próximo aos encontrados em outras biomassas, como bagaço de sorgo sacarino (36,08%) (CAMARGO et al., 2019), sabugo de milho (37,0%) (SAHA et al., 2013), bagaço de cana-de-açúcar (38,59%) (GUILHERME et al., 2019) e palha de cevada (38,55%) (MORAES et al., 2018), sugerindo que a casca de arroz é uma matéria-prima promissora para utilização em processos de bioconversão.

Tabela 4 Comparação da composição química da casca de arroz usada neste trabalho em relação a diferentes biomassas lignocelulósicas

Biomassa lignocelulósica	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Referência
Casca de arroz	36,03	14,71	26,47	18,94	Este estudo
Bagaço de cana-de-açúcar	38,59	27,89	17,79	nr	Guilherme et al. (2019)
Bagaço de sorgo sacarino	36,08	31,18	24,77	3,31	Camargo et al. (2019)
Palha de cevada	38,55	21,41	19,90	9,50	Moraes et al. (2018)
Palha de trigo	31,6	16,2	21,2	nr	Qiu et al. (2017)
Palha de cana-de-açúcar	31,70	27,00	31,10	1,50	Hernández-Pérez et al. (2016)
Palha de sorgo	39,50	27,90	23,10	5,50	Camargo et al. (2015)
Farelo de girassol	32,93	30,90	26,62	5,05	Camargo et al. (2014)
Sabugo de milho	37,0	31,3	18,8	7,3	Saha et al. (2013)

Nota: nr = não relatado

Apesar da composição rica em celulose e hemicelulose, a casca de arroz apresentou elevados teores de lignina e cinzas. O conteúdo de lignina é superior aos encontrados em outras biomassas (Tabela 4), como bagaço de cana-de-açúcar (17,79%) (GUILHERME et al., 2019), sabugo de milho (18,8%) (SAHA et al., 2013), palha de cevada (19,90%) (MORAES et al., 2018) e palha de trigo (21,2%) (QIU et al., 2017), mas está abaixo do teor obtido por Hernández-Pérez et al. (2016) com palha de cana-de-açúcar (31,10%). O problema de elevados conteúdos de lignina na biomassa está relacionado à formação de compostos fenólicos provenientes da degradação dos componentes presentes na lignina, durante pré-tratamentos, dependendo das condições de reação (RASMUSSEN et al., 2014; KIM, 2018); além disso, exerce efeitos inibitórios na ação enzimática devido à adsorção improdutivo na lignina, reduzindo o acesso eficiente da enzima à celulose (ZHANG et al., 2017).

Para visualizar possíveis alterações estruturais na biomassa, foram feitas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura 8 mostra o aspecto morfológico da casca de arroz *in natura* e após o tratamento alcalino.

É possível observar que a casca de arroz *in natura* (Figura 8A-C-E) apresenta um aspecto morfológico característico, com uma estrutura superficial ordenada e compacta, além de protuberâncias e sulcos paralelos, compatíveis ao encontrado na literatura para casca de arroz (JOHAR et al., 2012; SCAGLIONI; BADIALE-FURLONG, 2016; EBRAHIMI et al., 2017); ademais, há depósitos de grânulos, principalmente, nos espaços entre as protuberâncias, que correspondem a partículas de sílica, semelhantes ao visualizado por Park et al. (2003). Na Figura 8-D-F, é possível visualizar que o pré-tratamento promoveu alterações na estrutura da biomassa, como a desorganização das fibras e a formação de poros. A criação de poros na superfície se deve, provavelmente, à remoção de hemicelulose e lignina da biomassa (SHIMIZU et al., 2019). Nota-se, na Figura 8D, a ausência dos depósitos de grânulos na superfície (partículas de sílica), como visualizado na casca de arroz *in natura* (Figura 8C), indicando que o pré-tratamento também contribuiu para a remoção de sílica. Segundo Bazargan et al. (2015), o tratamento com NaOH promove a extração eficiente de sílica, por meio da formação de silicato de sódio (Na_2SiO_3), que é lixiviado na fração líquida.

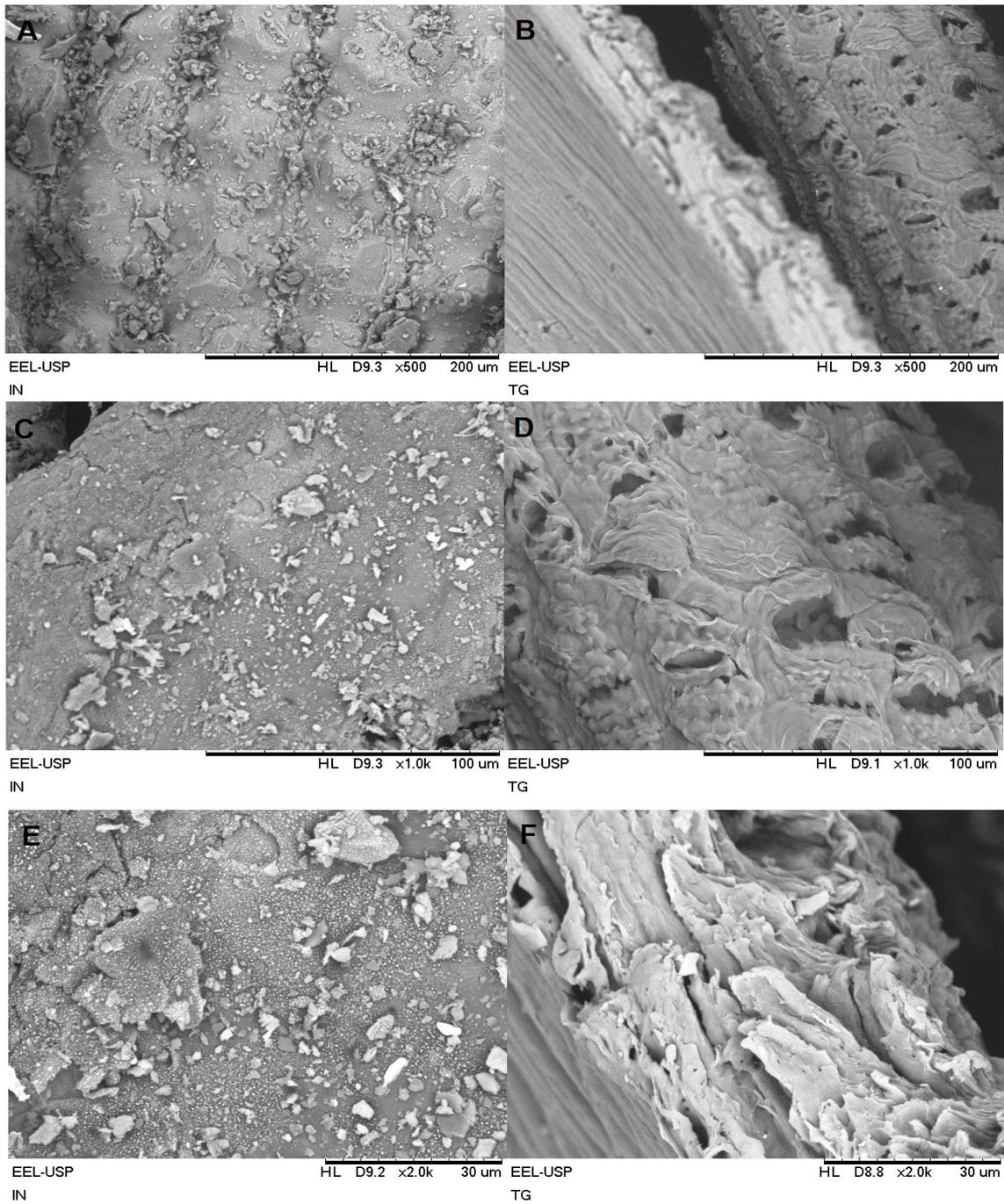


Figura 8 Micrografias eletrônicas da casca de arroz reduzida a partículas de 50 mesh, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) in natura e (B) pré-tratada, ampliadas 500 x; (C) in natura e (D) pré-tratada, ampliadas 1000 x; (E) in natura e (F) pré-tratada, ampliadas 2000 x.

A Figura 9 mostra os espectros FTIR, obtidos para a casca de arroz *in natura* e após tratamento com NaOH 8% (m/v). Com base nos padrões de bandas encontrados, verifica-se que houve mudanças na estrutura química da biomassa pré-tratada, em comparação à biomassa *in natura*.

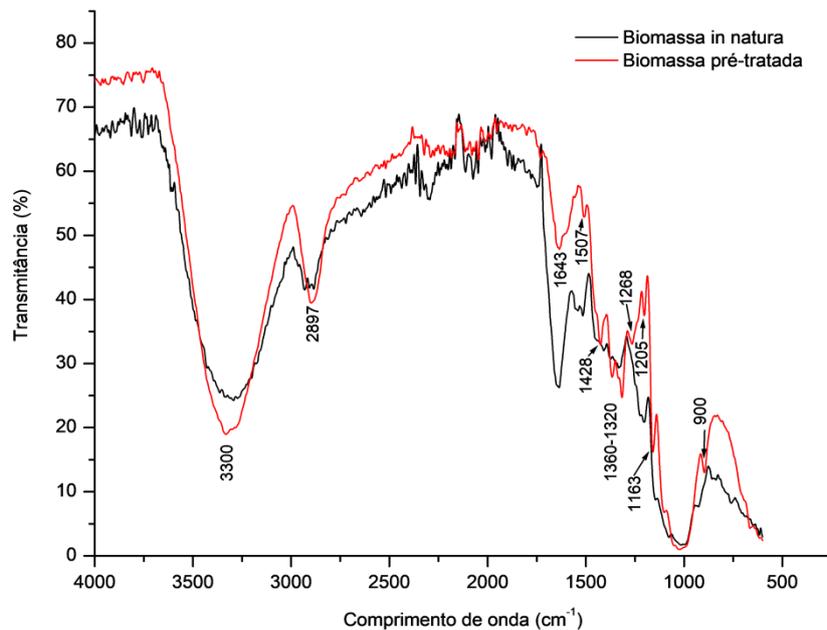


Figura 9 Espectro FTIR da casca de arroz *in natura* e após pré-tratada com NaOH 8% (121 °C, autoclave, 30 min.)

É possível visualizar bandas nas regiões próximas de 3300-2897 cm^{-1} tanto na biomassa *in natura* quanto na biomassa pré-tratada, em diferentes intensidades, as quais são atribuídas ao alongamento de ligações dos grupos O—H e C—H, referentes às ligações de hidrogênio e grupos metil e metileno característicos da fração de celulose (VENTURIN et al., 2018). Verifica-se a presença de uma banda na região de 1428 cm^{-1} na casca de arroz pré-tratada, podendo ser atribuída à vibração em ligações CH_2 , presentes na celulose e hemicelulose (LI et al., 2018).

Nota-se, também, uma redução expressiva na banda em 1643 cm^{-1} , na biomassa pré-tratada, e uma redução de banda na região de 1507 cm^{-1} . A presença de bandas, na região de 1640 cm^{-1} , está relacionada a ligações O—H, correspondentes à absorção de água (JOHAR et al., 2012). Enquanto, em 1507 cm^{-1} , atribui-se ao estiramento em grupos C=C de anéis aromáticos na lignina (ALEMDAR; SAIN, 2008). A redução nessas bandas indica a remoção parcial da hemicelulose e da lignina, respectivamente (ALEMDAR; SAIN, 2008). Observa-se a formação de bandas entre 1360-1320 cm^{-1} , que se referem aos alongamentos fenólico de O—H e do anel siringil, que levam a alterações na estrutura e no monômero da lignina (VENTURIN et al., 2018).

Na biomassa pré-tratada, verifica-se a redução na banda em 1268 cm^{-1} , atribuída ao alongamento da ligação C—H do anel guaiacil, o que sugere mudanças no monômero da lignina (ZHAO et al., 2016). A presença de bandas, em 1205 e 1163 cm^{-1} , sugere o envolvimento de grupos funcionais presentes na celulose, hemicelulose e lignina. De acordo com a literatura, bandas na região de 1200 cm^{-1} sugerem alterações nas ligações O—H em

celulose e hemicelulose e em 1160 cm^{-1} , ao estiramento assimétrico em C—O—C, também na estrutura da celulose e hemicelulose (SILLS; GOSSET, 2012). Já alterações na banda em regiões próximas a 900 cm^{-1} , são atribuídas ao alongamento em C—O e vibração em grupos C—H, encontrados na estrutura da celulose (ALEMDAR; SAIN, 2008).

A Tabela 5 apresenta um resumo com as posições de todas as bandas referentes às frações de celulose, hemicelulose e lignina da casca de arroz pré-tratada, observadas nos espectros da Figura 9, em comparação aos dados da literatura para biomassas lignocelulósicas, submetidas a diferentes pré-tratamentos.

Tabela 5 Bandas de vibração no infravermelho observadas na casca de arroz após pré-tratamento alcalino (NaOH 8%, 121 °C, 30 min, autoclave) e grupos funcionais atribuídos

Comprimento de onda (cm^{-1})		Atribuições/Grupos funcionais	Referências
Casca de arroz pré-tratada	Diferentes biomassas lignocelulósicas		
3300-2897	3348-2900	Alongamento em O—H e C—H ligações de hidrogênio e grupos metil e metileno (celulose)	Venturin et al. (2018)
1643	1638	Ligação O—H referente à absorção de água	Johar et al. (2012)
1507	1507	Estiramento em C=C de anéis aromáticos (lignina)	Alemdar e Sain (2008)
1428	1425	Vibração em CH_2 (celulose e hemicelulose)	Li et al. (2018)
1360	1373	Alongamento fenólico O—H	Venturin et al. (2018)
1320	1319	Alongamento anel siringil	
1268	1268	Alongamento C—H do anel guaiacil	Zhao et al. (2016)
1205	1200	Mudanças nas ligações O—H (celulose e hemicelulose)	Sills e Gossett. (2012)
1163	1160	Estiramento assimétrico em C—O—C (celulose e hemicelulose)	
900	896	Alongamento em C—O e vibração em grupos C—H (celulose)	Alemdar e Sain (2008)

5.2 Parte I - Efeito da alimentação no processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) da celulose de casca de arroz

5.2.1 Determinação da carga enzimática

Após pré-tratamento com NaOH 8% (m/v), a biomassa de casca de arroz foi submetida à hidrólise enzimática para avaliação de diferentes cargas enzimáticas do complexo comercial de celulasas Cellic[®]CTec2 da Sigma-Aldrich. Na Figura 10, estão apresentados os resultados dos perfis de liberação de AR obtidos com a adição de 5; 11 e 22 FPU/g_{celulose} de casca de arroz, ao longo de 96 horas de processo.

A maior concentração de AR ocorreu com a adição de 22 FPU/g de celulose ($42,49 \pm 0,02$ g/L), seguido do ensaio com adição de 11 FPU/g_{celulose} ($37,80 \pm 0,03$ g/L) e 5 FPU/g_{celulose} ($29,64 \pm 0,02$), após 96 horas. Essa nova geração de complexos enzimáticos de celulases, como Cellic[®]CTec2, tem demonstrado melhor desempenho comparado às preparações mais antigas (CANELLA et al., 2014) e, por isso, tem sido utilizada na hidrólise de outras biomassas lignocelulósicas, como lascas de bambu e madeira (LUO et al., 2019), cardo (um tipo de herbácea) (COTANA et al., 2015), alcachofra de Jerusalém (KIM; PARK; KIM, 2013), capim (XU et al., 2011) e grãos de cervejaria usados (WILKINSON et al., 2016).

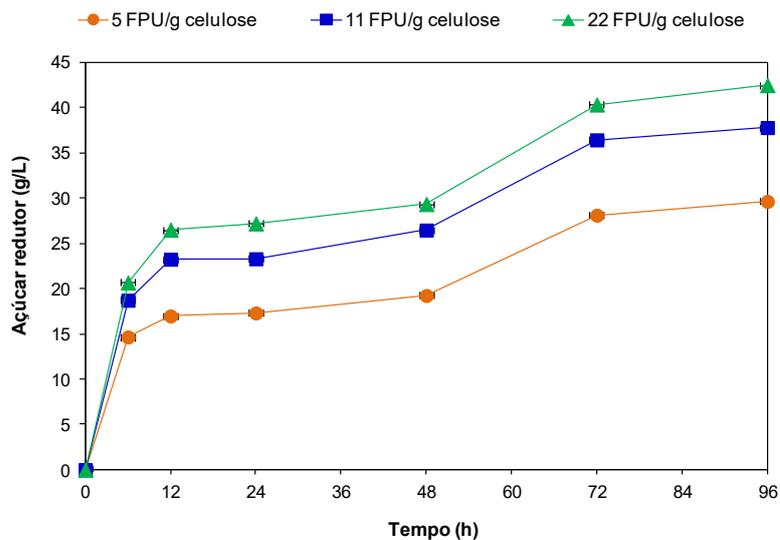


Figura 10 Perfil de liberação de AR durante a hidrólise enzimática da celulose da casca de arroz, após 96 horas de processo utilizando diferentes quantidades de enzima.

Nota-se que, em 6 horas de hidrólise, o perfil do processo foi semelhante nos três ensaios, com rápida liberação de AR para todas as concentrações de enzimas e uma estabilização até 48 horas, apresentando um segundo pico de AR a partir de 72 horas, o que indica que não houve perda da atividade enzimática ao longo da hidrólise. De acordo com Xiros et al. (2017), as novas preparações enzimáticas, como complexo de celulases Cellic[®]CTec2, são menos afetadas pela inibição do produto final como glicose e celobiose, a exemplo do que ocorre com complexos enzimáticos anteriores.

O aumento na carga de enzima de 5 para 11 FPU/g_{celulose} resultou no incremento de 27,53% no teor de AR, enquanto que, na variação de 11 para 22 FPU/g_{celulose}, o percentual foi menor, elevando em 12,41% a concentração de AR ao final do processo (96 horas). A adição de 22 FPU/g de celulose resultou no aumento de 43,35% na liberação de AR em relação à adição de 5 FPU/g_{celulose}. Xu et al. (2011) obtiveram maiores rendimentos de açúcares redutores com uma carga enzimática de 15 FPU/g_{substrato} do complexo Cellic[®]CTec2, durante a hidrólise de um tipo de capim pré-tratado com NaOH 1% (m/v). Os

autores atribuem o desempenho satisfatório com reduzida carga de enzima às características do complexo enzimático, como conteúdo de celulasas mais agressivas e altos níveis de β -glicosidade, além das propriedades da biomassa e das condições de pré-tratamento aplicadas. Zain et al. (2018) relataram maior produção de glicose, utilizando 15 FPU/mL_{glicana} (complexo Cellic[®]CTec2), durante a hidrólise de folhas de palmeira de óleo pré-tratada com 4,42% de NaOH (m/v). Enquanto isso, Lamb et al. (2018) obtiveram o máximo rendimento de glicose com uma carga enzimática de 40 FPU/g_{substrato} (complexo Cellic[®]CTec2), a partir da hidrólise enzimática da casca de arroz pré-tratada com 1% de H₂SO₄ (m/v).

