

CRISTINA WINKELMANN BAPTISTA

**FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR *MEYEROZYMA*
CARIBBICA EM MICROAEROBIOSE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

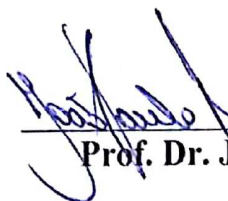
Orientador: **Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 07 / 12 / 2018

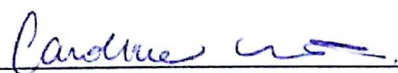
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior – UFFS



Prof. Dr. João Paulo Bender – UFFS



Profa. Dra. Caroline Müller

FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR *Meyerozyma caribbica* EM MICROAEROBIOSE

Baptista, C. W.*¹; Alves Jr., S. L.¹

¹ Engenharia Ambiental e Sanitária, UFFS – Campus Chapecó, Chapecó – Santa Catarina
crisrina_winkelmann@yahoo.com.br

RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, porém sua produção é quase que inteiramente de primeira geração, obtida através da fermentação da sacarose contida no caldo e/ou no melaço da cana-de-açúcar pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Assim sendo, a viabilização da produção de etanol de segunda geração (2G) pode aumentar ainda mais a produção brasileira, contudo, neste caso, faz-se necessária a fermentação de matérias-primas lignocelulósicas compostas de diferentes açúcares que *S. cerevisiae* não é capaz de fermentar. Neste contexto, torna-se extremamente desejável a caracterização de outras espécies de leveduras, no intuito de selecionar as linhagens mais adequadas ao novo processo. Com o objetivo de conhecer o desempenho fermentativo da espécie *Meyerozyma caribbica* diante dos principais açúcares encontrados em hidrolisados lignocelulósicos, fez-se a avaliação dos perfis fermentativos de quatro cepas desta levedura submetida à condição de microaerobiose, em meios contendo alternadamente glicose, xilose ou celobiose como fontes de carbono. Para isso, foram analisados a biomassa celular, o consumo de açúcares e a produção de etanol durante 12 horas de incubação dessas linhagens. As cepas analisadas consumiram toda a glicose durante o período de incubação e fermentaram eficientemente essa hexose, apresentando rendimento fermentativo equivalente ao máximo teórico. Por outro lado, a xilose e a celobiose não foram consumidas pelas células durante o período avaliado, inviabilizando, portanto, a produção de etanol a partir desses carboidratos. Deste modo, apesar da incapacidade de metabolizar a pentose e o dissacarídeo testados em condições de microaerobiose, os dados comprovam alta eficiência fermentativa das leveduras testadas diante da glicose, o principal açúcar encontrado em hidrolisados lignocelulósicos.

Palavras-chave: glicose, xilose, celobiose, etanol, leveduras.

ABSTRACT:

Brazil is the second largest producer of ethanol in the world, but its production is almost entirely first generation, obtained through the fermentation of the sucrose contained in the sugarcane juice and/or molasses by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Thus, the viability of the production of second-generation (2G) ethanol may further increase Brazilian production, however, in this case, it is necessary to ferment lignocellulosic raw materials composed of different sugars that *S. cerevisiae* is not capable of fermenting. In this context, it is extremely desirable to characterize other yeast species in order to select the most appropriate strains for the new process. In order to know the fermentative performance of the *Meyerozyma caribbica* species in relation to the main sugars found in lignocellulosic hydrolysates, the fermentation profiles of four strains of this yeast were evaluated under microaerobiosis condition in media containing alternately glucose, xylose or cellobiose as carbon sources. For this end, cellular biomass, sugar consumption and the ethanol production by these strains were analyzed during 12 hours of incubation. The analyzed yeasts consumed all the glucose during the incubation period and efficiently fermented this hexose, presenting fermentative yield equivalent to the theoretical maximum. On the other hand, xylose and cellobiose were not consumed by the cells during the period evaluated, thus making it impossible to produce ethanol from these

carbohydrates. Thus, despite the inability to metabolize the pentose and the disaccharide tested under microaerobic conditions, the data demonstrate high fermentative efficiency of the analyzed yeasts against glucose, the main sugar in lignocellulosic hydrolysates.

Keywords: glucose, xylose, cellobiose, ethanol, yeasts.

