

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA
CAMPUS CHAPECÓ

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS PARA A PRODUÇÃO DE
ETANOL 2G A PARTIR DE HIDROLISADO DE COCO**

ACADÊMICA: ANA CAROLINA LUCARONI

ORIENTADOR Prof.: Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior

Maio - 2021

ANA CAROLINA LUCARONI

**ANÁLISE DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS PARA A PRODUÇÃO DE
ETANOL 2G A PARTIR DE HIDROLISADO DE COCO**

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. Sérgio Luiz Alves Júnior**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 20/05/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior - UFFS



Profa. Dra. Helen Treichel - UFFS



Prof. Dr. Guilherme Martinez Mibielli - UFFS

ANÁLISE DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G A PARTIR DE HIDROLISADO DE COCO

Lucaroni, A. C.*¹, Alves, S. L. Jr.¹

¹Engenharia Ambiental e Sanitária, UFFS – *Campus* Chapecó – Santa Catarina

*lucaroniana@gmail.com

RESUMO

Nas últimas décadas, o Brasil obteve grande progresso na produção de etanol combustível utilizando a sacarose da cana-de-açúcar como matéria-prima, sendo o segundo maior produtor mundial de etanol. Entretanto, em termos de segurança hídrica, alimentar e ambiental, essa produção pode ser otimizada pela substituição da matéria-prima alimentícia por resíduos agrícolas, dando origem à segunda geração do combustível: o etanol 2G. Entre estas biomassas, a casca do coco é uma potencial matéria-prima para a produção de hidrolisados lignocelulósicos, devido ao seu elevado percentual de holocelulose (~44,5%), que pode ser convertido em açúcares fermentescíveis. Deste modo, o presente trabalho visa contribuir com a diversificação das matérias-primas utilizadas para a produção de álcool combustível, através da análise dos parâmetros fermentativos do hidrolisado de coco, para a produção de etanol 2G. Para tal, a casca do coco foi submetida a um pré-tratamento alcalino com hidróxido de cálcio (20% m/m). Em seguida, utilizaram-se as enzimas Ctec2 (2% v/m) e Htec2 (0,5% v/m) para a hidrólise. A eficiência de conversão dos polímeros em monômeros foi de 19,33% da celulose em glicose e de 7,30% da hemicelulose em xilose. Também foi constatada a presença dos inibidores ácido acético e ácido fórmico. Nas fermentações, foram utilizadas a cepa *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 e a levedura industrial de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. As melhores condições deste processo foram definidas por meio de um planejamento experimental, analisando a produção de biomassa (g L^{-1}) e o percentual de ART consumido, sendo estabelecido o pH 7 e a temperatura de 40 °C. Como resultado, a linhagem UFFS-CE-3.1.2 apresentou a maior produção de biomassa e o maior consumo de ART, mas não produziu etanol. Em contrapartida, a linhagem industrial fermentou os açúcares, apresentando um rendimento de etanol de $0,24 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{açúcar}}^{-1}$. Portanto, a casca do coco pode ser uma biomassa promissora para a produção de etanol 2G, sendo necessária a otimização dos processos de pré-tratamento e hidrólise, de modo a aumentar as concentrações de açúcares e reduzir os inibidores no hidrolisado.

Palavras-chave: Biomassa Lignocelulósica. Pré-tratamento. *Saccharomyces cerevisiae*. *Wickerhamomyces*. Planejamento Experimental.