5.2.2 Sacarificação simultânea à fermentação com elevada carga de sólidos

5.2.2.1 Variação nas concentrações de açúcares e produção de etanol

O processo de SSF, com diferentes estratégias de alimentação gradual, com biomassa de casca de arroz pré-tratada, a fim de atingir elevadas cargas de sólidos (20 e 25%), foi avaliado utilizando a levedura *K. marxianus* ATCC 36907.

A Figura 11 mostra os resultados dos perfis de concentração (g/L) de glicose, celobiose e etanol, obtidos durante o processo de fermentação em batelada alimentada, iniciados com 10% (m/v) e terminados em 20% (m/v) de casca de arroz pré-tratada, com duas alimentações (5%) a cada 24 horas, em E1 (Figura 11A), e quatro alimentações (2,5%), a cada 12 horas, em E2 (Figura 11B); iniciados em 15% (m/v) e terminados em 25% (m/v), com duas alimentações a cada 24 horas, em E3 (Figura 11C), e com quatro a cada 12 horas, em E4 (Figura 11D). De forma geral, verifica-se que o perfil de liberação e consumo de glicose, concentração de celobiose e produção de etanol foram semelhantes, independentemente da estratégia de alimentação com casca de arroz tratada.

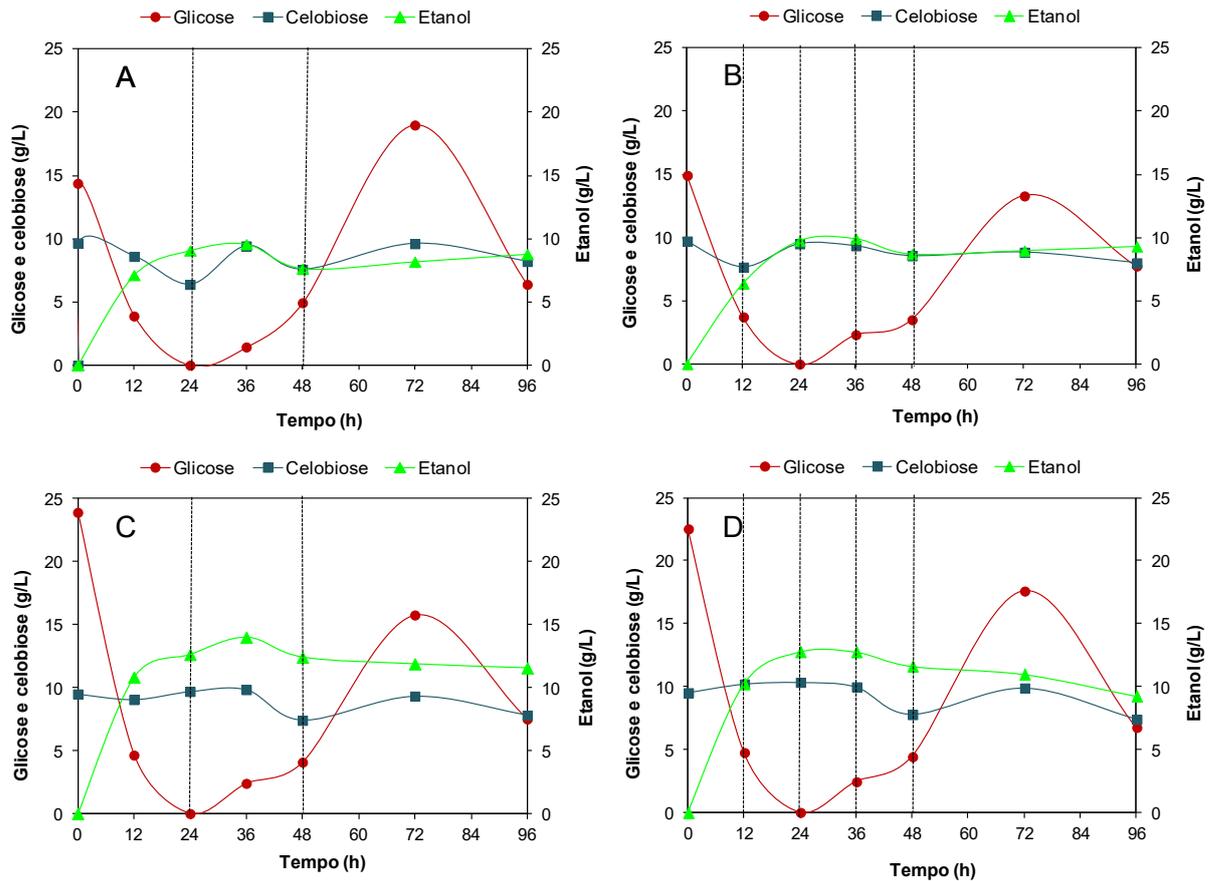


Figura 11 Concentração de glicose, celobiose e produção de etanol por *K. marxianus* ATCC 36907 durante a SSF em batelada alimentada: (A) E1 - concentração inicial de biomassa 10% e final 20% com duas alimentações a cada 24 h; (B) E2 - concentração inicial de biomassa 10% e final 20% com 4 alimentações a cada 12 h; (C) E3 - concentração inicial de biomassa 15% e final 25% com duas alimentações a cada 24 h e (D) E4 - concentração inicial de biomassa 15% e final 25% com 4 alimentações a cada 12 h. As linhas tracejadas na vertical, correspondem ao momento de alimentação com casca de arroz tratada.

Observa-se que, para todas as condições, a glicose se esgotou em 24 horas, independentemente do período e número de alimentações, enquanto que a produção de etanol iniciou em 12 horas. A liberação de glicose é retomada a partir de 36 horas, coincidindo com a alimentação feita no tempo de 24 horas, atingindo a máxima concentração de 18,99; 13,29; 15,76 e 16,66 g/L, para os experimentos E1, E2, E3 e E4, respectivamente, em 72 horas. No entanto, não houve aumentos na produção de etanol. Além disso, nas condições de máxima carga de sólidos (25%), a concentração de etanol apresentou um ligeiro decréscimo a partir de 48 horas. Verifica-se, também, que, embora haja liberação de glicose a partir de 36 horas, com pico em 72 horas, esse açúcar não foi totalmente consumido pela levedura *K. marxianus* ATCC 36907, ou seja, após 72 horas, o micro-organismo consumiu 66,34% (E1), 41,68% (E2), 52,38% (E3) e 59,53% (E4) da glicose, restando 6,39; 7,75; 7,50 e 6,74 g/L dessa hexose, ao final da SSF, nos experimentos E1, E2, E3 e E4, respectivamente.

O acúmulo de glicose pode ser devido à alta carga de sólidos, pois a adição de 12% (m/v) já resultou num teor seis vezes maior de glicose acumulada, em relação à adição de 8% (m/v) (PESSANI et al., 2011). Além disso, o desempenho da levedura, no início da fermentação, pode ter sido afetado devido a um estresse metabólico, resultante da baixa concentração de glicose (BALLESTEROS et al., 2004), visto que, em 24 horas, não havia mais glicose, voltando a ser liberada lentamente entre 36 e 48 horas, mas em baixas concentrações, que variaram entre 1,44 – 4,94 g/L (E1), 2,32 – 3,50 g/L (E2), 2,40 – 4,08 g/L (E3) e 2,43 - 4,42 g/L (E4).

Referente à produção de etanol, os experimentos E3 e E4, iniciados com 15 e terminados em 25% (m/v) de casca de arroz, apresentaram maior produção, sendo 13,99 g/L e 12,77 g/L, em 36 e 24 horas de fermentação, respectivamente, independentemente da estratégia de alimentação. Nos experimentos E1 e E2, iniciados em 10 e terminados em 20% (m/v) de casca de arroz, a produção máxima de etanol foi de 9,57 e 9,92 g/L, respectivamente, em 36 horas.

Esses valores estão abaixo do encontrado por Triwahyuni et al. (2015) que, com uma carga de substrato de 25%, adicionada gradualmente, 18 FPU da enzima Cellic® Ctec2, adicionada de 20% Cellic® Htec2 (com base no volume de Cellic® Ctec2) por g de substrato, obtiveram 83,40 g/L de etanol em processo de SSF, com resíduos de frutos de palmeira (pré-tratado com NaOH 10%), em frascos Erlenmeyer de 250 mL, 1% (g/mL) de células de levedura *S. cerevisiae*, nas condições de 32°C, pH 4.8 e 150 rpm, por 72 horas. Porém, Montipó et al. (2019) obtiveram menor produção de etanol (19,17 g/L), a partir de 20% (m/v) de casca de arroz (pré-tratada por explosão a vapor), sem alimentação gradual, com adição de 20 FPU/g_{substrato} do complexo Celluclast 1,5 L, 2,0 g/L de células de *S. cerevisiae* (37 °C, 180 rpm), também em 72 horas.

A mesma linhagem de levedura, utilizada no presente trabalho, *K. marxianus* ATCC 36907, produziu entre 67,87 e 68,02 g/L de etanol, no tempo de 28 - 56 horas de SSF de bagaço de caju (pré-tratamento ácido-alcálico com 0,6 M de H₂SO₄ e 1,0 M de NaOH; 30 FPU/g de celulose+60 CBU/g de celulose de Celluclast 1,5 L; 5 g/L de células; 40 °C, 150 rpm), com adição gradual de substrato entre 10 a 20% (m/v) e 15 a 25% (m/v), com duas ou quatro alimentações (BARROS et al., 2017). No trabalho de Camargo; Gomes; Sene (2014), a levedura *K. marxianus* ATCC 36907 produziu 27,88 g/L de etanol a partir de 30,6 g/L de glicose, por SSF de farelo de girassol (pré-tratado com 6% de H₂SO₄ (m/v) e 1% NaOH (m/v)), a 38°C, 150 rpm, 8% (m/v) de concentração de substrato e 0,5 g/L de células. Com a linhagem de *K. marxianus* IMB3, Pessani et al. (2011) obtiveram concentrações de etanol entre 30 e 32 g/L, em 48 horas de SSF, com adição de 12% (m/v) de um tipo de capim (pré-tratado por hidrotermólise), 4,85 mL/g_{glicana} do complexo de celulasas Acellerase 1500, 0,2 g/L de células, 45°C, 250 rpm. Com *K. marxianus* CK8, a produção de etanol foi de 15,07 g/L, a partir de 11,7% (m/v) e 12,93 g/L com 10% (m/v) de sólidos durante a SSF

de casca de arroz (pré-tratada com 2% (m/v) de NaOH), a 35°C e 45°C, respectivamente, com tamanho de inóculo 5% (v/v), 20 FPU/g_{substrato} (Meicelase), 150 rpm, 96 horas (NACHAIWIENG et al., 2015).

Com relação à celobiose (Figura 11), as concentrações mantiveram-se com pouca variação ao longo da fermentação, ficando entre 10,12 e 8,20 g/L (E1), 10,23 e 8,00 g/L (E2), 9,77 e 7,81 g/L e 10,02 e 7,39 g/L (E4). Essas concentrações estão próximas do valor obtido por Gao et al. (2018), que foi de 9,38 g/L, durante SSF com 33% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar, utilizado como substrato. Vale ressaltar que, em todos os experimentos, a presença de celobiose nas primeiras horas se deve a uma pré-sacarificação, realizada 6 horas antes da inoculação da levedura, para evitar um possível estresse metabólico ao micro-organismo, pela falta de substrato disponível no meio. Embora tenha relato quanto ao consumo de celobiose por *K. marxianus* (RAJOKA et al., 2003), no presente trabalho, isso não foi observado, assim como no trabalho de Camargo; Gomes; Sene (2014), utilizando-se a mesma levedura *K. marxianus* ATCC 36907.

A Tabela 6 apresenta os resultados para o número de células, valores de pH e parâmetros fermentativos, obtidos no processo de SSF pela levedura *K. marxianus* ATCC 36907.

Tabela 6 Número de células, pH e parâmetros obtidos no processo de SSF conduzido a 40°C, 200 rpm por *K. marxianus* ATCC 36907 utilizando diferentes estratégias de alimentação com cargas de sólidos (concentração de biomassa)

Experimentos	Nº de células (10 ⁸ /mL)	pH	Etanol (g/L)	Y _{E/C} (g/g)	Q _P (g/L.h ⁻¹)	η (%)	Tempo (h)
96 h							
E1	3,38 ± 0,21	5,47 ± 0,04	7,12 ± 0,05	0,18 ± 0,01	0,59 ± 0,02	17,96 ± 0,01	12
			9,07 ± 0,01	0,23 ± 0,00	0,38 ± 0,00	22,87 ± 0,00	24
			9,57 ± 0,34	0,16 ± 0,01	0,27 ± 0,01	16,09 ± 0,01	36
E2	4,32 ± 0,94	5,45 ± 0,04	6,36 ± 0,30	0,16 ± 0,01	0,53 ± 0,04	16,04 ± 0,01	12
			9,74 ± 0,86	0,20 ± 0,02	0,41 ± 0,04	19,64 ± 0,02	24
			9,92 ± 0,26	0,17 ± 0,00	0,28 ± 0,01	16,67 ± 0,00	36
E3	4,35 ± 0,44	5,48 ± 0,03	10,83 ± 0,43	0,18 ± 0,01	0,90 ± 0,03	18,21 ± 0,01	12
			12,63 ± 0,03	0,21 ± 0,00	0,53 ± 0,00	21,23 ± 0,01	24
			13,99 ± 0,22	0,18 ± 0,00	0,39 ± 0,01	17,64 ± 0,00	36
E4	5,78 ± 0,26	5,48 ± 0,03	10,22 ± 0,24	0,17 ± 0,00	0,85 ± 0,02	17,18 ± 0,00	12
			12,77 ± 0,19	0,18 ± 0,00	0,53 ± 0,01	18,40 ± 0,01	24
			12,76 ± 0,19	0,16 ± 0,00	0,35 ± 0,01	16,09 ± 0,02	36

Nota: (E1) concentração inicial de biomassa 10% e final 20% com duas alimentações a cada 24 h; (E2) concentração inicial de biomassa 10% e final 20% com 4 alimentações a cada 12 h; (E3) concentração inicial de biomassa 15% e final 25% com duas alimentações a cada 24 h e (E4) concentração inicial de biomassa 15% e final 25% com 4 alimentações a cada 12 h; η (%) = rendimento de celulose em etanol. Valores médios de triplicatas ± desvio padrão das amostras.

Observa-se que, ao final de 96 horas, o número de células foi maior no experimento E4 ($5,78 \times 10^8/\text{mL}$), seguido por E3 ($4,35 \times 10^8/\text{mL}$), E2 ($4,32 \times 10^8/\text{mL}$) e E1 ($3,38 \times 10^8/\text{mL}$). No entanto, o crescimento celular está muito abaixo do observado por Camargo; Gomes; Sene (2014), com a mesma levedura (*K. marxianus* ATCC 36907), que apresentou um crescimento celular de até $14,9 \times 10^8/\text{mL}$, após 72 horas de SSF (38°C ; 150 rpm) de 8% (m/v) de farelo de girassol. Para os valores de pH ao final da fermentação, verifica-se que, em todos os experimentos, não houve variação expressiva, considerando o pH inicial de 5,5, pois o meio utilizado foi tamponado.

Quanto aos parâmetros fermentativos, os maiores rendimentos de etanol ($Y_{E/C}$) foram obtidos em 24 horas; quanto à produtividade volumétrica (Q_P), verificam-se valores elevados nas primeiras 12 horas de fermentação. Para os cálculos de $Y_{E/C}$, foram considerados os percentuais de casca de arroz, adicionados no início de cada experimento (10 ou 15%), somado aos adicionados após cada alimentação (duas alimentações com 5% (m/v) ou quatro de 2,5% (m/v) de casca de arroz).

O experimento E1 apresentou maior $Y_{E/C}$ (0,23 g/g), calculado com base na adição inicial de 10% de casca de arroz, enquanto E2 obteve 0,20 g/g, considerando 12,5% (m/v) de casca de arroz (valor inicial de 10% (m/v) + 2,5% (m/v), adicionado no tempo 12 h), em 24 horas, respectivamente. Em relação aos experimentos E3 e E4, os valores de $Y_{E/C}$ foram 0,21 e 0,18 g/g, respectivamente, também em 24 horas, baseado no teor inicial de 15% (m/v); no caso do E3, de 17,5% (m/v) de casca de arroz (valor inicial de 15% (m/v) + 2,5% (m/v) adicionado no tempo 12 h). Nota-se que as diferentes estratégias de alimentação com casca de arroz não necessariamente resultaram em aumentos na produção de etanol e, conseqüentemente, nos valores de $Y_{E/C}$. Após 12 horas da primeira alimentação com 5% (m/v) de casca de arroz, feita nos experimentos E1 e E3, totalizando 15 e 20% (m/v) de sólidos, respectivamente, observa-se uma redução de 30,43% e 14,29% nos valores de $Y_{E/C}$. Já nos experimentos E2 e E4, após duas alimentações com 2,5% (12 em 12 horas), houve decréscimo de 15 e 11,11% nos $Y_{E/C}$, respectivamente. Varga et al. (2004) verificaram rendimentos de etanol ($Y_{EtOH\%}$) considerados baixos, entre 4,4 e 5,3%, com adição de 20% (m/v) de sólidos de palha de milho (após pré-tratamentos alcalino e ácido via oxidação úmida). Camargo; Gomes; Sene (2014), adicionando 8% (m/v) de sólidos de farelo de girassol, obtiveram um rendimento de etanol ($Y_{P/S}$) de 0,47 g/g em 72 horas.

A produtividade volumétrica (Q_P) foi de 0,90 e 0,85 g/L.h⁻¹, nos experimentos E3 e E4, sendo os maiores valores obtidos, enquanto que E1 e E2 alcançaram 0,59 e 0,53 g/L.h⁻¹, respectivamente, todos em 12 horas de fermentação. Esses valores mais elevados de Q_P se devem a uma produção de etanol relativamente alta já nas primeiras 12 horas de SSF, embora não sejam referentes à produção máxima (Tabela 6). Porém, esse parâmetro decresce após esse período, sendo de 0,53 g/L.h⁻¹ (E3 e E4), 0,41 g/L.h⁻¹ (E2) e 0,38 g/L.h⁻¹ (E1), ou seja, após 12 horas, a Q_P reduziu 41,11 e 37,65% (E3 e E4) e 22,64 e 35,59% (E2

e E1), respectivamente, apesar da alimentação do processo com casca de arroz, realizada em 12 horas, nos experimentos E3 e E4. Ao final de 96 horas de fermentação, a redução na Q_p foi de 77,36 e 81,13%, nos experimentos E3 e E4, e de 76,32 e 75,61%, em E1 e E2, respectivamente, em relação aos valores obtidos em 24 horas.