INTRODUÇÃO

O Brasil vem utilizando o etanol como combustível desde 1920, embora até a década de 1970 a produção de biocombustíveis não tenha sido significativa. Foi com a crise do petróleo em 1973 que se viu a necessidade de fontes alternativas de energia em todo o mundo. O panorama brasileiro mudou com a implantação do Programa Nacional do Álcool – Proálcool, em 1975, que foi motivado pela elevação dos preços do petróleo (HOECKEL, 2018; ROSA, GARCIA, 2009). O Proálcool visava o desenvolvimento de técnicas e melhoramento dos insumos na produção do álcool etílico, e destacava-se pelo grande esforço para a substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis renováveis. Por volta de 1978 houve uma expansão na produção de etanol produzido a partir da cana-de-açúcar e em seguida os primeiros carros movidos totalmente a álcool etílico começaram a circular no país, chegando a representar mais de 90% das vendas (ANDRADE et al., 2009; FGV, 2017; GOLDEMBERG, 2006).

A escolha da cana-de-açúcar como matéria-prima para o etanol se deu a fatores como: grande extensão territorial, clima adequado para sua cultura e o domínio da tecnologia na fabricação do etanol. O Brasil, portanto, apresentava-se como um país favorável para a produção do etanol, pois a produção de cana-de-açúcar era uma das culturas mais importantes no país desde o século XVIII (ANDRADE et al., 2009; GOLDEMBERG, 2006). Para Nitsch (1991), os anos do Proálcool não foram só de bons resultados. Na agricultura, a cana-de-açúcar tomava o lugar da produção de alimentos e outros produtos de exportação, o que ocasionou na delimitação de zonas para a cana-de-açúcar. Com a queda dos preços do petróleo em 1986, a produção de álcool no Brasil não acompanhava mais a demanda do mercado (MELO, 2018). Em 2003, contudo, a inserção na economia dos motores *flex* ou bicombustíveis (para o uso de gasolina e/ou etanol) fez com que a produção do etanol fosse impulsionada novamente (GOLDEMBERG, 2008; HOECKEL, 2018; STAMBUK et al., 2008). A produção destes carros se deu ao sucesso da produção de etanol, que foi de crescimento significativo até o ano 2009, quando teve uma queda na produção até 2012 devido a estabilização do preço do petróleo e o aumento do açúcar. A partir desta data acontece um novo crescimento da venda do etanol, chegando em seu pico no ano de 2015 com mais de 30 milhões de metros cúbicos produzidos, e até setembro de 2018 já somava pouco mais de 26 milhões de metros cúbicos produzidos (ANP, 2018; FGV, 2017; HOECKEL, 2018).

A preocupação com o meio ambiente tem tomado maiores proporções nos últimos anos. O aquecimento global e as mudanças climáticas são considerados os principais responsáveis por esta nova fase mundial, fazendo com que as emissões de gases de efeito estufa se tornassem o ponto principal nas políticas ambientais de diversos países (NYKO et al., 2010). E a preocupação referente aos cultivos, onde o uso de fertilizantes pode acarretar em maiores contaminações de solo devido às lixiviações, que transportam nitrato, amônio e fosfato (YAO et al., 2012), e os resíduos orgânicos provenientes destes plantios, se não forem corretamente eliminados, além de se tornar uma fonte de poluição ambiental, podem causar problemas à saúde pública (ESTRADA-BONILLA et al., 2017).

Os resíduos agroindustriais são constituídos basicamente de palha, folhas e caules das plantas, e sobras do beneficiamento de sucos, aguardente ou alimentos, consecutivamente (CORTEZ et al., 2008; MELO, 2018). Essa biomassa vegetal é definida como a matéria orgânica que pode ser transformada em energia mecânica, térmica ou elétrica, o que a torna um potencial recurso para a produção de combustíveis e produtos químicos renováveis (DIRBEBA et al., 2017; MELO, 2018). As refinarias brasileiras de açúcar e álcool representam um exemplo bem-sucedido. Algumas já integram na sua produção os processos de açúcar, álcool e energia elétrica, abrindo para o bioetanol novas possibilidades, como a produção da segunda geração do combustível (etanol 2G) (SILVA et al., 2014).