A queda no rendimento e produtividade de etanol, durante a SSF com alta carga de sólidos, é reportada na literatura por Liu et al. (2014), com 25,4% (m/m) de palha de milho pré-tratada por explosão a vapor; Gao et al. (2018), com 19; 26 e 33% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado com NaOH 1,8%; Zheng et al. (2020), com o aumento da concentração de substrato (resíduo de sabugo de milho e torta de sementes) para 20% (m/m) e, possivelmente, está relacionada ao aumento da viscosidade do meio, com consequente redução da eficiência da mistura dos componentes, bem como baixa transferência de massa e calor durante o processo (KOPPRAM et al., 2014).

5.2.2.2 Formação de ácido acético e glicerol

A formação de subprodutos, ácido acético e glicerol, por *K. marxianus* ATCC 36907, também foi monitorada durante a SSF, em batelada alimentada, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 12. É possível observar que houve produção de ácido acético e glicerol, nas primeiras 12 horas de fermentação, a qual permaneceu constante após esse período, nos quatro experimentos.

Os experimentos E3 e E4 (Figura 12C-D) apresentaram maiores acúmulos de ácido acético, variando de 13,71 – 16,91 g/L para E3 e 13,46 – 13,98 g/L para E4, que apresentou valor máximo de 15,93 g/L, em 36 horas, sendo superiores à produção de etanol. No experimento E1 (Figura 12A), a concentração foi de 9,9 – 10,69 g/L, com maior produção (12,53 g/L) em 48 horas, enquanto que, para E2 (Figura 12B), as concentrações foram entre 9,96 – 10,24 g/L, com pico de 11,80 g/L, em 24 horas. Zheng et al. (2020) verificaram aumentos nos níveis de subprodutos, como ácido acético, durante a SSF, conforme o aumento no teor de sólidos (resíduos de sabugo de milho) de 10, 15 e 20% (m/v).

A formação de ácido acético durante a SSF com a levedura *K. marxianus* foi relatada empregando a linhagem IMB3, com concentrações máximas de ácido acético de 5,6; 6,3 e 3,6 g/L, com adição de 8% (m/v) de sólidos e temperaturas de 37, 41 e 45°C (PESSANI et al., 2011), e de 2,6 g/L, com 15% (m/v) de sólidos e 2,0 g/L com adição de 10% (m/v) de sólidos (SILVA et al., 2015). Nos quatro experimentos, a produção de ácido acético coincidiu com o consumo de glicose, assim como com a produção de etanol (Figura 11), indicando que o consumo do açúcar também foi direcionado para a formação desse metabólito. Esse acúmulo de ácido acético pode estar relacionado com a menor produção de etanol (NITIYON et al., 2016; ZHENG et al., 2020).

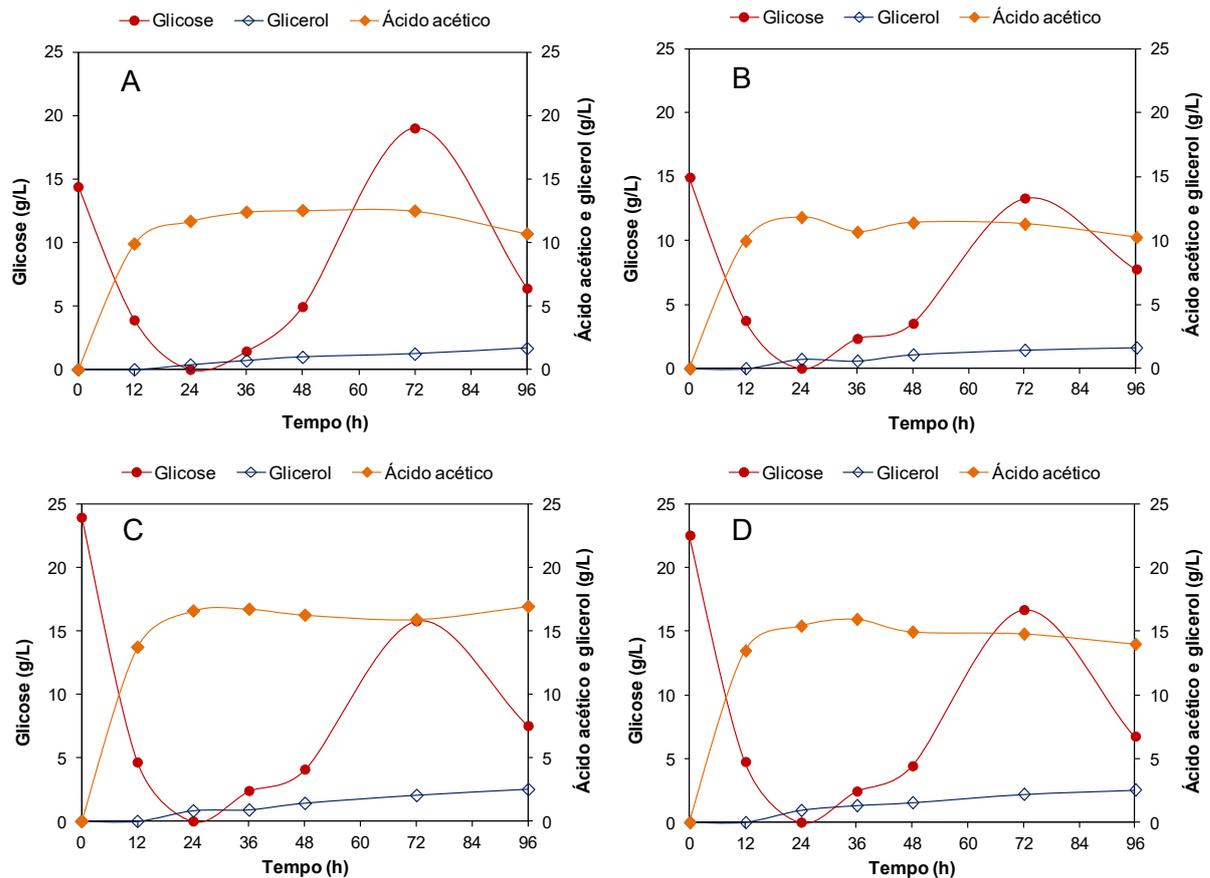


Figura 12 Formação de ácido acético e glicerol em comparação ao perfil de consumo de glicose por *K. marxianus* ATCC 36907 durante a SSF em batelada alimentada: (A) E1 - concentração inicial de biomassa 10% e final 20% com duas alimentações a cada 24 h; (B) E2 - concentração inicial de biomassa 10% e final 20% com 4 alimentações a cada 12 h; (C) E3 - concentração inicial de biomassa 15% e final 25% com duas alimentações a cada 24 h e (D) E4 - concentração inicial de biomassa 15% e final 25% com 4 alimentações a cada 12 h.

As leveduras, classificadas como Crabtree-negativas, como *K. marxianus*, apresentam baixa atividade de piruvato descarboxilase, mas atividade relativamente alta das enzimas acetaldeído desidrogenase e acetil CoA sintetase (VAN URK et al., 1990); seu metabolismo está associado a elevados níveis de ácido acético e produção de acetaldeído (SWIEGERS et al., 2005). Quando em condições limitantes de oxigênio, ocorre um aumento da atividade da piruvato descarboxilase (KIERS et al., 1998; FREN DLUND et al., 2004).

Em condições limitantes de oxigênio ou hipóxia, o crescimento celular requer a manutenção do balanço redox nas células; assim, como estratégia para restaurar esse equilíbrio, a levedura pode formar glicerol, a partir do transporte e oxidação do NADH no citosol (MERICCO et al., 2009) ou seguir para via acetaldeído, formando acetato para regeneração de NADH e NADPH (REMIZE; ANDRIEU; DEQUIN, 2000). Isso porque, sob condições de hipóxia, reduções na taxa de consumo de açúcar e no fluxo de glicerol podem ocorrer e, como consequência disso, levar a um desequilíbrio redox nos níveis

citoplasmático e mitocondrial, como ocorreu com a levedura *Kluyveromyces lactis* (MÉRICO et al., 2009).

No presente trabalho, a adição de altas concentrações de sólidos pode ter contribuído para uma ineficiente difusão de oxigênio, devido à maior viscosidade do meio, o que dificulta a mistura do conteúdo dos frascos, mesmo sob agitação contínua, ocasionando uma possível redução dos níveis de oxigênio dissolvido no meio. O transporte eficiente de oxigênio dissolvido é dependente de uma mistura eficiente e a privação de oxigênio por períodos prolongados de tempo causa danos às células (KOYNOV et al., 2007).

Com relação ao glicerol, a maior produção ocorreu nos experimentos E4 e E3 (Figura 12C-D), variando entre 0,95 – 2,56 g/L e 0,85 – 2,51 g/L, respectivamente. Enquanto nos experimentos E1 e E2 (Figura 12A-B), a produção foi menor, com concentrações entre 0,37 – 1,68 g/L e 0,72 – 1,62 g/L. Esses valores estão de acordo com Camargo; Gomes; Sene (2014), que utilizaram a mesma levedura *K. marxianus* ATCC 36907, a qual apresentou uma produção máxima de 2,67 g/L, durante a SSF de farelo de girassol (8% m/v). Todavia, estão abaixo dos observados por Zheng et al. (2019), que detectaram uma produção de 3,64 g/L do subproduto, durante a SSF com 20% (m/v) de sólidos, utilizando a levedura *S. cerevisiae*, o que é considerado baixo pelos autores. Nota-se que os maiores valores, obtidos no presente estudo, correspondem aos experimentos com teores de sólidos mais elevados (15% inicial e 25% (m/v) final). Zheng et al. (2020) verificaram aumentos na produção de glicerol por *S. cerevisiae*, durante a SSF de resíduo de sabugo de milho, com o aumento da adição de sólidos de 10, 15 e 20% (m/v), sendo as maiores concentrações obtidas com 20% (m/v) de sólidos.

No trabalho, desenvolvido por Pessani et al. (2011), a levedura *K. marxianus* IMB3 também produziu glicerol durante a SSF, com adição de 12% (m/v). Os autores notaram aumentos na produção do subproduto, com o aumento da temperatura (2,4 g/L, a 37°C, e 3,2 g/L, a 45°C). O glicerol é um dos subprodutos formados durante o processo de SSF e também está relacionado com a manutenção do equilíbrio redox (JI et al., 2016), como mencionado anteriormente, em resposta a diferentes condições de estresse, a exemplo das temperaturas elevadas, presença de etanol (FU et al., 2019).

5.3 Parte II - Efeito da adição de surfactante durante a hidrólise enzimática da celulose de casca de arroz

5.3.1 Variação nas concentrações e rendimentos de glicose

As Tabelas 7, 8 e 9 apresentam os ensaios realizados, conforme a matriz do planejamento, com os valores codificados e reais das variáveis estudadas e os resultados

obtidos para a produção de glicose, bem como o rendimento de glicose após 96h de hidrólise enzimática da celulose de casca de arroz, com adição dos surfactantes Polisorbato 80 (PS80), Polietilenoglicol 4000 (PEG) e Triton X-100 (TX-100) e o controle (sem surfactante).

Observa-se que a adição de surfactantes, em associação às diferentes cargas de enzimas, favoreceu o processo de hidrólise, comparado ao experimento controle (sem surfactante). As concentrações de glicose variaram de 32,36 a 79,57 g/L no experimento, com adição de PS 80, de 45,14 a 74,60 g/L, com adição de PEG, de 32,28 a 47,89 g/L, com adição de TX-100, como mostram as Tabelas 6, 7 e 8, respectivamente. No experimento controle, a concentração do açúcar variou de 20,36 a 47,77 g/L, de acordo com a carga de enzima utilizada.

Para o PS 80 (Tabela 7), o ensaio 3 com adição de 10,0 mg/L do surfactante e 19 FPU/g_{celulose} de enzima apresentou a maior concentração de glicose (79,57 g/L), seguido pelo ensaio 6 (70,56 g/L de glicose), com adição de 23,0 mg/L de surfactante e 13,5 FPU/g_{celulose}.

Tabela 7 Concentração de glicose e rendimentos obtidos durante a hidrólise enzimática da celulose da casca de arroz com e sem adição do surfactante Polisorbato 80 (PS80)

Ensaio	96 h			
	X1	X2	Glicose	ECC
	PS80 (mg/L)	Enzima (FPU/g celulose)	g/L	%
1	10 (-1)	8 (-1)	35,30	59,41
2	20 (1)	8 (-1)	37,37	61,73
3	10 (-1)	19 (1)	79,57	123,01
4	20 (1)	19 (1)	52,79	80,30
5	7 (-1,41)	13,5 (0)	53,53	87,15
6	23 (1,41)	13,5 (0)	70,56	113,67
7	15 (0)	5 (-1,41)	32,36	59,46
8	15 (0)	22 (1,41)	42,21	65,64
9	15 (0)	13,5 (0)	43,83	71,50
10	15 (0)	13,5 (0)	42,77	70,70
11	15 (0)	13,5 (0)	45,62	74,12
12	15 (0)	13,5 (0)	47,58	78,77
Controle 5 FPU/g_{celulose}	----	5	20,36 ± 0,11	38,60 ± 0,00
Controle 8 FPU/g_{celulose}	----	8	29,94 ± 0,91	52,52 ± 1,96
Controle 13,5 FPU/g_{celulose}	----	13,5	42,13 ± 2,58	66,89 ± 4,33
Controle 19 FPU/g_{celulose}	----	19	44,66 ± 1,85	65,80 ± 3,48
Controle 22 FPU/g_{celulose}	----	22	47,77 ± 0,96	74,46 ± 1,28

Nota: Concentração de sólidos adicionados nos ensaios = 10% sólidos (m/v); Controle = sem surfactante; ECC = eficiência de conversão da celulose ou produção de glicose a partir da celulose (%); Valores médios de triplicatas ± desvio padrão das amostras.

Nota-se que foi possível alcançar elevada concentração de glicose (70,56 g/L), com uma carga enzimática 38,6% menor, adicionando a maior concentração de PS 80 (23,0 mg/L de surfactante e 13,5 FPU/g de celulose), comparado ao controle com a máxima carga de enzima (22 FPU/g de celulose). De acordo com Okino et al. (2013), o surfactante Tween 80 (nome comercial para Polisorbato 80) pode atuar prevenindo a desativação enzimática e a estabilização de componentes instáveis da celulase, quando em condições de agitação, provavelmente, devido à redução da hidrofobicidade da superfície desses componentes, aumentando o rendimento da hidrólise e, conseqüentemente, da concentração de glicose. A tensão de cisalhamento, resultante da agitação, pode levar à desativação de um componente específico da celulase e, assim, reduzir a atividade da enzima durante o processo (TANEDA et al., 2012).

No experimento com adição de PEG (Tabela 8), a melhor condição foi obtida no ensaio 4 (3,0 g/L de surfactante e 19 FPU/g de celulose), que resultou em maior concentração de glicose (74,60 g/L).

Tabela 8 Concentração de glicose e rendimentos obtidos durante a hidrólise enzimática da celulose da casca de arroz com e sem adição do surfactante Polietilenoglicol 4000 (PEG)

Ensaio	96 h			
	X1	X2	Glicose	ECC
	PEG (g/L)	Enzima (FPU/g celulose)	g/L	%
1	1,0 (-1)	8 (-1)	45,14	72,87
2	3,0 (1)	8 (-1)	60,38	91,90
3	1,0 (-1)	19 (1)	61,84	92,38
4	3,0 (1)	19 (1)	74,60	110,64
5	0,5 (-1,41)	13,5 (0)	45,39	70,11
6	3,5 (1,41)	13,5 (0)	53,33	79,85
7	2,0 (0)	5 (-1,41)	46,58	72,78
8	2,0 (0)	22 (1,41)	57,52	88,22
9	2,0 (0)	13,5 (0)	62,14	95,65
10	2,0 (0)	13,5 (0)	64,74	98,55
11	2,0 (0)	13,5 (0)	62,77	96,57
12	2,0 (0)	13,5 (0)	66,76	102,01
Controle 5 FPU/g_{celulose}	----	5	20,36 ± 0,11	38,60 ± 0,00
Controle 8 FPU/g_{celulose}	----	8	29,94 ± 0,91	52,52 ± 1,96
Controle 13,5 FPU/g_{celulose}	----	13,5	42,13 ± 2,58	66,89 ± 4,33
Controle 19 FPU/g_{celulose}	----	19	44,66 ± 1,85	65,80 ± 3,48
Controle 22 FPU/g_{celulose}	----	22	47,77 ± 0,96	74,46 ± 1,28

Nota: Concentração de sólidos adicionados nos ensaios = 10% sólidos (m/v); Controle = sem surfactante; ECC = eficiência de conversão da celulose ou produção de glicose a partir da celulose (%); Valores médios de triplicatas ± desvio padrão das amostras.

É possível verificar também que a adição de PEG proporcionou um aumento de 52,1% na concentração de glicose, com base na média obtida nos pontos centrais (Ensaio

9-12), em comparação ao controle. Li et al. (2012) sugerem que a ação do PEG-4000, no processo de hidrólise enzimática, está relacionada ao aumento da atividade das enzimas livres no meio, além da interação não apenas com a lignina, mas também com a celulose, o que reduz a adsorção improdutivo.

Em relação à hidrólise enzimática com adição do Triton X-100 (Tabela 9), as concentrações de glicose obtidas foram muito próximas às do controle (sem surfactante), exceto o ensaio 7 (150 mg/L de surfactante e 5 FPU/g de celulose), com adição da menor carga de enzima, que resultou em 13,17 g/L de glicose a mais em relação ao controle com a mesma carga de enzima; isso indica que o surfactante, nesse caso, não melhorou o desempenho da enzima durante o processo.

Tabela 9 Concentração de glicose e rendimentos, obtidos durante a hidrólise enzimática da celulose da casca de arroz com e sem adição do surfactante Triton X-100 (TX-100)

Ensaio	96 h			
	X1	X2	Glicose	ECC
	TX-100 (mg/L)	Enzima (FPU/g celulose)	g/L	%
1	100 (-1)	8 (-1)	32,48	47,78
2	200 (1)	8 (-1)	32,28	55,53
3	100 (-1)	19 (1)	42,43	59,97
4	200 (1)	19 (1)	43,31	62,25
5	75 (-1,41)	13,5 (0)	36,36	56,98
6	225 (1,41)	13,5 (0)	43,69	55,47
7	150 (0)	5 (-1,41)	33,53	58,63
8	150 (0)	22 (1,41)	44,81	66,74
9	150 (0)	13,5 (0)	47,89	69,49
10	150 (0)	13,5 (0)	42,90	63,16
11	150 (0)	13,5 (0)	46,79	67,79
12	150 (0)	13,5 (0)	43,16	62,05
Controle 5 FPU/g_{celulose}	----	5	20,36 ± 0,11	38,60 ± 0,00
Controle 8 FPU/g_{celulose}	----	8	29,94 ± 0,91	52,52 ± 1,96
Controle 13,5 FPU/g_{celulose}	----	13,5	42,13 ± 2,58	66,89 ± 4,33
Controle 19 FPU/g_{celulose}	----	19	44,66 ± 1,85	65,80 ± 3,48
Controle 22 FPU/g_{celulose}	----	22	47,77 ± 0,96	74,46 ± 1,28

Nota: Concentração de sólidos adicionados nos ensaios = 10% sólidos (m/v); Controle = sem surfactante; ECC = eficiência de conversão da celulose ou produção de glicose a partir da celulose (%); Valores médios de triplicatas ± desvio padrão das amostras.

O baixo desempenho da hidrólise enzimática, com adição de Triton X-100, é reportado por Araújo et al. (2017), a partir da hidrólise enzimática da casca de coco verde, e por Zhou et al. (2015), durante a hidrólise de celulose pura. Ao contrário do presente estudo, Qu et al. (2017) obtiveram aumentos satisfatórios no desempenho da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, adicionando Triton X-100. É importante ressaltar que os benefícios da

ação do surfactante dependem, além da concentração e do tipo de surfactante, de outros fatores, como o complexo de celulases utilizado, características da biomassa e das condições de hidrólise (ZHOU et al., 2015).

Quanto aos rendimentos de glicose (ECC), observa-se que a adição dos surfactantes PS80 e PEG contribuíram de forma expressiva com maiores rendimentos (Tabelas 7 e 8); no entanto, observa-se que os valores passaram de 100%, como nos ensaios 3 e 6 do experimento com PS80 (123,01% e 113,67%, respectivamente) e ensaio 4, com adição de PEG (110,64%), o que pode estar relacionado, possivelmente, ao conteúdo subestimado de celulose da biomassa após o tratamento.

Destaca-se que a adição dos surfactantes favoreceu a hidrólise enzimática, principalmente, quando associados às menores cargas de enzimas (5 FPU/g_{celulose}), quando comparado ao controle, como no caso da adição de 5 FPU/g_{celulose} + 15 mg/L de PS80 (ensaio 7), com rendimento de 59,46% (32,36 g/L de glicose), embora não correspondam às máximas concentrações de glicose (Tabela 7).

A melhora no desempenho da hidrólise é ainda mais evidente com a adição de PEG (Tabela 8), como é possível observar no ensaio 1 (8 FPU/g_{celulose} + 1,0 g/L de PEG), ensaio 2 (8 FPU/g_{celulose} + 3,0 g/L de PEG) e ensaio 7 (5 FPU/g_{celulose} + 2,0 g/L de PEG), em que foram obtidos elevados rendimentos de glicose, como 72,87; 91,90 e 72,78%, respectivamente. No controle, os rendimentos foram 38,60%, com adição de 5 FPU/g_{celulose} e 52,52%, com uma carga de enzima de 8 FPU/g_{celulose}.

De acordo com Li et al. (2012), em geral, as celulases se ligam em substratos celulósicos, primeiro com o domínio de ligação à celulose enquanto o domínio catalítico reage com a celulose; assim, quando muita celulase é adsorvida, dificulta-se a aproximação do domínio catalítico à celulose. Como o Polietilenoglicol adsorve na celulose, forma um revestimento que exclui a adsorção de mais celulases, permitindo, assim, a completa reação das celulases adsorvidas, o que resulta na melhoria da hidrólise enzimática (LI et al., 2012).

5.3.2 Análise dos perfis cinéticos da hidrólise enzimática com adição de Polisorbato 80 e Polietilenoglicol-4000

Com base na análise preliminar do perfil de hidrólise da liberação de açúcares redutores, obtido pelo método DNS, não houve melhorias no desempenho da hidrólise enzimática, com adição do TX-100, em comparação ao controle e, por isso, o perfil cinético da liberação de glicose para esse surfactante não foi analisado, apenas a quantificação no tempo final (96 horas), como apresentado na Tabela 9.

As Figuras 13A-E e 14A-E mostram os perfis de liberação de glicose, durante a hidrólise enzimática, nos experimentos com adição de PS80 e PEG, respectivamente, em comparação ao controle, de acordo com as respectivas cargas de enzima. De forma geral,

ocorreu um favorecimento no desempenho da enzima, ao longo de todo o processo, resultando em maiores concentrações de glicose com adição de ambos os surfactantes (PS80 e PEG), já no início da hidrólise, em comparação ao controle com as mesmas cargas enzimáticas.

Comparado ao ensaio controle (19 FPU/g_{celulose} e sem surfactante), a adição de 3,0 g/L de PEG associado à carga enzimática de 19 FPU/g_{celulose} (Figura 14D) resultou em aumentos de 42,8; 57,4; 51,4 e 50,8% de glicose, enquanto o PS80 (Figura 13D) (10,0 mg/L + 19 FPU/g_{celulose}) promoveu aumentos de 33,9; 13,1; 37,4 e 17,5%, em 12, 24, 48 e 72h de hidrólise, respectivamente. Ao final de 96 horas, a adição do PEG resultou em 29,2% a mais de glicose em relação ao controle, enquanto o PS 80 se destacou, aumentando em 37,8% a concentração do açúcar. O efeito do surfactante PEG foi melhor nas primeiras 24h de hidrólise, comparado ao PS 80, resultando em um aumento de 39,1% na concentração de glicose, enquanto que, ao final do processo (96 h), a concentração de glicose foi 5,8% menor em relação à obtida, com adição do PS80.

Esses resultados estão consistentes com os obtidos por outros pesquisadores, como Tu et al. (2009), que obtiveram melhorias no desempenho da hidrólise enzimática de madeira de pinheiro (pré-tratada por explosão a vapor); Oladi; Aita (2018), a partir da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado com hidróxido de amônia); Zhang et al. (2018), durante a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado com cloreto férrico e organosolv), ambos com a adição do surfactante Tween 80; Rocha-Martín et al. (2017), na hidrólise enzimática de biomassas de palha de milho e cana-de-açúcar, pré-tratadas por explosão a vapor e 2,3% de ácido sulfúrico; e Liu et al. (2012), na hidrólise de resíduos de sabugo de milho (pré-tratado com glicerol), adicionando Polietilenoglicol (PEG- 4000).

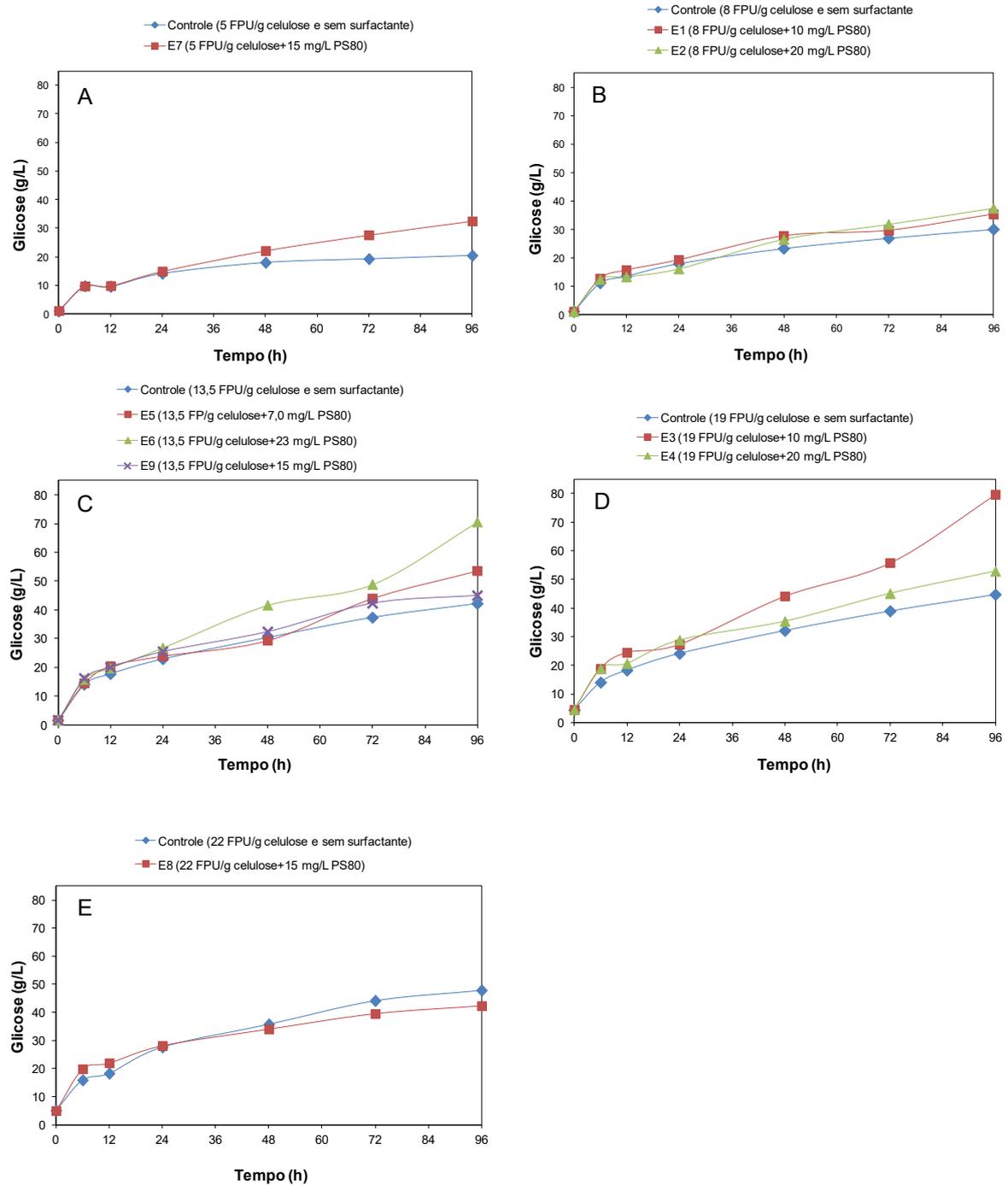


Figura 13 Perfis cinéticos da hidrólise enzimática da casca de arroz com e sem a adição do surfactante Polisorbato 80 (PS80) e diferentes cargas enzimáticas: (A) adição de 5 FPU/g_{celulose}, (B) adição de 8 FPU/g_{celulose}, (C) adição de 13,5 FPU/g_{celulose}, (D) adição de 19 FPU/g_{celulose} e (E) adição 22 FPU/g_{celulose}. Nota: E9 = média de 4 repetições no ponto central.

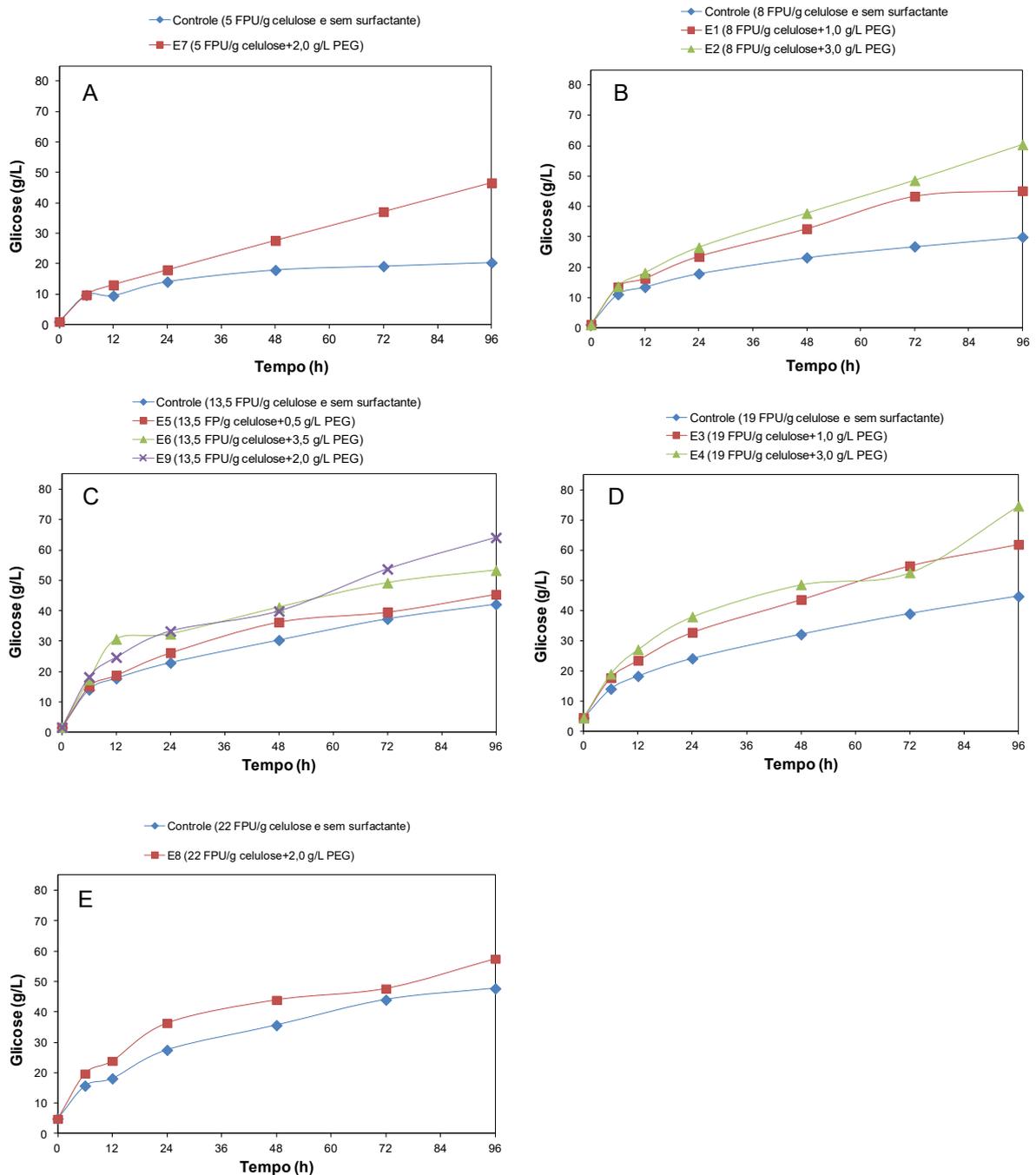


Figura 14 Perfis cinéticos da hidrólise enzimática da casca de arroz com e sem a adição do surfactante Polietilenoglicol 4000 (PEG) e diferentes cargas enzimáticas: (A) adição de 5 FPU/g_{celulose}, (B) adição de 8 FPU/g_{celulose}, (C) adição de 13,5 FPU/g_{celulose}, (D) adição de 19 FPU/g_{celulose} e (E) adição de 22 FPU/g_{celulose}. Nota: E9 = média de 4 repetições no ponto central.

Com relação às concentrações de celobiose, ao final de 96 horas de hidrólise, variaram de 8,40 a 16,94 g/L, para o experimento, com adição de PS80, de 8,33 a 11,95 g/L, no experimento com PEG, e de 9,17 e 10,36 g/L, no controle. No experimento com adição de TX-100, as concentrações finais foram menores, variando de 3,71 a 7,37 g/L. De acordo

com Yang et al. (2010), concentrações de celobiose entre 10 e 20 g/L podem levar a uma ligeira inibição das celulases. No entanto, isso não ocorreu no presente estudo, visto que a atividade enzimática se manteve até o final do processo.

Esses resultados sugerem que a adição dos surfactantes PS80 e PEG não influenciou a atividade da enzima β -glicosidase, que atua na conversão de celobiose em glicose. Hsieh et al. (2015) avaliaram o efeito do PEG-3000 na hidrólise de celobiose pura, utilizando o complexo comercial Cellic[®]CTec2, e verificaram que não houve aumento da produção de glicose, com adição do surfactante, em comparação ao controle (sem surfactante).

5.3.3 Avaliação do efeito da adição dos surfactantes por meio da análise estatística do Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR)

As estimativas dos efeitos principais ao nível de 95% de confiança, para os três surfactantes utilizados (PS 80, PEG e TX-100), são apresentadas na Figura 15. Verifica-se, no gráfico de Pareto, que os dois fatores avaliados, variação nas concentrações de surfactantes associados às diferentes cargas enzimáticas, foram significativos ($p < 0,05$) para os experimentos com PS80 e PEG, enquanto que, no experimento com adição de TX-100, apenas o fator carga enzimática foi significativo ($p < 0,05$). Nos três experimentos com adição de surfactante (PS80, PEG e TX-100), o fator que mais influenciou o aumento da produção de glicose foi a carga enzimática utilizada.

No experimento com adição do surfactante PS80, o fator carga de enzima apresentou os efeitos lineares ($p = 0,001147$) e quadráticos ($p = 0,025681$) significativos, enquanto que, para o fator surfactante, apenas o efeito quadrático foi significativo ($p = 0,001732$). A interação entre os dois fatores foi significativa ($p = 0,006416$) (Figura 15A), no entanto, o efeito dessa interação foi negativo, ou seja, dependendo da concentração do surfactante e da carga enzimática empregada, pode ocorrer uma redução na concentração final de glicose. Quanto ao experimento com adição do surfactante PEG, para o fator carga enzimática, foi significativo tanto o efeito linear ($p = 0,004299$) quanto o quadrático ($p = 0,023132$), assim como, para o fator surfactante, o efeito linear ($p = 0,006952$) e quadrático ($p = 0,009574$) também foram significativos (Figura 15B). O efeito da interação entre os dois fatores não foi significativo ($p > 0,05$), indicando que o efeito da concentração de PEG não interfere no da carga enzimática. Já no experimento com adição de TX-100 (Figura 15C), foi significativo o efeito linear ($p = 0,14155$) e quadrático ($p = 0,039598$) para o fator carga de enzima.