O processo de produção de etanol 2G é mais complexo que o de primeira geração, haja vista a estrutura dos resíduos lignocelulósicos. Essa matéria-prima demanda, antes da fermentação dos açúcares para a obtenção do etanol, uma etapa de pré-tratamento e uma de hidrólise ácida ou enzimática (FGV, 2017). A estrutura da biomassa lignocelulósica da cana-de-açúcar é representada pela interação físico-química da celulose (30-50% do peso seco) com a hemicelulose (15-35%) e a lignina (11-25%) (BICAS, 2016). Angulo-Padilla et al. (2018) analisaram a biomassa celulósica do milho, por exemplo, e verificaram que esta apresenta características similares à cana-de-açúcar, contendo 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 15-20% de lignina, assim comprovando o potencial da planta para a produção de etanol. A celulose é o principal componente das biomassas lignocelulósicas. Ela é um polímero insolúvel altamente ordenado, formado de glicose, apresentando até 10 mil unidades dessa hexose em sua cadeia. Já as hemiceluloses são estruturas heterogêneas mais curtas, porém altamente ramificadas, constituídas majoritariamente por moléculas de xilose (uma pentose). A lignina desempenha um papel de proteção na estrutura da biomassa, por ser hidrofóbica e ter fortes ligações químicas com a celulose e a hemicelulose, mas não apresenta função na produção de etanol 2G (PEREIRA JR et al., 2008; SANTOS, 2014; SARKAR et al., 2012;

STAMBUK et al., 2008). A metabolização de hexoses por leveduras é normalmente rápida e por via fermentativa, diferentemente do que ocorre com as pentoses em grande número de espécies. Mesmo com o desenvolvimento de cepas modificadas, estas ainda mostram uma eficiência menor no consumo de pentoses do que de hexoses (SILVA et al., 2014), dessa forma, o processo de produção de bioetanol precisa de um biocatalizador que seja capaz de fermentar eficientemente não apenas glicose, mas também xilose (STAMBUK et al., 2008).

O pré-tratamento torna os polissacarídeos celulose e hemicelulose, presentes na biomassa lignocelulósica, acessíveis à hidrólise, pois desfaz a interação entre a lignina e esses carboidratos. Depois do pré-tratamento, segue-se a hidrólise, que pode ocorrer pela adição de ácidos ou enzimas, sendo a estratégia enzimática a mais eficientemente empregada atualmente. As etapas de hidrólise e fermentação podem ser realizadas em separado ou através da sacarificação e fermentação simultânea (SSF – *Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Os resultantes principais da hidrólise são dois monossacarídeos: a glicose e a xilose (GALBE; ZACCHI, 2002; STAMBUK et al., 2008).

Na hidrólise da celulose, as enzimas celulolíticas podem promover a liberação direta da glicose, isoladamente, ou na forma de um dissacarídeo, a celobiose, que pode inibir por *feedback* negativo a atuação das celulases, dificultando o restante da hidrólise. A glicose, por sua vez, pode inibir a atuação das celobiasas, dificultando o restante da quebra da celobiose (CHI et al., 2009; PARISUTHAM et al., 2017; SANTOS, 2014). Assim sendo, é extremamente desejável que o microrganismo fermentador empregado no processo seja também capaz de transportar esse dissacarídeo para o interior da célula e hidrolisá-lo no citoplasma, para que as moléculas de glicose resultantes dessa quebra possam ser fermentadas a etanol – após a conversão da glicose a piruvato, por meio da via glicolítica, a enzima piruvato-descarboxilase catalisa a formação de acetaldeído que, na sequência, é reduzido a etanol pela ação da álcool-desidrogenase.

Para a metabolização da xilose, ocorrem inicialmente duas reações de oxirredução: a xilose é reduzida, pela enzima xilose redutase (XR), a xilitol através das coenzimas NADPH ou NADH, e o xilitol é oxidado pela enzima xilitol desidrogenase (XDH) à xilulose, com simultânea redução de NAD^+ a NADH. A xilulose, substrato da enzima xiluloquinase (XK), é subsequentemente fosforilada a xilulose-5-fosfato, às custas de uma molécula de ATP. A partir deste ponto, ocorre a via das pentoses-fosfato e a glicólise, com o piruvato podendo ser direcionado para a formação de etanol (HA et al., 2011; PITKÄNEM et al., 2003; STAMBUK et al., 2008). Contudo, em leveduras cuja XR utiliza NADPH em vez de NADH, ocorre um

desbalanço pela falta de reciclagem do NAD⁺, que resulta no acúmulo de xilitol e na interrupção da metabolização da xilose (HA et al., 2011).

A espécie *Meyerozyma caribbica* (VAUGHAN-MARTINI et al., 2005; KURTZMAN, SUZUKI, 2010) apresenta-se como uma das alternativas à *S. cerevisiae*, haja vista já ter sido isolada de matéria vegetal em decomposição como bagaço de agave-azul, casca de banana, sorgo e sementes de cacau (N'GUESSAN et al., 2011; PAPALEXANDRATOU, DE VUYST, 2011; SAUCEDO-LUNA et al., 2011; HANDE et al., 2013). Contudo, há ainda pouca informação acerca do metabolismo dessa levedura diante dos carboidratos encontrados em hidrolisados de biomassa lignocelulósica. Nessas circunstâncias, este trabalho se propôs a caracterizar os perfis fermentativos da levedura *Meyerozyma caribbica*, sob microarobiose (simulando condições industriais), em meios contendo três dos principais açúcares oriundos da hidrólise da celulose e da hemicelulose: glicose, celobiose e xilose.

METODOLOGIA

Linhagens de levedura utilizadas

Foram utilizadas quatro linhagens de leveduras da espécie *Meyerozyma caribbica*, previamente isoladas de bagaço e palha de milho em decomposição, provenientes da área experimental do *Campus* Chapecó da Universidade Federal da Fronteira Sul. Essas linhagens, que compõem a coleção de leveduras do Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos, são denominadas CHAP-087, CHAP-091, CHAP-096 e CHAP-103.

Fermentação em microarobiose

Para a análise da fermentação, as leveduras foram pré-cultivadas em Erlenmeyers com volume de 25 mL, em uma proporção de 1/5 do volume de meio líquido YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), por um período de ~48 horas com agitação de 145 rpm a 25°C. No passo seguinte, as leveduras do pré-cultivo foram inoculadas em um frasco Erlenmeyer de 1 L (transferindo-se 3,5 mL para 350 mL de meio YPD fresco) e subsequentemente incubadas a 25 °C, com 145 rpm, *overnight*. Quando as células atingiram uma densidade óptica (DO_{570nm}) de aproximadamente 10,0, elas foram centrifugadas (5.000 g, 3 min, 4°C) e lavadas duas vezes com água destilada a 4°C. Na sequência, as células foram ressuspensas em meio sintético YNB (0,67% de base nitrogenada de levedura e 2% de açúcar – glicose, xilose ou celobiose) de modo a se obter uma suspensão celular de 20 g L⁻¹. Essas suspensões foram mantidas em frascos *snapcaps*, a 25 °C, por 12 horas, sem agitação, com retirada de amostras a cada duas horas. De cada amostra, uma primeira alíquota foi utilizada

para a determinação da biomassa celular (DO_{570nm} multiplicada pelo fator de conversão: 0,3), enquanto a segunda foi centrifugada (5.000 g, 3 min, 4°C) e seu sobrenadante foi utilizado para a determinação do consumo de açúcares e da produção de etanol.

Foram realizados dois experimentos independentes para cada linhagem em cada uma das condições testadas. Os dados apresentados representam a média e o erro padrão em cada ponto de coleta de amostras ao longo das 12 horas de fermentação.

Determinação do consumo de açúcares e da produção de etanol

Tanto as dosagens dos açúcares consumidos quanto as dosagens do etanol produzido foram feitas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em equipamento LCMS-2020 da marca Shimadzu, com detecção por índice de refração (detector RID-10, Shimadzu) em coluna para ácidos orgânicos (Aminex HPX-87H, Bio-Rad), usando como fase móvel solução aquosa H_2SO_4 5mM, temperatura do detector de 40 °C, com tempo de execução (corrida) de 25 min, volume de injeção de 10 μ L e fluxo de 0,6 mL min^{-1} . As curvas de calibração foram feitas com padrões em sete concentrações distintas, sendo empregada a faixa de 0,5 a 20 g L^{-1} para açúcares e de 0,25 a 10 g L^{-1} para etanol.

O rendimento de etanol ($Y_{e/s}$) foi obtido pelo quociente entre a quantidade máxima de etanol produzida e o total de substrato (açúcar) consumido, sendo apresentado em $g_{etanol} g_{açúcar}^{-1}$. A partir do $Y_{e/s}$ foi calculada a eficiência fermentativa, como percentual do rendimento máximo teórico de etanol (0,511 para glicose).