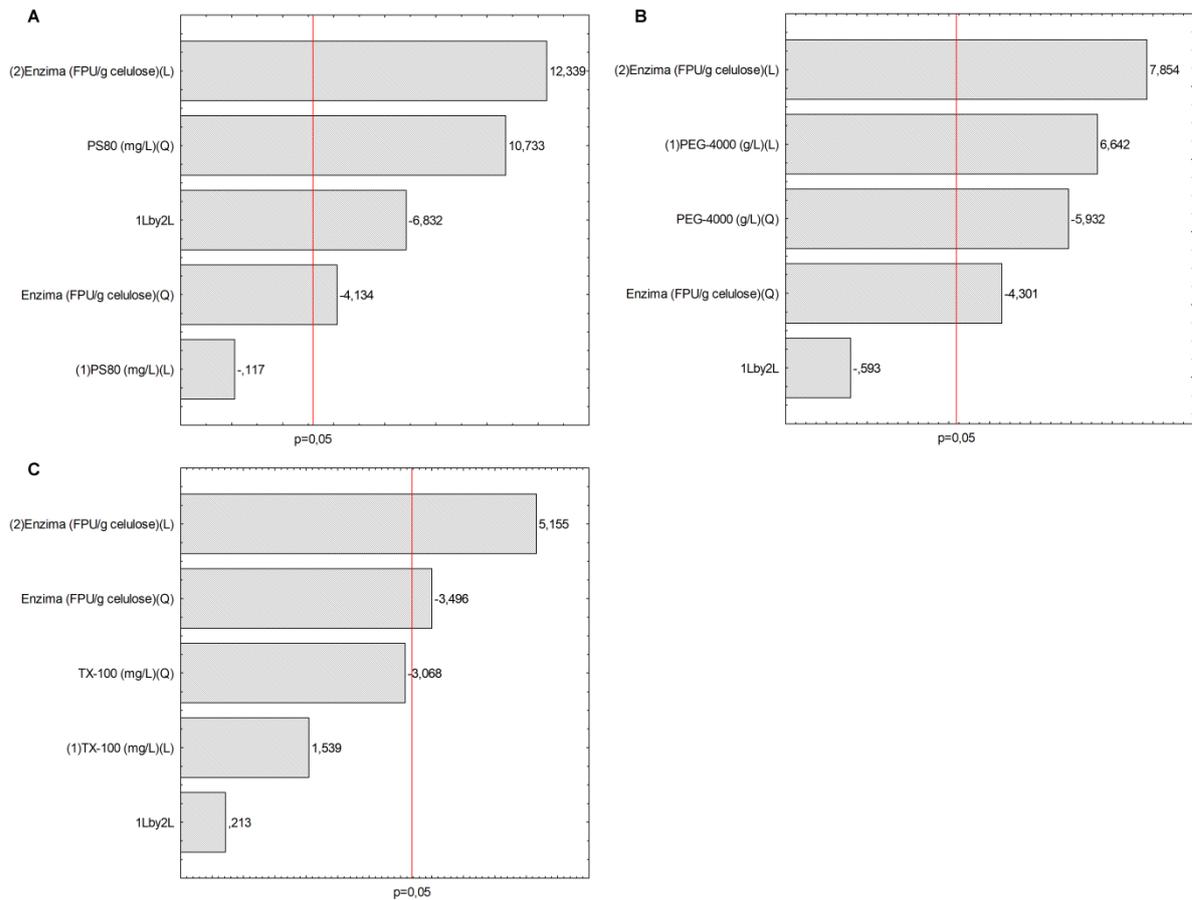


Figura 15 Gráfico de Pareto com os efeitos padronizados para os fatores investigados e suas interações sobre a concentração de glicose ao nível de 95% de confiança: (A) Polisorbato 80, (B) Polietilenoglicol 4000 e (C) Triton X-100.

A Tabela 10 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose obtida com adição de PS80 e PEG, em associação a diferentes cargas de enzimas. Observa-se que, para o experimento com adição de PS80, o valor de F calculado para a regressão (4,80) foi maior que o F tabelado (4,12), indicando que o modelo proposto é significativo. O coeficiente de determinação (R^2) foi 0,73, indicando que 73% da variação, explicada na concentração de glicose, são atribuídos às variáveis estudadas.

Tabela 10 Análise de variância (ANOVA) para concentração de glicose (g/L) ao nível de 95% de confiança

Polisorbato 80 (mg/L)					
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	F tab
Regressão	1580,79	4	395,20	4,80	4,12
Resíduo	576,39	7	82,34		
Falta de ajuste	563,01	4	140,75	31,58	9,12
Erro puro	13,37	3	4,46		
Total	2157,18	11			
R ²	0,73				
Polietilenoglicol 4000 (g/L)					
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F	F tab
Regressão	660,04	4	165,01	4,24	4,12
Resíduo	272,59	7	38,94		
Falta de ajuste	259,50	4	64,87	14,86	9,12
Erro puro	13,10	3	4,37		
Total	932,63	11			
R ²	0,71				

Com base na análise dos coeficientes de regressão obtidos e excluindo o fator não significativo ($p > 0,05$), obteve-se o modelo com as variáveis codificadas da concentração de glicose, em função das variáveis estudadas no experimento com PS80, em associação a diferentes cargas de enzimas, como apresentado na Equação 15:

$$\text{Glicose (g/L)} = 44,95 + 8,99x_1^2 + 9,22x_2 - 3,46x_2^2 - 7,21x_1x_2 \quad \text{Eq (15)}$$

Em que:

x_1 = surfactante PS80 (mg/L);

x_2 = carga de enzima (FPU/g_{celulose}).

Em relação ao experimento com adição de PEG, o valor de F calculado (4,24) também foi maior do que F tabelado (4,12), indicando que o modelo proposto é significativo. O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,71, indicando que 71% da variação, explicada na concentração de glicose, são atribuídos às variáveis estudadas (adição de PEG, associado a diferentes cargas de enzimas). O modelo gerado a partir da análise dos coeficientes de regressão, excluído o fator não significativo, nesse caso, a interação entre PEG e carga enzimática, com as variáveis codificadas da concentração de glicose, em função das variáveis estudadas, é representado pela Equação 16:

$$\text{Glicose (g/L)} = 64,07 + 4,91x_1 - 4,92x_1^2 + 5,81x_2 - 3,57x_2^2 \quad \text{Eq (16)}$$

Em que:

x_1 = surfactante PEG (g/L);

x_2 = carga de enzima (FPU/g_{celulose}).

A Figura 16A-B mostra a superfície de resposta e curvas de contorno para concentração de glicose, em função da adição de PS80, associado a diferentes cargas enzimáticas. Verifica-se que não há uma região ótima na qual se encontra uma faixa de combinações de carga enzimática e concentração de surfactante para a produção de glicose. A adição de enzimas entre 13,5 e 22 FPU/g_{celulose} leva ao aumento da liberação do açúcar, enquanto o surfactante contribui, quando em concentração mais alta (nível 1,41), acima da concentração micelar crítica (CMC). Liu et al. (2011) verificaram que o surfactante Tween 80, quando acima da sua CMC, interage fortemente com a enzima, formando uma micela, por meio da qual a atividade e a estabilidade da enzima são preservadas. Além disso, contribui para o aumento de enzimas livres no meio reacional (TU et al., 2009), sugerindo a redução da adsorção improdutivo na lignina. A ligação improdutivo entre a celulase e a lignina é um dos fatores que diminuem o rendimento da hidrólise (TU et al., 2009).

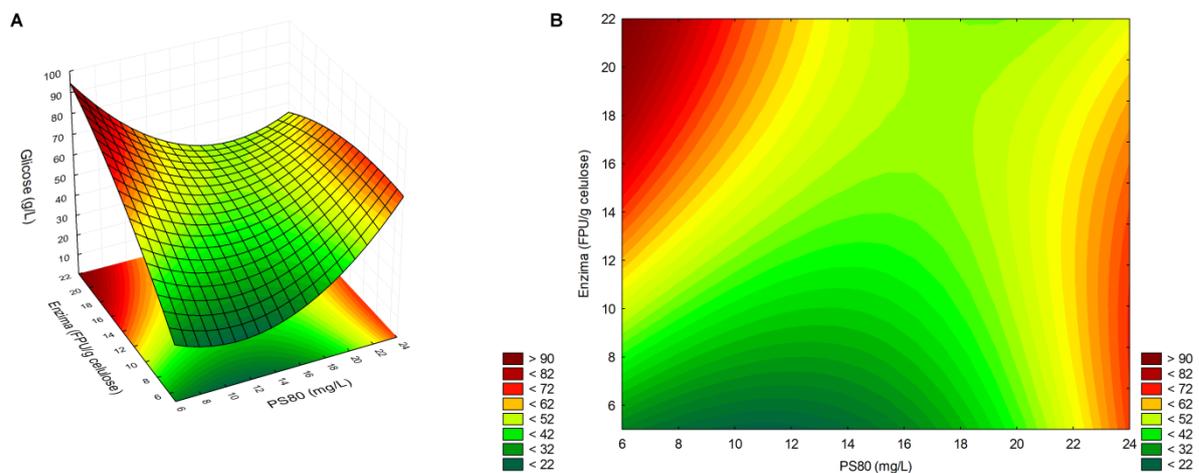


Figura 16 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para concentração de glicose obtida a partir da hidrólise enzimática da casca de arroz em função das concentrações de Polisorbato 80 e enzima.

A análise da superfície de resposta (Figura 17A-B) mostra a existência de uma faixa de carga enzimática entre 13,5 e 22 FPU/g_{celulose}, bem como concentrações do surfactante PEG entre 2,0 e 3,0 g/L, que levam à maior produção de glicose (acima de 60 g/L). É esperado que o aumento da carga de enzimas resulte em teores de glicose mais elevados, no entanto, isso ocasiona aumento dos custos do processo. A adição de 2,5 g/L de PEG

reduziu expressivamente a adsorção improdutivo na biomassa lignocelulósica e aumentou a atividade celulolítica durante a hidrólise (SIPOS et al., 2010). Esses efeitos podem ser vantajosos no caso de reciclagem de enzimas, redução no tempo de hidrólise e de carga enzimática (TU; SADDLER, 2010). No presente estudo, a adição do nível +1 de enzima (19 FPU/g de celulose) proporcionou o máximo teor de glicose (74,60 g/L), mesmo na presença de PEG. Porém, verifica-se que a adição de 8 FPU/g_{celulose} de enzima (nível -1) e 3,0 g/L (nível +1) de PEG também resultou em considerável concentração de glicose (60,38 g/L).

Rocha-Martín et al. (2017) observaram um aumento substancial na conversão da celulose, medido como glicose liberada, quando o PEG-4000 foi adicionado entre 1–2,5 g/L à mistura de hidrólise. No entanto, os autores relatam que, quando concentrações mais altas de PEG (maiores que 2,5 g/L) foram adicionadas à hidrólise, não foram observados aumentos nos seus rendimentos.

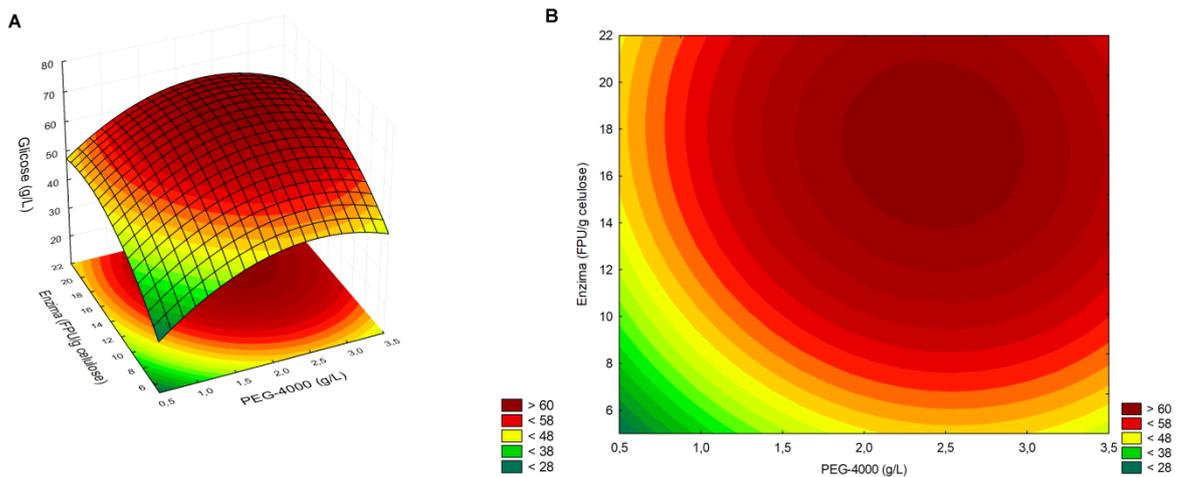


Figura 17 Superfície de resposta (A) e curvas de contorno (B) para concentração de glicose obtida a partir da hidrólise enzimática da casca de arroz em função das concentrações de Polietilenoglicol 4000 e enzima.

5.4 Parte III - Efeito da adição de surfactante no processo de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) da celulose de casca de arroz

5.4.1 Variação nas concentrações de açúcares e produção de etanol

A partir dos resultados obtidos na hidrólise enzimática da celulose da casca de arroz, foram selecionados os surfactantes PS80 (condição E3 = 10,0 mg/L surfactante e 19 FPU/g_{celulose}) e PEG (condição E4 = 3,0 g/L surfactante e 19 FPU/g_{celulose}), que

apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$), conforme discutido no item 5.3, para avaliar o efeito da adição de surfactante, durante a SSF por *K. marxianus* ATCC 86907.

Na Figura 18A-C, são apresentados os perfis de concentração (g/L) de glicose, celobiose e etanol, obtidos durante o processo de fermentação com adição dos surfactantes PS80 e PEG e o experimento sem surfactante (controle).

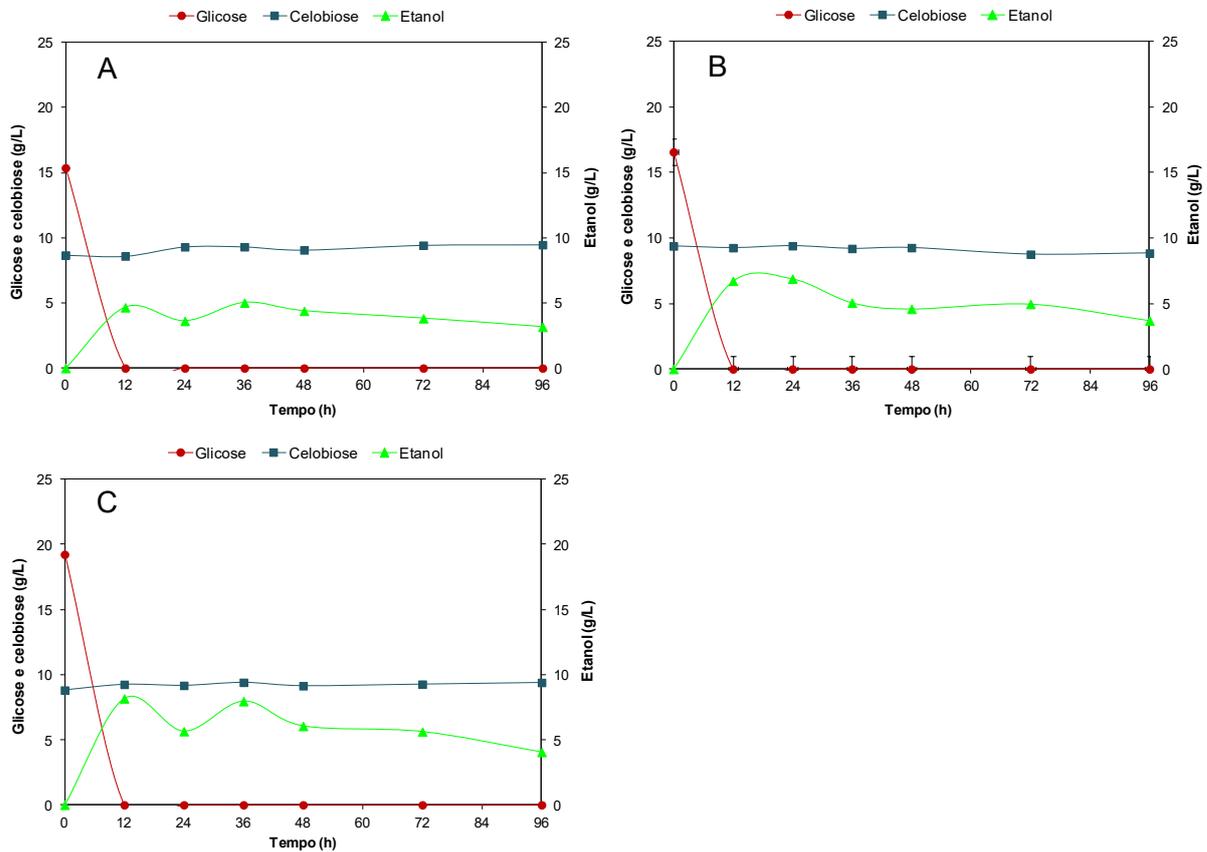


Figura 18 Concentração de açúcares e produção de etanol por *K. marxianus* ATCC 36907 durante a SSF com e sem a adição de surfactantes: (A) Controle sem surfactante; (B) Polisorbato 80 – PS80 (10 mg/L) e (C) Polietilenoglicol 4000 – PEG (3,0 g/L). Nota: Controle (sem surfactante), PS80 e PEG = 19 FPU/g de celulose.

Como é possível observar, as concentrações iniciais de glicose foram 15,37; 16,57 e 19,23 g/L para os experimentos controle (sem surfactante), com adição de PS80 e PEG, respectivamente, após 6 horas de pré-sacarificação (tempo 0), momento em que a levedura foi inoculada. Após 12 horas, esse açúcar foi totalmente consumido pelo micro-organismo nos três experimentos. Quanto à celobiose, as concentrações variaram entre 8,68 e 9,47 g/L, no experimento controle, entre 8,76 e 9,41 g/L, para o experimento com adição de PS80, e entre 9,14 e 9,40 g/L, com adição de PEG, permanecendo constantes ao longo da SSF. É importante destacar que a presença de celobiose, no início da fermentação, é devida à pré-sacarificação, como já mencionado no tópico 5.2.2, realizada com o objetivo de evitar um possível estresse metabólico ao micro-organismo, pela falta de substrato.

A maior concentração de etanol (8,17 g/L) foi obtida no experimento com adição de PEG, seguido do experimento com adição de PS80, que foi 6,73 g/L, ambos em 12 horas de fermentação. Já no experimento controle, a máxima produção foi de 5,02 g/L, em 36 horas. Apesar da produção de etanol ser ligeiramente superior ao controle (sem surfactante), esses resultados sugerem que os surfactantes PS80 e PEG, nas concentrações avaliadas, não são tão efetivos na SSF como na hidrólise enzimática. Resultados semelhantes foram obtidos por Tu et al. (2009), que apresentaram uma concentração máxima de 5,28 g/L de etanol (em 12 horas), adicionando 0,2% de Tween 80, durante a SSF de madeira de pinheiro (pré-tratado por explosão a vapor), por *S. cerevisiae* (4 g/L; 20 FPU de Celluclast 1,5 L + 40 IU de β -glicosidase; 30 °C e 150 rpm). Ballesteros et al. (1998) também não observaram efeitos benéficos da adição de surfactante (Tween 80), durante a SSF de biomassa de álamo, com a levedura *K. marxianus* EMS 26, como ocorreu durante o processo de hidrólise enzimática.