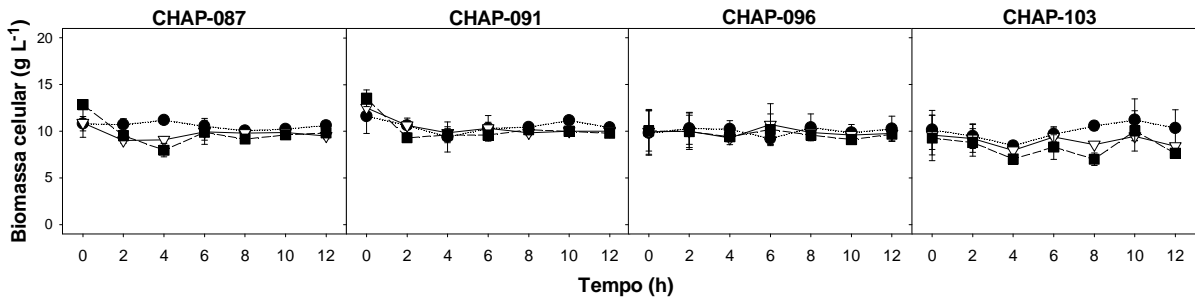
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o propósito de avaliar o desempenho fermentativo de *Meyerozyma caribbica* diante dos três principais carboidratos encontrados em hidrolisados lignocelulósicos (glicose, xilose e celobiose), de modo a aumentar o conhecimento acerca de leveduras que possam contribuir com a otimização da produção de etanol de segunda geração, fez-se a avaliação dos perfis de consumo de açúcares e produção de etanol de quatro cepas dessa espécie submetidas a condições de microaerobiose.

Os dados obtidos demonstram que as quatro cepas analisadas (CHAP-087, CHAP-091, CHAP-096 e CHAP-103) não apresentaram aumento de biomassa celular durante as 12 horas de incubação (Figura 1). De fato, conforme o esperado, não houve crescimento celular, visto que desde o tempo zero já era apresentada uma grande concentração celular em cada batelada. Com o experimento, esperava-se, portanto, que as células convertessem todo o açúcar em

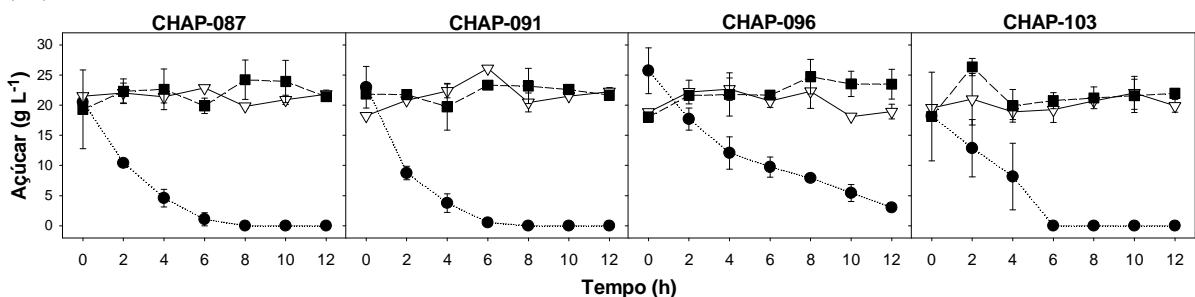
etanol, sem desvio para vias anabólicas. Desta forma, as células permaneceram com concentração constante desde o início da análise fermentativa, em aproximadamente 10 g L^{-1} .

Figura 1 – Biomassa celular das linhagens CHAP-087, CHAP-091, CHAP-096 e CHAP-103 em meios sintéticos contendo glicose (●), xilose (▽) ou celobiose (■) como fonte de carbono.



Com relação ao consumo de açúcares, pode-se notar que, nas cepas CHAP-087, CHAP-091 e CHAP-103, o consumo da glicose ocorreu de forma acelerada, chegando à exaustão entre 6 e 8 h, o que se deve ao fato de essas linhagens terem realizado metabolismo fermentativo frente à hexose, enquanto a xilose e a celobiose permaneceram intocadas (Figura 2). A cepa CHAP-096 foi a única que não apresentou consumo total da glicose ao fim das 12 horas de fermentação. Entretanto, percebe-se que o valor inicial da CHAP-096 no tempo inicial estava um pouco superior às demais. Talvez esse possa ser o motivo de ela não ter consumido toda a glicose; pelo que demonstra a linha do consumo, é possível que mais uma ou duas horas de experimento teriam proporcionado a depleção completa da hexose.

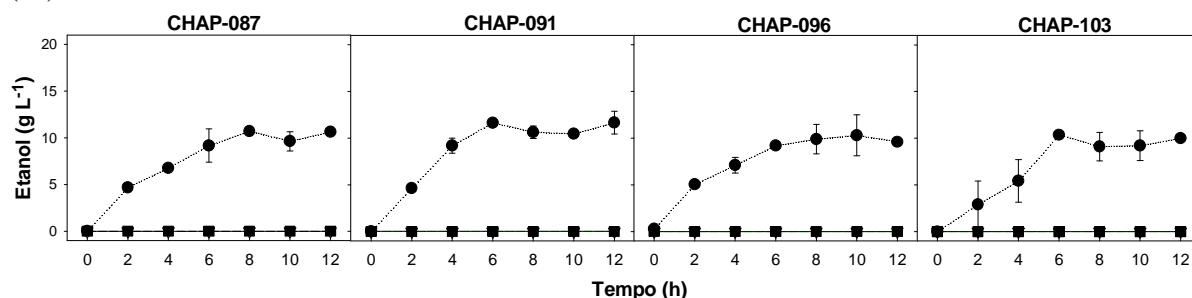
Figura 2 – Consumo de açúcares em microaerobiose pelas linhagens CHAP-087, CHAP-091, CHAP-096 e CHAP-103 em meios sintéticos contendo glicose (●), xilose (▽) ou celobiose (■) como fonte de carbono.



Conforme Sukpipat et al. (2017), a espécie *M. caribbica* tem capacidade de metabolizar tanto a glicose quanto a xilose, produzindo etanol não apenas a partir da hexose mas também a

partir da pentose. Dessa forma, esperava-se que as quatro linhagens testadas fossem capazes de fermentar a xilose de forma ainda mais eficiente que o observado por aqueles autores, haja vista o bloqueio da respiração imposto pela condição microaeróbica e a alta concentração celular no inóculo inicial. Entretanto, nas condições testadas no presente trabalho, a ausência do consumo da xilose inviabilizou, como esperado, a produção de etanol na presença deste açúcar (vide Figuras 2 e 3). Contudo, resultados semelhantes foram obtidos por Mattam et al. (2016), que demonstraram prejuízo no consumo dessa pentose quando as células foram submetidas a anaerobiose. De fato, se houver dependência da enzima xilose-redutase pela coenzima NADPH, que só pode ser regenerada sob condições aeróbicas, a utilização anaeróbica da xilose pode ser inibida (WEBB, LEE, 1990). Em outro estudo recente, verificou-se que o controle de alguns parâmetros de cultivo – como o fluxo de ar – pode aumentar a taxa de absorção de xilose, modificando a produção de biomassa e resultando em maior produção de etanol (RECH et al., 2018). Esse mesmo fenótipo de incapacidade de metabolização da fonte de carbono sob as condições testadas também foi observado para a celobiose: em decorrência da ausência de consumo do dissacarídeo (Figura 2), não houve produção de etanol, conforme o esperado (vide Figura 3).

Figura 3 – Produção de etanol em microaerobiose pelas linhagens CHAP-087, CHAP-091, CHAP-096 e CHAP-103 em meios sintéticos contendo glicose (●), xilose (▽) ou celobiose (■) como fonte de carbono.



Em contrapartida, as quatro linhagens analisadas fermentaram eficientemente a glicose disponível no meio, produzindo $10,7 \text{ g L}^{-1}$, $11,6 \text{ g L}^{-1}$, $10,3 \text{ g L}^{-1}$ e $10,4 \text{ g L}^{-1}$ de etanol (Figura 3). Pode-se notar ainda que, com exceção da cepa CHAP-096, os picos de máxima produção de etanol correspondem ao ponto de exaustão da glicose, o que demonstra uma validação dos dados obtidos. Verifica-se também, nos dados da Figura 3, elevado rendimento fermentativo ($Y_{e/s}$) quando as células se encontravam metabolizando a hexose testada. Considerando que o rendimento máximo teórico diante desse açúcar é de $0,511 \text{ g g}^{-1}$, as linhagens CHAP-087,

CHAP-091, CHAP-096 e CHAP-103 apresentaram, respectivamente, 101,9%, 98,6%, 88,8% e 111,7% de eficiência fermentativa. Evidentemente, é amplamente reconhecida a impossibilidade de se atingir, na prática, o rendimento máximo teórico. Assim sendo, os dados que excederam este valor refletem, possivelmente, pequenos erros experimentais, embora estejam na faixa dos 10% admitidos para ensaios desta natureza. De todo modo, eles representam graus de eficiência semelhantes aos observados para linhagens industriais de *S. cerevisiae* durante a já bem estabelecida produção de etanol de primeira geração (LOPES et al. 2016), o que sugere um potencial de aplicação industrial da espécie *M. caribbica*.