Em relação ao PEG, Gomes et al. (2018) realizaram uma pré-sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar (com 26 FPU/ de enzima por g de substrato), por 12 horas, com adição de 5% (m/m) de PEG-4000 e, após esse tempo, inoculou o micro-organismo (*S. cerevisiae*) no processo de pré-sacarificação simultânea à fermentação (PSSF), com alta carga de sólidos (27% m/m), resultando em 62 g/L de etanol em 48 horas. Kadhum et al. (2019) utilizaram PEG-6000 (1,5%) durante a SSF de palha de trigo (30% m/v), com 2,0 g/L de *S. cerevisiae* e complexo enzimático Celic CTec2, resultando numa produção máxima de 102,0 g/L de etanol em 60 horas, o que é significativamente superior ao controle (sem surfactante), que produziu 95,3 g/L de etanol. McIntosh et al. (2017), empregando *S. cerevisiae* e o mesmo surfactante (PEG-6000), obtiveram não apenas o aumento da produção de etanol (60 g/L com 3% (m/v) de PEG), a partir da SSF de biomassa de eucalipto (20% (m/v)), mas também uma redução de 30% na carga enzimática (de 60 para 40 FPU/g de glicana).

Nota-se que houve um decréscimo nas concentrações de etanol, a partir de 48 horas, até o final da fermentação, nos três experimentos, sendo mais pronunciado no experimento com PEG; isso pode ser devido ao consumo pela levedura como fonte alternativa de carbono, visto que a glicose se esgotou em 12 horas e, provavelmente, não foi liberada em quantidade suficiente para as necessidades da levedura durante a SSF. Comportamento semelhante, com a mesma linhagem ATCC 36907, foi observado por Tavares et al. (2019) e por Silva et al. (2014).

A Tabela 11 apresenta os resultados para o número de células, valores de pH e parâmetros fermentativos, obtidos no processo de SSF, com e sem adição de surfactantes, pela levedura *K. marxianus* ATCC 36907.

Tabela 11 Número de células, pH e parâmetros obtidos no processo de SSF conduzido a 40 °C, 200 rpm e 10% sólidos (m/v) por *K. marxianus* ATCC 36907, com e sem adição de surfactante

Experimentos	Nº de células (10 ⁸ /mL)	pH	Etanol (g/L)	Y _{ETC} (g/g)	Q _P (g/L.h ⁻¹)	η (%)	Tempo (h)
	96 h						
Controle	5,78 ± 1,02	5,37 ± 0,03	4,66 ± 0,07	0,12 ± 0,01	0,39 ± 0,01	11,75 ± 0,01	12
			3,61 ± 0,02	0,09 ± 0,00	0,15 ± 0,00	9,11 ± 0,02	24
			5,02 ± 0,46	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	12,66 ± 0,01	36
PS80	6,73 ± 0,72	5,28 ± 0,03	6,73 ± 0,06	0,17 ± 0,01	0,56 ± 0,00	16,96 ± 0,01	12
			6,90 ± 0,59	0,17 ± 0,59	0,29 ± 0,59	17,39 ± 0,59	24
			5,06 ± 0,28	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	12,77 ± 0,01	36
PEG	7,83 ± 0,79	5,27 ± 0,04	8,17 ± 0,74	0,21 ± 0,02	0,68 ± 0,06	20,59 ± 0,01	12
			5,65 ± 0,62	0,14 ± 0,02	0,24 ± 0,03	14,25 ± 0,02	24
			7,96 ± 0,37	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,01	20,06 ± 0,01	36

Nota: Controle = sem surfactante; PS80 = Polisorbato 80 (10 mg/L) e PEG = Polietilenoglicol 4000 (3,0 g/L). Controle, PS80 e PEG = 19 FPU/g de celulose. η (%) = rendimento de celulose em etanol. Valores médios de triplicatas ± desvio padrão das amostras.

O crescimento celular foi maior no experimento com PEG (7,83 x 10⁸/mL), seguido dos experimentos com PS80 (6,73 x 10⁸/mL) e o controle (5,78 x 10⁸/mL), indicando que a adição de surfactantes na SSF não prejudicou o crescimento da levedura. Esses resultados são consistentes com os obtidos por Wu e Ju (1998), no qual a adição do surfactante Tween 80 (2% m/v) não inibiu o crescimento das leveduras *Dekkera clausenii* e *S. cerevisiae*. Quanto ao pH, os valores mantiveram-se sem variações expressivas, considerando o pH inicial 5,5, devido à utilização do meio tamponado.

Em relação aos parâmetros fermentativos, a adição de surfactante proporcionou maiores rendimentos de etanol (Y_{ETC}) e (η%), em comparação ao controle, com valores 0,21; 0,17; 0,12 g/g e 20,59; 16,96 e 11,75%, com adição de PEG, PS80 e controle, em 12 horas de fermentação, respectivamente. Porém, o ensaio controle apresentou maior produção de etanol (5,02 g/L) em 36 horas, o que representa um Y_{ETC} de 0,13 g/g e η(%) de 12,66%, sugerindo que os dois surfactantes contribuíram para a redução no tempo para atingir a produção máxima de etanol, sendo mais evidente com a adição de PEG. Esse efeito foi observado com a adição de 2,5 g/L de Tween 20 na SSF de madeira macia com 5% de sólidos, além disso, resultou no rendimento máximo de etanol com 50% menos enzima (ALKASRAWI et al., 2003). O desempenho, obtido no presente estudo, está abaixo do apresentado por Mesquita; Ferraz e Aguiar (2016), que observaram um aumento no rendimento de etanol de 25 para 39,5% durante sacarificação semissimultânea à fermentação de bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado com 4% de sulfito de sódio + 2% NaOH), adicionando 2,5 g/L de Tween 20, comparado à amostra sem o surfactante. A adição de 0,2% de Tween 80, na SSF de madeira de pinheiro (pré-tratado por explosão a vapor), aumentou o rendimento de etanol de 0,08 para 0,13 g/L, em 12 horas de

fermentação com *S. cerevisiae* (TU et al., 2009). McIntosh et al. (2017) obtiveram 95,7% de rendimento de etanol, adicionando 3% (m/v) de PEG-6000, na SSF de biomassa de eucalipto, em 96 horas de fermentação, com 20% (m/v) de sólidos, enquanto que, sem a adição de surfactante, nas mesmas condições, o rendimento foi de 78%.

Em relação à produtividade volumétrica de etanol (Q_P), os experimentos com PEG e PS80 apresentaram 0,68 e 0,56 g/L.h⁻¹, respectivamente, em 12 horas, enquanto o controle alcançou um valor de 0,39 g/L.h⁻¹. Esses valores mais elevados de Q_P são devidos a uma produção de etanol relativamente alta, já nas primeiras 12 horas de SSF. A adição de 2,5 g/L de Tween 20 resultou em uma produtividade de 1,6 g/L.h⁻¹ em 48 horas, enquanto, sem o surfactante, o valor foi de 1,4 g/L.h⁻¹ em 72 horas (ALKASRAWI et al., 2003). A produtividade de etanol também foi fortemente favorecida com 5% (m/m) de PEG-4000, com valor de 6,6 g/L.h⁻¹, após 48 horas de SSF, com alta carga de sólidos (27% (m/v)) (GOMES et al., (2018).

De forma geral, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o baixo rendimento fermentativo não está relacionado à presença dos surfactantes no meio. É possível que outros fatores, como concentração inicial de células (tamanho do inóculo) e condições de cultivo, tenham contribuído para essa resposta.

O tamanho do inóculo tem efeito na produção de etanol (TURHAN et al., 2010), como mostra Wanderley, Soares e Gouveia (2014), em que a produção de etanol foi de 11,33 para 37,16 g/L, o rendimento de 0,28 para 0,43 g/g e a produtividade de 1,04 para 3,10 g/L.h⁻¹, com concentrações iniciais de inóculo de 0,4 e 8,0 g/L, respectivamente; Tahir et al. (2010) verificaram aumentos gradativos na produção de etanol, com tamanho de inóculo variando de 1 a 5% (v/v), sendo que, em ambos os trabalhos, a levedura utilizada foi a *S. cerevisiae*. Isso porque existe uma relação entre crescimento celular e produção de etanol, parâmetros que podem ser afetados pelas condições de cultivo empregadas, sendo importante a otimização de condições que favoreçam o crescimento da levedura, como temperatura, agitação e aeração (ROCHA et al., 2011).

5.4.2 Formação de ácido acético e glicerol

A formação de subprodutos, ácido acético e glicerol por *K. marxianus* ATCC 36907 também foi monitorada durante a SSF com e sem a adição dos surfactantes PS80 e PEG; os resultados obtidos são apresentados na Figura 19. É possível observar que houve produção tanto de ácido acético como de glicerol, a partir de 12 horas, nos três experimentos.

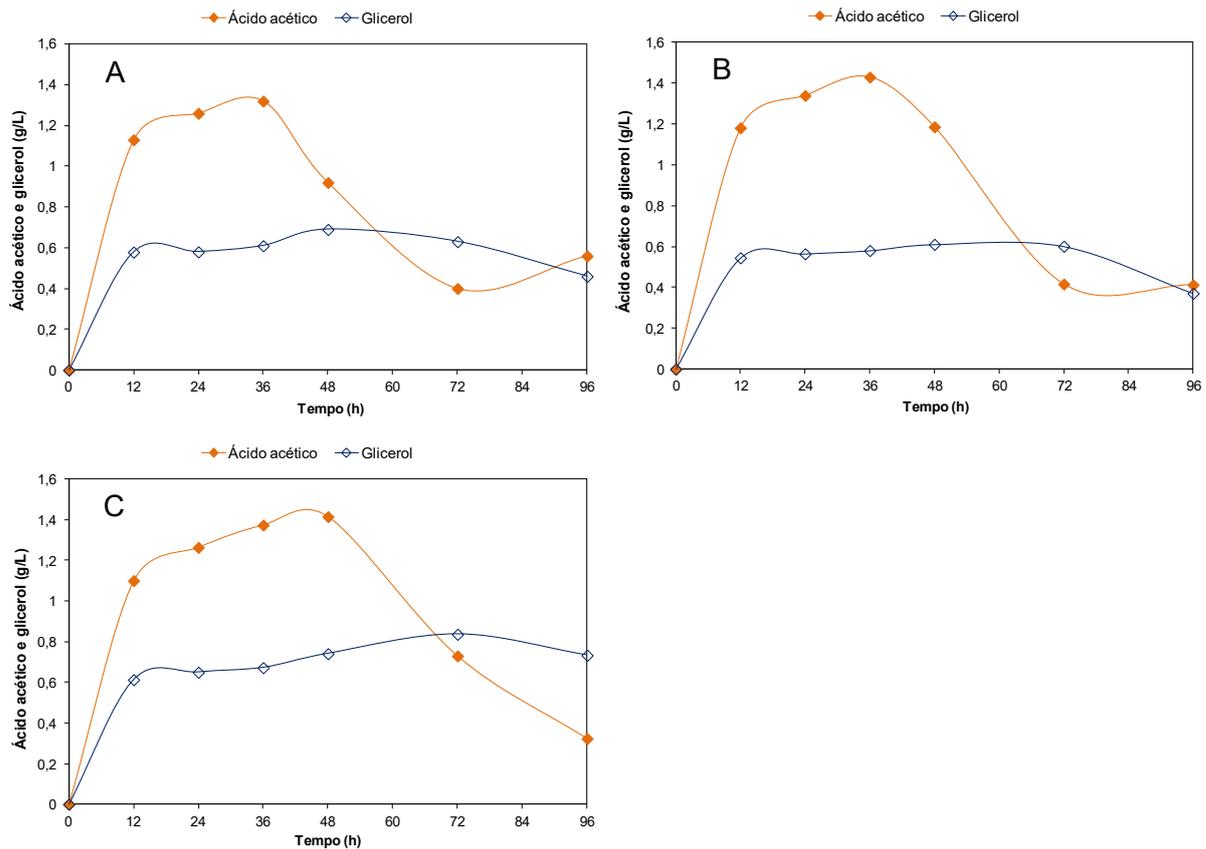


Figura 19 Formação de ácido acético e glicerol por *K. marxianus* ATCC 36907 durante a SSF com e sem a adição de surfactantes: (A) Controle sem surfactante; (B) Polisorbato 80 – PS80 (10,0 mg/L) e (C) Polietilenoglicol 4000 – PEG (3,0 g/L). Nota: Controle (sem surfactante), PS80 e PEG = 19 FPU/g_{celulose}.

A produção de ácido acético variou de 0,4 a 1,32 g/L, no experimento controle, de 0,41 a 1,43 g/L, no experimento com adição de PS80, e 0,32 a 1,42 g/L, com adição de PEG. Os maiores valores foram observados em 36 horas (1,32 e 1,43 g/L), nos experimentos controle e com PS80, respectivamente, enquanto que, no experimento com PEG, a produção máxima (1,42 g/L) ocorreu em 48 horas. A presença de surfactantes na SSF não influenciou a formação de ácido acético em comparação ao controle. Observa-se uma redução nas concentrações desse ácido nos três experimentos, sendo que, no controle e com adição de PS80, ocorreu a partir de 48 horas e, no experimento com PEG, a redução ocorreu a partir de 72 horas de fermentação, sugerindo que a levedura possivelmente utilizou o ácido acético como fonte de carbono.

Em relação ao glicerol, as concentrações variaram de 0,46 a 0,69 g/L, 0,37 a 0,61 g/L e 0,61 a 0,84 g/L, para os experimentos controle, com PS80 e com adição de PEG, respectivamente, sendo o maior valor (0,84 g/L) obtido no experimento com PEG, em 72 horas. Já nos experimentos controle e com PS80, as maiores concentrações (0,69 e 0,61 g/L) foram observadas em 48 horas, respectivamente. Camargo, Gomes e Sene (2014) relataram a formação de até 2,62 g/L de glicerol pela mesma levedura, *K. marxianus* ATCC 36907, na SSF de farelo de girassol.

Não foram encontrados, na literatura, relatos sobre a influência do uso de surfactantes na formação de ácido acético e glicerol. Porém, normalmente, esses subprodutos são formados em resposta a diferentes situações de estresse, como presença de etanol, temperaturas elevadas (FU et al., 2019) e condições limitantes de oxigênio, a fim de restabelecer o equilíbrio redox da célula (MÉRICO et al., 2009).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que:

- A casca de arroz é uma matéria-prima que pode ser utilizada em bioprocessos, como na produção de etanol, por apresentar teores de celulose e hemicelulose semelhante ao de outras biomassas lignocelulósicas;
- O tratamento com NaOH 8% (m/v) da casca de arroz resultou em elevado teor de celulose;
- A sacarificação da celulose da casca de arroz (tratada), com adição de carga enzimática de 22 FPU/g_{celulose}, promoveu maior liberação de açúcares redutores;
- As diferentes estratégias de alimentação, com alta carga de sólidos (fração celulósica da casca de arroz), empregadas na SSF, em batelada alimentada, não promoveram aumentos substanciais à produção de etanol. Porém, a adição inicial de 15% (m/v) resultou em maior concentração de etanol, em relação ao processo, com carga inicial de 10% (m/v). Além disso, a presença de altas cargas de sólidos resultou em elevado acúmulo de ácido acético, o que pode ter contribuído para a menor produção de etanol.
- A adição de surfactantes à hidrólise enzimática favoreceu o desempenho da enzima ao longo de todo o processo, em comparação ao controle. Os surfactantes Polisorbato 80 e Polietilenoglicol-4000, em associação a diferentes cargas enzimáticas, influenciaram significativamente a concentração final de glicose, visto que, sem a adição de surfactante, a carga enzimática para obtenção da máxima concentração de glicose foi de 22 FPU/g_{celulose} e, com surfactante, resultados superiores foram obtidos, com 19 FPU/g_{celulose} e 10 mg/L de Polisorbato 80 e 19 FPU/g_{celulose} e 3,0 g/L de Polietilenoglicol-4000. O surfactante Polietilenoglicol-4000 demonstrou melhor desempenho na hidrólise enzimática;
- O uso dos surfactantes Polisorbato 80 e Polietilenoglicol-4000, na SSF, favoreceu a produção de etanol, em comparação ao controle, porém, os rendimentos não foram satisfatórios. O Polietilenoglicol-4000 mostrou melhor resultado tanto para o crescimento da levedura *K. marxianus* quanto para a produção de etanol.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, ficou constatado o potencial da casca de arroz como matéria-prima para utilização em bioprocessos, pelo conteúdo das frações de celulose e hemicelulose, semelhantes aos teores apresentados por outras biomassas lignocelulósicas, comumente estudadas.

A adição de surfactantes à hidrólise enzimática favoreceu a conversão da celulose em glicose, proporcionando elevadas concentrações dessa hexose; no entanto, seria interessante, a partir das condições que mais favoreceram o processo, avaliar o efeito de diferentes temperaturas e agitação.

Embora a levedura *K. marxianus* ATCC 36907 tenha sido capaz de produzir etanol, a partir da fração celulósica da casca de arroz, tanto por meio da SSF em batelada alimentada, com alta carga de sólidos, como na SSF, com adição de surfactantes, os rendimentos não foram satisfatórios. Em ambos os processos, verifica-se a necessidade da otimização das condições de cultivo da levedura, como temperatura, agitação e aeração, de forma que favoreça o crescimento do micro-organismo e, conseqüentemente, a produção de etanol.

8 REFERÊNCIAS

ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residue – wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 99, p. 1664-1671, 2008.

ALKASRAWI, M.; ERIKSSON, T.; BÖJERSSON, J.; WINGREN, A.; GALBE, M.; TJERNED, F.; ZACCHI, G. The effect of Tween 20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, Holanda, v. 33, p. 71-78, 2003.

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**, Holanda, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ARAÚJO, C. K. C.; CAMPS, A. O.; PADILHA, C. E. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E.S. Enhancing enzymatic hydrolysis of coconut husk through *Pseudomonas aeruginosa* AP029/GLVIA rhamnolipid preparation. **Bioresource Technology**, Holanda, v.237, p. 20-26, 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington, 1995.

AUESUKAREE, C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Holanda, v. 124, p. 133-142, 2017.

AZHARA, S. H. M.; ABDULLAA, R.; JAMBOA, S. A.; MARBAWIA, H.; GANSAUA, J. A.; FAIKA, A. A. M.; RODRIGUES, K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: a review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, Holanda, v. 10, p. 52-61, 2017.

BAJPAI, P. Structure of lignocellulosic biomass. **Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production**. Singapore: Springer. 2016. p. 07-12.

BAKAR, R. A.; YAHYA, R.; GAN, S. N. Production of high purity amorphous silica from rice husk. **Procedia Chemistry**, Holanda, v. 19, p. 189-195, 2016.

BALLESTEROS, I.; OLIVA, J. M.; CARRASCO, A.; CABAÑAS, A.; NAVARRO, A. A.; BALLESTEROS, M. Effect of surfactants and zeolites on simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded poplar biomass to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 70, p. 369-381, 1998.

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

BANERJEE, S.; MUDLIAR, S.; SEN, R.; GIRI, B.; SATPUTE, D.; CHAKRABARTI, T.; PANDEY, R.A. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Reino Unido, v. 4, p. 77-93, 2010.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, V. L.; COLODETTE, J. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI-CG/EM). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 2035-2041, 2008.

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**, Holanda, v. 307, p. 939-947, 2017.

BAZARGAN, A.; BAZARGAN, M.; MCKAY, G. Optimization of rice husk pretreatment for energy production. **Renewable Energy**, Reino Unido, v. 77, p. 512-520, 2015.

BECKER, J.; WITTMANN, C. A field of dreams: Lignin valorization into chemicals, materials, fuels, and health-care products. **Biotechnology Advances**, Holanda, v. 37, p. 107-360, 2019.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Holanda, v. 36, p. 91-106, 2014.

BINOD, P.; JANU, K. U.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Hidrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production. *In*: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, S. C.; DUSSAP, C-G.; GNANSOUNOU, E. **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes**. Oxford: Elsevier Inc. 2011. p. 229-250.

BISWAS, B.; PANDEY, N.; BISHT, Y.; SINGH, R.; KUMAR, J.; BHASKAR, T. Pyrolysis of agricultural biomass residues: comparative study of corncob, wheat straw, rice straw and rice husk. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 237, p. 5-63, 2017.

BRASIL. Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco Energético Nacional 2019 – Ano Base 2018: Relatório Síntese**, Rio de Janeiro: EPE, 2019.

CABRERA, E.; MUÑOZ, M. J.; MARTÍN, R.; CARO, I.; CURBELO, C.; DÍAZ, A. B. Alkaline and alkaline peroxide pretreatments at mild temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice hulls and straw. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 167, p. 1-7, 2014.

CAMARGO D.; SENE L.; VARIZ D. I.; FELIPE, M. G. A. Xylitol bioproduction in hemicellulosic hydrolysate obtained from sorghum forage biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 175, p. 3628-3642, 2015.

CAMARGO, D.; GOMES, S. D.; SENE, L. Ethanol production from sunflower meal biomass by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Alemanha, v. 37, p. 2235-2242, 2014.

CAMARGO, D.; SENE, L. Production of ethanol from the hemicellulosic fraction of sunflower meal biomass. **Biomass Conversion and Biorefinery**, Alemanha, v. 4, p. 87-93, 2014.

CAMARGO, D.; SYDNEY, E. B.; LEONEL, L. V.; PINTRO, T. C.; SENE, L. Dilute acid hydrolysis of sweet sorghum bagasse and fermentability of the hemicellulosic hydrolysate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 36, p. 143-156, 2019.

CANELLA, D.; JØRGENSEN, H. Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production?. **Biotechnology and Bioengineering**, Alemanha, v. 11, p. 59-68, 2014.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Maryland, v. 2012, p. 01-15, 2012.

CASTRO, R. C. A.; ROBERTO, I. C. Selection of a Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* Strain with Potential Application for Cellulosic Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 172, p. 1553-1564, 2014.

CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A. F.; TERÁN-HILARES, R.; COTA, J.; ELLILÄ, S.; SILVEIRA, M. H. L.; SANTOS, J. C. SILVA, S. S. Bioconversion of hemicellulose into ethanol and value-added products: commercialization, trends, and future opportunities. *In: Advances in Sugarcane Biorefinery Technologies, Commercialization, Policy Issues and Paradigm Shift for Bioethanol and By-Products*, Elsevier, p. 97-134, 2018.

CHAROENSOPHARAT, K.; THANONKEO, P.; THANONKEO, S.; YAMADA, M. Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers at high temperature by newly isolated thermotolerant inulin-utilizing yeast *Kluyveromyces marxianus* using consolidated bioprocessing. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Holanda, v. 108, p. 173-90, 2015.

CHOUDHARY, J.; SINGH, S.; NAIN, L. Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. **Electronic Journal of Biotechnology**, Holanda, v. 21, p. 82-92, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2018/19. Décimo primeiro levantamento, Brasília, DF, n. 11, v. 6, p. 1-104, 2019. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2019.pdf>. Acesso em: 15 set. 2019.

COTANA, F.; CAVALAGLIO, G.; GELOSIA, M.; COCCIA, V.; PETROZZI, A.; INGLÊS, D.; POMPILI, E. A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 69, p. 424-432, 2015.

CUNHA, F.M.; ESPERANÇA, M.N.; ZANGIROLAMI, C.; BADINO, A.C.; FARINAS, C.S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus Níger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 112, p. 270-274, 2012.

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. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 42, p. 363-368, 2013.

DASARI, R. K.; DUNAWAY, K.; BERSON, R. E. A scraped surface bioreactor for enzymatic saccharification of pretreated corn stover slurries. **Energy Fuels**, Estados Unidos, v. 23, p. 492-497, 2009.

DELLA, V. P.; KÜHN, I.; HOTZA, D. Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 778-782, 2001.

DIAS, J. M. C. S.; SOUZA, D. T. S.; BRAGA, M.; ONOYAMA, M. M.; MIRANDA, C. H. B.; BARBOSA, P. F. D.; ROCHA, J. D. **Produção de briquetes e peletes a partir de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais**. Documentos n. 13. Brasília. Embrapa – Agroenergia, 2012.

DINIZ, R. H. S.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; FIETTO, L. G.; PASSOS, F. M. L.; SILVEIRA, W. B. Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Holanda, v. 3, p. 111-117, 2014.

DONOHUE, B. S.; DECKER, S. R.; TUCKER, M. P.; HIMMEL, M. E.; VINZANT, T. B. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 101, p. 913-25, 2008.

DOWE, N.; MCMILLAN, J. **SSF experimental protocols: lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation**. Report No NREL/TP-510-42630. ed. Colorado: National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2008.

DUANGWANG, S.; RUENGPEERAKUL, T.; CHEIRSILP, B.; YAMSAENGSUNG, R.; SANGWICHIAN, C. Pilot-scale steam explosion for xylose production from oil palm empty fruit bunches and the use of xylose for ethanol production. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 203, p. 252-258, 2016.

EBRAHIMI, M.; CAPARANGA, A. R.; ORDONO, E. E.; VILLAFLORES, O. B.; POURIMAN, M. Effect of ammonium carbonate pretreatment on the enzymatic digestibility, structural characteristics of rice husk and bioethanol production via simultaneous saccharification and

fermentation process with *Saccharomyces cerevisiae* Hansen 2055. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 101, p. 84-91, 2017.

ECKARD, A. D.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; GIBBONS, W. Modeling of Pretreatment Condition of Extrusion-Pretreated Prairie Cordgrass and Corn Stover with Poly (Oxyethylen)20 Sorbitan Monolaurate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 167, p. 377-393, 2012.

ELICHE-QUESADA, D.; FELIPE-SESÉ, M. A.; LÓPEZ-PÉREZ, J. A.; INFANTES-MOLINA, A. Characterization na evaluation of Rice husk ash and Wood ash in sustainable Clay matrix bricks. **Ceramics International**, Faenza, v. 43, p. 463-475, 2017.

FOLETTTO, E. L.; HOFFMANN, R; HOFFMANN, R. S.; PORTUGAL JR, U. L.; JAHN, S. L. Aplicabilidade das cinzas da casca de arroz. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 1055-1060, 2005.

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

FREDDLUND, E.; BLANK, L. M.; SCHREÏRER J.; SAUER, U.; PASSOTH, V. Oxygen and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v. 9, p. 5905-5911, 2004.

FU, X.; LI, P.; ZHANG, L.; LI, S. Understanding the stress responses of *Kluyveromyces marxianus* after an arrest during high-temperature ethanol fermentation based on integration of RNA-Seq and metabolite data. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Alemanha, v. 103, p. 2715-1729, 2019.

GABARDO, S.; PEREIRA, G. F.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. The modeling of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* using whey as substrate in continuous A-Stat bioreactors. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 42, p. 1243-1253, 2015.

GAO, Y.; XU, J.; YUAN, Z.; JIANG, J.; ZHANG, Z.; LI, C. Ethanol production from sugar cane bagasse by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation at high solids loading. **Energy Science and Engineering**, Reino Unido, v. 6, p. 810-818, 2018.

GAO, Y.; XU, J.; YUAN,, Z.; JIANG, J.; ZHANG, Z.; LI, C. Ethanol production from sugarcane bagasse by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation at high solids loading. **Energy Science and Engineering**, Reino Unido, v. 6, p. 810-818, 2018.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, North Carolina, v. 59, p. 257-268, 1987.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GOMES, A. C.; MOYSÉS, D. N.; SANTA ANNA, L. M. M.; CASTRO, A. M. Fed-batch strategies for saccharification of pilot-scale mild-acid and alkali pretreated sugarcane bagasse: effects of solid loading and surfactant addition. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 119, p. 283-289, 2018.

GREWAL, J. ; KHARE, S.K. One-pot bioprocess for lactic acid production from lignocellulosic agro-wastes by using ionic liquid stable *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 251, p. 268-273, 2018.

GUAN, W.; XU, G.; DUAN, J.; SHI, SUAN. Acetone-butanol-ethanol (ABE) production from fermentation of hot-water extracted hemicellulose hydrolysate of pulping woods. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 57, p. 775-783, 2018.

GUILHERME, A. A.; DANTAS, P. V. F.; PADILHA, C. E. A.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. Ethanol production from sugarcane bagasse: Use of different fermentation strategies to enhance an environmental-friendly process. **Journal of Environmental Management**, Estados Unidos, v. 234, p. 44-51, 2019.

HANLY, T. J.; HENSON, M. A. Dynamic model-based analysis of furfural and HMF detoxification by pure and mixed batch cultures of *S. cerevisiae* and *S. stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, Alemanha, v. 111, p. 272-284, 2014.

HELLE, S. S.; DUFF, S. J. B.; COOPER, D. G. Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 42, p. 611-617, 1993.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F.; COSTA, I. A. L.; SILVA, D. D. V.; DUSSÁN, K. J.; VILLELA, T. R.; CANETTIERI, E. V.; CARVALHO JUNIOR, J. A.; SOARES NETO, T. G.; FELIPE, M. G. A. Biochemical conversion of sugarcane straw hemicellulosic hydrolyzate supplemented with co-substrates for xylitol production. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 200, p. 1085-1088, 2016.

HICKERT, L. R.; CUNHA-PEREIRA, F.; SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 131, p. 508-514, 2013.

HOSSAIN, T.; SARKER, S.K.; BASAK, B.C. Utilization potential of rice husk ash as a construction material in rural areas. **International Journal of Civil Engineering**, Suíça, v. 39, p. 175-88, 2011.

HSIEH, C-W.C.; CANELLA, D.; JØRGENSEN, H.; FELBY, C.; THYGESSEN, L. G. Cellobiohydrolase and endoglucanase respond differently to surfactants during the hydrolysis of cellulose. **Biotechnology for Fuels**, Reino Unido, v. 8, p. 1-10, 2015.

JAIN, S. C.; JAIN, P.C.; KANGO, N. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using dahlia tuber extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, p. 62-69, 2012.

JI, L.; ZHENG, T.; ZHAO, P.; ZHANG, W.; JIANG, J. Ethanol production from a biomass mixture of furfural residues with green liquor-peroxide saccharified cassava liquid. **BMC Biotechnology**, Reino Unido, v. 16, p. 1-11, 2016.

JOHAR, N.; AHMAD, I.; DUFRESNE, A. Extraction preparation ad characterization of cellulose fibers and nanocrystals from rice husk. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 37, p. 93-99, 2012.

JUNCHEN, L.; IRFAN, M.; LIN, F. Bioconversion of agricultural waste to ethanol: A potential source of energy. **Archives Des Sciences**, Genova, v. 65, p.1661-1677, 2012.

JUNGA, D. S.; RYOUA, M-H.; SUNG, Y. J.; PARK, S. B.; CHOI, J. W. Recycling rice husks for high-capacity lithium battery anodes. **PNAS**, Pensilvânia, v. 23, p. 12229-12234, 2013.

KADHUM, H. J.; MAHAPATRA, D. M.; MURTHY, G. S. A comparative account of glucose yields and bioethanol production from separate and simultaneous saccharification and fermentation processes at high solids loading with variable PEG concentration. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 283, p. 67-65, 2019.

KANCHANALAI, P.; TEMANI, G.; KAWAJIRI, Y.; REALFF, M. J. Reaction kinetics of concentrated-acid hydrolysis for cellulose and hemicellulose and effect of crystallinity. **BioResources**, Estados Unidos, v. 11, p. 1672-1689, 2016.

KIERS, J.; ZEEMAN, A-M.; LUTTIK, M.; THIELE, C.; CASTRILLO, J. I.; STEENSMA, H. Y.; VA DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS2359. **Yeast**, Estados Unidos, v. 14, p. 459-469, 1998.

KIM, M. H.; LEE, S. B.; RYU, D. D. Y. Surface deactivation of cellulose and its prevention. **Enzyme Microbial Technology**, Amsterdam, v. 4, p. 99-103, 1982.

KIM, S.; PARK, J. M.; KIM, C. H. Ethanol production using whole plant biomass of Jerusalem Artichoke by *Kluyveromyces marxianus* CBS 1555. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 169, p. 1531-1545, 2013.

KIM, T. H. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Yang, S.T., El-Enshasy, H.A., Thongchul, N., Martin, Y. (Eds.), **Bioprocessing Technologies in Integrated Biorefinery for Production of Biofuels, Biochemicals, and Biopolymers from Biomass**, Wiley, New York, p. 91-109, 2013.

KOHLSTEDT, M.; STARCK, S.; BARTON, N.; STOLZENBERGER, J.; SELZER, M.; MEHLMANN, K.; SCHNEIDER, R.; PLEISSNER, D.; RINKEL, J.; DICKSCHAT, J. S.; VENUS, J.; VAN DUUREN, J. N. J. H.; WITTMANN, C. From lignin to nylon: Cascaded

chemical and biochemical conversion using metabolically engineered *Pseudomonas putida*. **Metabolic Engineering**, Estados Unidos, v. 47, p. 279-293, 2018.

KOINOV, A.; TRYGGVASON, G.; KHINAST, J. G. Characterization of the localized dissolved oxygen distribution in sparged bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, Alemanha, v. 97, p. 317-331, 2007.

KOPPRAM, R.; OLSSON, L. Combined substrate, enzyme and yeast feed in simultaneous saccharification and fermentation allow bioethanol production from pretreated spruce biomass at high solids loadings. **Biotechnology for Biofuels**, Londres, v. 7, p. 01-09, 2014.

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

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

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Determining Yields in High Solids Enzymatic Hydrolysis of Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 156, p. 557-562, 2009.

KUCERA, D.; BENESOVA, P.; LADICKY, P.; PEKAR, M.; SEDLACEK, P.; OBRUCA, S. Production of Polyhydroxyalkanoates Using Hydrolyzates of Spruce Sawdust: Comparison of Hydrolyzates Detoxification by Application of Overliming, Active Carbon, and Lignite. **Bioengineering**, Suíça, v. 53, p. 1-9, 2017.

KUMAR, A.; DUTT, D.; GAUTAM, A. Pretreatment and enzymatic hydrolysis of pearl millet stover by multi-enzymes from *Aspergillus nidulans* AKB-25. **Cellulose Chemistry and Technology**, Washington, v. 50, p. 781-790, 2016.

LAMB, C. C.; SILVA, B. M. Z.; SOUZA, D.; FORNASIERS, F. RIÇA, L. B.; SCHNEIDER, R. C. S. Bioethanol production from rice hull and evaluation of the final solid residue. **Chemical Engineering Communications**, Reino Unido, v. 205, p. 833-845, 2018.

LANE, M. M.; BURKE, N.; KARREMAN, R.; WOLFE, K.H.; O'BYRNE C.P.; MORRISSEY J.P. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Holanda, v.100, p. 507-519, 2011.

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

LI, J.; LI, S.; FAN, C.; YAN, Z. The mechanism of poly(ethylene glycol) 4000 effect on enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Holanda, v. 89, p. 203-210, 2012.

LI, X.; WEI, Y.; XU, J.; XU, N.; HE, Y. Quantitative visualization of lignocelluloses components in transverse sections of moso bamboo based on FTIR macro-and-micro spectroscopy coupled with chemometrics. **Biotechnology for Biofuels**, Reino Unido, v. 11, p. 1-16, 2018.

LI, Y.; SADIQ, F. A.; LIU, T.; CHEN, J.; HE, G. Purification and identification of novel peptides with inhibitory effect against angiotensin I-converting enzyme and optimization of process conditions in milk fermented with the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Functional Foods**, Holanda, v. 16, p. 278-288, 2015.

LIU, J.; SHI, J.; YUAN, X. Characterization on the interaction between surfactants and enzymes by fluorescence probe. **Enzyme and Microbial Technology**, Holanda, v. 49, p. 360-365, 2011.

LIU, Y.; XU, J.; ZHANG, Y.; YUAN, Z.; XIE, J. Optimization of high solids fed-batch saccharification of sugarcanebagasse based on system viscosity changes. **Journal of Biotechnology**, Bielefeld, v. 211, p. 5-9, 2015.

LIU, Z-H.; QIN, L.; ZHU, J-Q.; LI, B-Z.; YUAN, Y. J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. **Biotechnology for Biofuels**, Reino Unido, v. 7, p.1-16, 2014.

LO, E.; BRABO-CATALA, L.; DOGARIS, I.; AMMAR, E. M.; PHILIPPIDIS, G. P. Biochemical conversion of sweet sorghum bagasse to succinic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Japão, v. 129, p. 104-109, 2020.

LU, Y.; WANG, Y.; XU, G.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; ZHANG, S. Influence of High Solid Concentration on Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Steam-Exploded Corn Stover Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 160, p. 360-369, 2010.

LUO, X.; LIU, J.; ZHENG, P.; LI, M.; ZHOU, Y.; HUANG, L.; CHEN, L.; SHUAI, L. Promoting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by inexpensive soy protein. **Biotechnology for Biofuels**, Reino Unido, v. 12, p. 1-13, 2019.

MANCINI, G.; PAPIRIO, S.; LENS, P. N.L.; ESPOSITO, G. Increased biogas production from wheat straw by chemical pretreatments. **Renewable Energy**, Reino Unido, v. 119, p. 608-614, 2018.

MARTÍNEZ, O.; SÁNCHEZ, A.; FONT, XAVIER.; BARRENA, R. Valorization of sugarcane bagasse and sugar beet molasses using *Kluyveromyces marxianus* for producing value-added aroma compounds via solid-state fermentation. **Journal of Cleaner Production**, Holanda, v. 158, p. 8-17, 2017.

MCINTOSH, S.; PALMER, J.; ZHANG, Z.; DOHERTY, W. O. S.; YAZDANI, S. S.; SUKUMARAN, R. K.; VANCOV, T. Simultaneous saccharification and fermentation of

pretreated *Eucalyptus grandis* under high solids loading. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 13, p. 131-140, 2017.

MERICO, A.; GALAFASSI, S.; PIŠKUR, J.; COMPAGNO, C. The oxygen level determines the fermentation pattern in *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Research**, Reino Unido, v. 9, p. 749-756, 2009.