CONCLUSÃO

Embora as linhagens analisadas não tenham sido capazes de fermentar a xilose e a celobiose, os dados obtidos demonstram elevado desempenho fermentativo de *Meyerozyma caribbica* diante da glicose (o principal carboidrato presente em hidrolisados lignocelulósicos), com rendimento de etanol equivalente ao observado para as leveduras industriais de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação da sacarose na fabricação do etanol de primeira geração. Dessa forma, *M. caribbica* é igualada a *S. cerevisiae* num dos quesitos almejados para a produção do etanol 2G. Há, contudo, a necessidade de submeter as cepas estudadas a outras condições fermentativas para uma melhor avaliação dos seus comportamentos frente à xilose e à celobiose.

REFERÊNCIAS

- ANP (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS). Dados estatísticos. Produção de biocombustíveis. Disponível em: < <http://www.gov.br/dados-estatisticos>>. Acesso em: 15 nov. 2018.
- ANDRADE, E. T.; CARVALHO, S. R. G.; SOUZA, L. F. Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. **Engevista**. v. 11, n. 2. p. 127-136, 2009.
- ANGULO-PADILLA, J.; LA OSSA, L. L.; GONZÁLEZ-DELGADO, A.; SÁNCHEZ-TUIRÁN, E.; OJEDA-DELGADO, K. Potential for degradation of lignocellulosic biomass via alkaline pretreatment using corn crop residual biomass. **Contemporary Engineering Sciences**. v. 11, n. 14, p. 679-687, 2018.
- BICAS, T. C. **Valorização de subprodutos agroindustriais: potencial utilização em indústrias alimentícias e de biotecnologia**. 44 f. Trabalho de Conclusão do Curso de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco - PR. 2016.
- CHI, Z. CHI, Z; LIU, G.; WANG, F.; JU, L.; ZHANG, T. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. **Biotechnology Advances**. v. 27, p. 423-431, 2009.

- CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GÓMEZ, E. O. **Biomassa para energia**. Editora da UNICAMP, Campinas - SP, 2008.
- DIRBEBA, M. J.; BRINK, A.; DeMARTINI, N.; ZEVENHOVEN, M.; HUPA, M. Potential for thermochemical conversion of biomass residues from the integrate sugar-ethanol process – Fate of ash and ash-forming elements. **Bioresource Technology**. v. 234, p. 188-197, 2017.
- ESTRADA-BONILLA, G. A.; LOPES, C. M.; DURRER, A.; ALVES, P. R. L.; PASSAGLIA, N.; CARDOSO, E. J. B. N. Effect of phosphate-solubilizing bacteria on phosphorus dynamics and the bacterial community during composting of sugarcane industry waste. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 40, p. 308-313, 2017.
- FGV. **Biocombustíveis**. FGV Energia. Agosto 2017. 128 p. Ano 4. n. 8. ISSN 2358-5277.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 59, p. 618-628, 2002.
- GOLDEMBERG, J. The ethanol program in Brazil. **Environmental Research letters**. v. 1, 2006.
- GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**. v. 1, p. 6, 2008.
- HA, S-J.; GALAZKA, J. M.; KIM, S. R.; CHOI, J-H.; YANG, X.; SEO, J-H. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous celobiose and xylose fermentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 108, n. 2, 2011.
- HANDE, A.; MAHAJAN, S.; PRABHUNE, A. Evaluation of ethanol production by a new isolate of yeast during fermentation in synthetic medium and sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Annals of Microbiology**, v. 63, p 63-70, 2013.
- HOECKEL, P. H. O. **Implicações da oferta e da demanda de etanol: comportamento de preços, interações com os mercados agrícolas e mudanças no comércio**. 109 f. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Economia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2018.
- KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Milleroyzyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v. 51, p. 2-14, 2010.
- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; DE AMORIM NETO, H. B.; DE AMORIM, H.V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 475, p. 64-76, 2016.
- MATTAM, A. J.; KUILA, A.; SURALIKERIMATH, N.; CHOUDARY, N.; RAO, P. V. C.; VELANKAR, H. R. Cellulolytic enzyme expression and simultaneous conversion of lignocellulosic sugars into ethanol and xylitol by a new *Candida tropicalis* strain. **Biotechnology for Biofuels**. v. 9, p.157. 2016.
- MELO, M. C. R e. **Políticas públicas brasileiras de biocombustíveis: estudo comparativo entre os programas de incentivo à produção, com ênfase em etanol e biodiesel**. 86 f.

Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2018.

N'GUESSAN, K. F.; BROU, K.; JACQUES, N.; CASAREGOLA, S.; DJE, K. M. Identification of yeasts during alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, p. 855-864, 2011

NITSCH, M. O programa de biocombustíveis Proálcool no contexto da estratégia energética brasileira. **Revista da Economia Política**, vol. II, n.2, 16 f., 1991.

NYKO, D.; GARCIA, J. L. F.; MILANEZ, A. Y.; DUNHAM, F. B. A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 32, p. 5-48, 2010.

PAPALEXANDRATOU, Z.; DE VUYST, L. Assessment of the yeast species composition of cocoa bean fermentations in different cocoa-producing regions using denaturing gradient gel electrophoresis. **FEMS Yeast Research**, v. 11, p. 564-574, 2011.

PARISUTHAM, V.; CHANDRAN, S-P.; MUKHOPADHYAY, A.; LEE, S. K. KEASLING, J. D. Intracellular celobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries. **Bioresource Technology**. v. 239, p. 496-506, 2017.

PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery**. Series on biotechnology. Rio de Janeiro, 2008. v. 2, 1 ed. 47 p. ISBN 978-85-903967-3-4.

PITKÄNEN, J. P.; AISTIDOU, A.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Metabolic flux analysis of xyloses metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metabolic Engineering**. v. 5, p. 16-31, 2003.

RECH, R. R.; FONTANA, R. C.; ROSA, C. A.; CAMASSOLA, M.; AYUB, M. A. Z.; DILLON, A. J. P. Fermentation of hexoses and pentoses from sugarcane bagasse hydrolysates into ethanol by *Spathaspora hagerdaliae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 2018.

ROSA, E. S.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro, n. 32. p. 117-156. 2009.

SANTOS, A. A. **Metabolização da celobiose por leveduras isoladas a partir de biomassa lignocelulósica em decomposição**. Trabalho de Conclusão do Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Chapecó – SC, 2014.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BENNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**. v. 37, p. 19-37, 2012.

SAUCEDO-LUNA, J.; CASTRO-MONTOYA, A.J.; MARTINEZ-PACHECO, M.M.; SOSA-AGUIRRE, C.R.; CAMPOS-GARCIA, J. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 38, p. 725-732, 2011.

SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; RAICHER, G.; PICCOLI, R. A. M.; MENDONÇA, T. T.; LOPES, M. S. G.; GOMEZ, J. G. C. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates

in biorefineries associates with the production of sugar and ethanol. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 72, p. 2-7, 2014.

STAMBUK, B. U. ELEUTHERIO, E. C. A. FLOREZ-PARDO, L. M. SOUTO-MAIOR, A. M.; BON, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific and Industrial Research**. v. 67, p. 918-926, 2008.

SUKPIPAT, W.; KOMEDA, H.; PRASERTSAN, P.; ASANO, Y. Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with L-arabitol dehydrogenase activity from the newly isolate pentose-fermenting yeast *Meyerozyma caribbica* 5XY2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 123, n. 1, p. 20-27, 2017.

VAUGHAN-MARTINI, A.; KURTZMAN, C.P.; MEYER, S. A.; O'NEILL, E. B. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. **FEMS Yeast Research**. v. 5, p. 463-469, 2005.

WEBB, S. R.; LEE, H. Regulation of D-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. **Biotechnology Advances**. v. 8, p. 685-697, 1990.

YAO, Y.; GAO, B., ZHANG, M., INYANG M., ZIMMERMAN, A. R. Effect of biochar amendment on sorption and leaching of nitrate, ammonium and phosphate in a sandy soil. **Chemosphere**. v. 89, p. 1467-1471, 2012.