MESQUITA, J. F.; FERRAZ, A.; AGUIAR, A. Alkaline-sulfite pretreatment and use of surfactants during enzymatic hydrolysis to enhance ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, Alemanha, v. 39, p. 441-448, mês, 2016.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MONTIPÓ, S.; BALLESTEROS, I.; FONTANA, R. C.; LIU, S.; BALLESTEROS, M.; MARTINS, A. F.; CAMASSOLA, M. Bioprocessing of rice husk into monosaccharides and the fermentative production of bioethanol and lactate. **Cellulose**, Holanda, v. 26, p. 7309-7322, 2019.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Holanda, v. 27, p. 77-93, 2013.

MORAES, E. J. C.; SILVA, D. D. V.; DUSSÁN, K. J.; TESCHE, L. Z.; SILVA, J. B. A.; RAI, M.; FELIPE, M.G.A. Xylitol-sweetener production from barley straw: optimization of acid hydrolysis condition with the energy consumption simulation. **Waste and Biomass Valorization**, Alemanha, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0501-9>. Acesso em: 23 set. 2019.

MORRISSEY, J. P.; ETSCHMANN, M. M. W.; SCHRADER, J.; BILLERBECK, G. M. Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. **Yeast**, Malden, v. 32, p. 3-16, 2015.

MURATA, Y.; DANJAREAN, H.,; FUJIMOTO, K.; KOSUGI, A.; ARAI, T.; IBRAHIM, W. A.; SULIMAN, O.; HASHIM, R.; MORI, Y. Ethanol fermentation by the thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* TISTR5925, of extracted sap from old oil palm trunk. **AIMS Energy**, Springfield, v. 3, 201-213, 2015.

MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G. M. Biomass Pretreatment, Biorefineries, and Potential Products for a Bioeconomy Development. *In*: **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock-based Biorefinery**, Elsevier, p. 1-22, 2016.

MYCROFTA, Z.; GOMISB, M.; MINESB, P.; LAWB, P.; BUGG, T. D. H. Biocatalytic conversion of lignin to aromatic dicarboxylic acids in *Rhodococcus jostii* RHA1 by re-routing aromatic degradation pathways. **Green Chemistry**, Londres, v. 17, p. 4974-4979, 2015.

NACHAIWIENG, W.; LUMYONG, S.; YOSHIOKA, K.; WATANABE, T.; KHANONGNUCH, C. Bioethanol production from rice husk under elevated temperature simultaneous saccharification and fermentation using *Kluyveromyces marxianus* CK8. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Taichung, v. 4, p. 543-549, 2015.

NAIYA, T. K.; BHATTACHARA, A. K.; MANDAL, S.; DAS, S.K. The sorption of lead (II) ions on rice husk ash. **Journal of Hazardous Materials**, Holanda, v.163, p. 1254-1264, 2009.

NAMBU-NISHIDA, Y.; NISHIDA, K.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Genetic and physiological basis for antibody production by *Kluyveromyces marxianus*. **AMB Express**, Alemanha, v. 8, p. 2-9, 2018.

NECHYPORCHUK, O.; BELGACEM, M. N.; BRAS, J. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 93 p. 2–25, 2016.

NIEMI, P.; PIHLAJANIEMI, V.; RINNE, M.; SIIKA-AHO, M. Production of sugars from grass silage after steam explosion or soaking in aqueous ammonia. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 98, p. 93-99, 2017.

NITIYON, S.; KEO-OU DONE, C.; MURATA, M.; LERTWATTANAKUL, N.; LIMTONG, S.; KOSAKA, T.; YAMADA, M. Efficient conversion of xylose to ethanol by stress-tolerant *Kluyveromyces marxianus* BUNL-21. **Springer Plus**, Alemanha, v. 5, p. 1-12, 2016.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 25, p. 772-776, 2002.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

ÖHGREN, K.; BENGTTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. **Journal of Biotechnology**, Bielefeld, v. 126, p. 488-498, 2006.

OKINO, S.; IKEO, M.; UENO, Y.; TANEDA, D. Effects of Tween 80 in cellulase stability under agitated conditions. **Bioresource Technology**, Holanda, v.142, p. 535-539, 2013.

OLADI, S.; AITA, G. M. Interactive effect of enzymes and surfactant on the cellulose digestibility of un-washed and washed dilute ammonia pretreated energy cane bagasse. **Biomass and Bioenergy**, Reino Unido, v. 109, p. 221-230, 2018.

OLIVEIRA, J. M.; MEI, L. H. I. Surfactantes Reativos Não-iônicos em Polimerização em Emulsão de Látices de Acetato de Vinila - Vinil Neodecanoato: Influência nas Propriedades de Barreira à Água. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 19, p. 22-30, 2009.

OLIVEIRA, L. R. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R.; ROCHA, G. J. M. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 58, p. 1-7, 2014.

PARK, B-D.; WI, S. G.; LEE, K. H.; SINGH, A. P.; YOON, T-H.; KIM, Y. S. Characterization of anatomical features and silica distribution in rice husk using microscopic and micro-analytical techniques. **Biomass and Bioenergy**, Reino Unido, v. 2, p. 319-327, 2003.

PARRONDO, J.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ, M. Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 26, p. 445-456, 2009.

PEREIRA, J.R. N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA L. M. M. Biomass of Lignocelulosic Composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. **Series on Biotechnology**. Rio de Janeiro: Escola de Química - UFRJ, 2008.

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

PIEMOLINI-BARRETO, L. T.; ANTÔNIO, R. V.; ECHEVERRIGARAY, S. Screening and Breeding of *Kluyveromyces* Strains for Production Pectinolytic Activity. **Advances in Biotechnology and Microbiology**, Califórnia, v. 3, p.1-5, 2017.

PINTRO, T. C. **Produção de bioetanol por *Kluyveromyces marxianus* a partir de subprodutos do beneficiamento de arroz**. 2019. 101 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2019.

PISKUR, J.; ROZPEDOWSKA, E.; POLAKOVA, S.; MERICO, A.; COMPAGNO, C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 22, n. 4, p. 183-186, 2006.

QING Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Impact of surfactants on pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 101, p. 5941-5951, 2010.

QIU, J.; MA, L.; SHEN, F.; YANG, G.; ZHANG, Y.; DING, S.; ZHANG, J.; ZENG, Y.; HEE, Y. Pretreating wheat straw by phosphoric acid plus hydrogen peroxide for enzymatic saccharification and ethanol production at high solid loading. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 238, p. 174-181, 2017.

QU, X-S.; HU, B-B.; ZHU, M-J. Enhanced saccharification of cellulose and sugarcane bagasse by *Clostridium thermocellum* cultures with Triton X-100 and β -glucosidase/Cellic®CTec2 supplementation. **RSC Advances**, Reino Unido, v. 7, p. 21360-21365, 2017.

RAJOKA, M. I.; KHAN, S.; SHARID, R. Kinetic and regulation studies of the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* grown on different substrates. **Food Technology and Biotechnology**, Croácia, v. 41, p. 315-320, 2003.

RASMUSSEN, H.; SØRENSEN, H. R.; MEYER, A. S. Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the bioethanol: sugar reaction mechanisms. **Carbohydrate Research**, Reino Unido, v. 385, p. 45-57, 2014.

RAVINDRAN R.; JAISWAL A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 199, p. 92-102, 2016.

REMIZE, F.; ANDRIEU, E.; DEQUIN, S. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the cytosolic Mg^{2+} and mitochondrial K^+ acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v. 66, p. 3151-3159, 2000.

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. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, Alemanha, v. 38, p. 1099-1107, 2011.

ROCHA-MARTÍN, J.; MARTINEZ-BERNAL, C.; PÉREZ-COBAS, Y.; REYES-SOSA, F. M.; GARCÍA, B. D. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 244, p. 48-56, 2017.

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

SAHA, B.C.; YOSHIDA, T.; COTTA, M. A.; SONOMOTO, K. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 44, p. 367-372, 2013.

SAINI, J. K.; PATEL, A. K.; ADSUL, M.; SINGHANIA, R. R. Cellulase adsorption on lignin: a road block for economic hydrolysis of biomass. **Renewable Energy**, Reino Unido, v. 98, p. 29-42, 2016.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SCAGLIONI, P. T.; BADIALE-FURLONG, E. Rice husk as an adsorbent: a new analytical approach to determine aflatoxins in milk. **Talanta**, Holanda, v. 152, p. 423-431, 2016.

SEO, D.-J.; FUJITA, H.; SAKODA, A. Effects of a non-ionic surfactant, Tween 20, on adsorption/desorption of saccharification enzymes onto/from lignocelluloses and saccharification rate. **Adsorption**, Boston, v. 17, p. 813-822, 2011.

SHIMIZU, F. L.; MONTEIRO, P. Q.; GHIRALD, P. H. C.; MILATI, R. B.; PAGNOCCA, F. C.; SOUZA, W. S.; SANT'ANNA, C.; BRIENZO, M. Acid, alkaline and peroxide pretreatments increase the cellulose accessibility and glucose yield of banana pseudostem. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 115, p. 62-68, 2018.

SHUDDHODANA, D. M.; BISWAS, RANJITA, BISARIA, V.S. Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Residues. *In*: MUSSATO, I. S. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**. 2016. p. 543-560.

SILLS, D.; GOSSETT, J. M. Using FTIR to predict saccharification from enzymatic hydrolysis of alkali-pretreated biomasses. **Biotechnology and Bioengineering**, Alemanha, v. 109, p. 353-362, 2012.

SILVA, D. D. V.; ARRUDA, P. V.; VICENTE, F. M. C. F.; SENE, L.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Evaluation of fermentative potential of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in cellulosic and hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysates on xylitol and ethanol production. **Annals of Microbiology**, Alemanha, v. 65, p. 687-694, 2015.

SILVA, G. M.; GIORDANO, R. L. C.; CRUZ, A. J. G.; RAMACHANDRIYA, K. D.; BANAT, I. M.; WILKINS, M. R. Ethanol production from sugar cane bagasse using SSF process and thermotolerant yeast. **Transaction of the ASABE**, Estados Unidos, v. 58, p. 193-200, 2015.

SILVA, J. D.; QUEIROZ, A. C. **Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. – 4. Reimp. Viçosa: UFV, 2009.

SINDHU, R.; KUTTIRAJA, M.; BINOD, P.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Bioethanol production from dilute acid pretreated Indian bamboo variety (*Dendrocalamus* sp.) by separate hydrolysis and fermentation. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 52, p. 169-76, 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELARAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 199, p. 152-178, 1999.

SINHA, E.; ROUT, S. K. Influence of fibre-surface treatment on structural, thermal and mechanical properties of jute. **Journal of Materials Science**, Holanda, v. 43, p. 2590-2601, 2008.

SIPOS, B.; DIENES, D.; SCHLEICHER, A.; PERAZZINI, R.; CRESTINI, C.; SIIKA-AHO, M.; RECZEY, K. Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam pretreated spruce in the presence of poly(ethylene glycol). **Enzyme and Microbial Technology**, Holanda, v. 47, p. 84-90, 2010.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. **Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL**, p.9, 2008a.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL**, p. 18, 2008c. ISSN Report No. TP-510-42618.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of extractives in biomass. **Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL**, p. 12, 2008b. ISSN Report No. TP-510-42619.

SOBROSA, F. Z.; STOCHERO, N. P.; MARANGON, E.; TIER, M. D. Development of refractory ceramics from residual silica derived from rice husk ash. **Ceramics International**, Faenza, v. 43, p. 7142-7146, 2017.

SUN, S.; SUN S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 199, p. 49-58, 2016.

SWIEGERS, J. H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A.; PRETORINS, I, S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Estados Unidos, v. 11, p. 139-173, 2005.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, Estados Unidos, v. 2, p. 472-499, 2007.

TAHIR, A.; AFTAB, M.; FARASAT, T. Effects of cultural conditions on ethanol production by locally isolated *Saccharomyces cerevisiae* BIO-07. **Journal of Applied Pharmacy**, Canadá, v. 3, p. 72-78, 2010.

TANEDA, D.; UENO, Y.; IEO, M.; OKINO, S. Characteristics of enzyme hydrolysis of cellulose under static condition. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 121, p.154-160, 2012.

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

TRIWAHYUNI, E.; M.; SUDIYANI, Y.; ABIMANYU, H. The effect of substrate loading on simultaneous saccharification and fermentation process for bioethanol production from oil palm empty fruit bunch. **Energy Procedia**, Reino Unido, v. 68, p.138-146, 2015.

TU, M.; SADDLER, J. N. Potencial enzyme cost reduction with the addition of surfactant during the hydrolysis of pretreated softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 161, p. 274-287, 2010.

TU, M.; ZHANG, X.; PAICE, M.; MCFARLANE, P.; SADDLER, J. N. Effect of Surfactants on Separate Hydrolysis Fermentation and Simultaneous Saccharification Fermentation of Pretreated Lodgepole Pine. **Biotechnology Progress**, Flórida, v. 25, n.4, p. 1122-1129, 2009.

TURHAN, I.; BIALKA, K. L.; DEMIRCI, A.; KARHAN, M. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, Holanda, v.101, p. 5290-5296, 2010.

VAN URK, H.; VOLL, W. S. L.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Transient – state analysis of metabolic fluxes in crabtree-positive and crabtree-negative yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v. 56, p. 281-287, 1990.

VARGA, E.; KLINKE, H. B.; RÉCZEY, K.; THOMSEN, A. B. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, Alemanha, v. 88, p. 567-574, 2004.

VENTURIN, B.; CAMARGO, A. F.; SCAPINI, T.; MULINARI, J.; BONATTO, C.; BAZOTI, S.; SIQUEIRA, D. P.; COLLA, L. H.; ALVES JR, S. L.; BENDER, J. P.; STEINMTZ, R. L. R.; KUNZ, A.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Effect of pretreatments on corn stalk chemical properties for biogas production on purpose. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 266, p. 116-124, 2018.

WANDERLEY, M. C. A.; SOARES, M. L.; GOUVEIA, E. R. Selection of inoculum size and *Saccharomyces cerevisiae* strain for ethanol production in simultaneous sacchrification and fermentation (SSF) of sugar cane bagasse. **African Journal of Biotechnology**, Nigéria, v. 13, p. 2762-2765, 2014.

WEI, G-Y.; GAO, W.; JIN, II-H.; YOO, S-Y.; LEE, J-H.; CHUNG, C-H.; LEE, J-W. Pretreatment and Saccharification of Rice Hulls for the Production of Fermentable Sugars. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Coréia do Sul, v. 14, p. 828-834, 2009.

WILKINSON, S.; SMART, K. A.; JAMES, S.; COOK, D. J. Maximising high solid loading enzymatic saccharification yield from acid-calyed hydrothermally pretreated brewers spent grain. **Biofuel Research Journal**, Canadá, v. 10, p. 417-429, 2016.

WILKOWSKA, A.; KREGIEL, D.; GUNESER, O.; YUCEER, Y. K. Growth and by-product profiles of *Kluyveromyces marxianus* cells immobilized in foamed alginate. **Yeast**, Malden, v. 32, p. 217-225, 2015.

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

WOJTUSIK, M.; ZURITA, M.; VILLAR, J. C.; LADERO, M.; GARCIA-OCHOA, F. influence of fluid dynamic conditions on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: effect of mass transfer rate. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 216, p. 28-35, 2016.

WU, J.; JU, L-K. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition. **Biotechnology Process**, Coréia do Sul, v. 14, p. 649-652, 1998.

WU, W-H.; HUNG, W-C.; LO, K-Y.; CHEN, Y-H.; WAN, H-P.; CHENG, K-C. Bioethanol Production from Taro Waste Using Thermo-tolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* K21. **Bioresource Technology**, New York, v. 201, p. 27-32, 2016.

XIROS, C.; JANSSEN, M.; BYSTRÖM, R.; CANELLA, D.; JØRGENSEN, H.; KOPPRAM, R.; LARSSON, C.; OLSSON, L.; TILLMAN, A-M.; WÄNNSTRÖM, S. Toward a sustainable biorefinery using high-gravity technology. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Reino Unido, v. 11, p. 15-27, 2017.

XU, J.; CHEN, Y.; CHEN, J. J.; SHARMA-SHIVAPPA, R.; BURNS, J. Delignification of switchgrass cultivars for bioethanol production. **BioResources**, Estados Unidos, v. 6, p. 707-720, 2011.

YANG, B.; DAI, Z.; DING, S-Y.; WYMAN, C. E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**, Reino Unido, v. 2, p. 421-450, 2011.

YANG, M.; LI, W.; LIU, B.; LI, Q.; XING, J. High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process. **Bioresource Technology**, Holanda, v.101, p. 4884-4888, 2010.

ZAIN, M.; MOHAMMAD, A. W.; HARUN, S.; FAUZI, N. A.; HAIROM, N. H. H. Synergistic effects on process parameters to enhance enzymatic hydrolysis of alkaline oil palm fronds. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 122, p. 617-626, 2018.

ZHANG, H.; DING, X.; CHEN, X.; MA, Y.; WANG, Z.; ZHAO, X. A new method of utilizing rice husk: consecutively preparing D-xylose, organosolv lignin, ethanol and amorphous superfine silica. **Journal of Hazardous Materials**, Holanda, v. 291, p. 65-73, 2015.

ZHANG, H.; FAN, M.; LI, X.; ZHANG, A.; XIEN, J. Enhancing enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by ferric chloride catalyzed organosolv pretreatment and Tween 80. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 258, p. 295-301, 2018.

ZHANG, H.; WU, S.; XIE, J. Evaluation of the effects of isolated lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Enzyme Microbial Technology**, Amsterdam, v. 101, p. 44-50, 2017.

ZHANG, W.; SATHITSUKSANOH, N.; BARONE, J. R.; RENNECKAR S. Enhanced enzymatic saccharification of pretreated biomass using glycerol thermal processing (GTP). **Bioresource Technology**, Holanda, v. 199, p. 148-154, 2016.

ZHAO, C.; SHAO, Q.; MA, Z.; LI, B.; ZHǎO, X. Physical and chemical characterizations of corn stalk resulting from hydrogen peroxide presoaking prior to ammonia fiber expansion pretreatment. **Industrial Crops and Products**, Holanda, v. 83, p. 86-93, 2016.

ZHENG, T.; LEI, F.; LI, P.; LIU, S.; JIANG, J. Stimulatory effects of rhamnolipid on corncob residues ethanol production via high-solids simultaneous saccharification and fermentation. **Fuel**, Holanda, v. 257, p. 1-8, 2019.

ZHENG, T.; YU, H.; LIU, S.; JIANG, J.; WANG, K. Achieving high ethanol yield by co-feeding corncob residues and tea-seed cake at high-solids simultaneous saccharification and fermentation. **Renewable Energy**, Reino Unido, v. 145, p. 858-866, 2020.

ZHOU, Y.; CHEN, H.; QI, F.; ZHAO, X.; LIU, D. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose. **Bioresource Technology**, Holanda, v. 182, p. 136-143, 2015.