ABSTRACT

In recent decades, Brazil has made great progress in fuel ethanol production using sugarcane sucrose as raw material, is the world's second-largest producer of ethanol. However, in terms of water, food, and environmental safety, this production can be optimized by replacing the food raw material with agricultural waste, giving rise to the second generation of fuel: 2G ethanol. Among these biomasses, the coconut husk is a potential raw material for the production of lignocellulosic hydrolysates due to its high percentage of holocellulose (~44.5%), which can be converted into fermentable sugar. In this way, the present work aimed to contribute to the diversification of the raw materials used for ethanol production by analyzing the fermentative parameters of coconut hydrolysate to produce 2G ethanol. Therefore, the coconut husk was

submitted to an alkaline pretreatment with calcium hydroxide (20% w/w). Then, the enzymes Ctec2 (2% v/w) and Htec2 (0.5% v/w) were used for hydrolysis. The conversion efficiency of polymers into monomers was 19.33% of cellulose in glucose and 7.30% of hemicellulose in xylose. The presence of the inhibitors acetic acid and formic acid was also observed. In the fermentation assays, the strain *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2 and the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 were employed. The best conditions of this process were defined through an experimental design, analyzing the biomass production (g L^{-1}) and the consumed TRS percentage, being established the pH 7 and temperature of 40 °C. As a result, the yeast UFFS-CE-3.1.2 showed the highest biomass production and the highest TRS consumption, but it did not produce ethanol. In contrast, the industrial strain fermented the sugars, showing an ethanol yield of $0,24 \text{ g}_{\text{ethanol}} \text{ g}_{\text{sugar}}^{-1}$. Therefore, coconut husk can be promising biomass for the production of 2G ethanol, and its necessary to optimize the process of pretreatment and hydrolysis processes to increase sugar concentration and reduce inhibitors in the hydrolysate.

Keywords: Lignocellulosic Biomass. Pretreatment. *Saccharomyces cerevisiae*. *Wickerhamomyces*. Experimental Design.

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda energética e as preocupações associadas ao uso de combustíveis fósseis fizeram com que houvesse um estímulo para o desenvolvimento e a industrialização de combustíveis renováveis. Entre os biocombustíveis, o etanol se destaca por seu potencial de crescer a sustentabilidade e de mudar a economia global em direção a um futuro mais verde (ÁVILA; MARCUS; GOLDBECK, 2018; ELIODÓRIO et al., 2019). Atualmente, a produção mundial de etanol é liderada pelos Estados Unidos, que utiliza o milho como matéria-prima, seguido pelo Brasil, que faz uso do melaço e do caldo da cana-de-açúcar como matérias-primas principais. Os dois países acumulam juntos 84% da produção mundial (RFA, 2021).

Apesar da produção de etanol de primeira geração (1G) estar bem consolidada, a preocupação com fatores como a segurança alimentar, a segurança hídrica e o avanço de terras de cultivo para áreas de vegetação nativa, abriram espaço para o desenvolvimento do etanol de segunda-geração (2G) (RULLI et al., 2016). O etanol 2G utiliza como matéria-prima a biomassa lignocelulósica não alimentícia, tais como resíduos agrícolas e florestais, sendo uma alternativa sustentável para a otimização da produção de etanol combustível. Entretanto, a matéria-prima lignocelulósica, ao contrário da utilizada para a produção do etanol 1G, é rica em celulose, hemicelulose e lignina. Deste modo, os açúcares da biomassa não estão prontamente disponíveis para serem fermentados. Isto faz com que sejam necessárias duas etapas prévias de pré-tratamento e hidrólise, nas quais a lignina é removida ou degradada e a cristalinidade dos polissacarídeos é quebrada (SINGH et al., 2015). O pré-tratamento exerce grande influência no custo do processo de produção de etanol. Essa etapa influencia as taxas de conversão e hidrólise bem como a carga enzimática necessária. Quando muito agressivo, o pré-tratamento pode

acarretar a inibição dos estágios de hidrólise e de fermentação (RABELO; FILHO; COSTA, 2013; BHUTTO et al., 2017; ÁVILA; MARCUS; GOLDBECK, 2018). Além disso, a quebra da hemicelulose e da celulose liberam açúcares como a xilose e a celobiose, que não são fermentados naturalmente pelo microrganismo comumente utilizado na indústria, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ELIODÓRIO et al., 2019). A falta de microrganismos que metabolizem esses açúcares e que tolerem os estresses das dornas de fermentação, limitam economicamente a produção de etanol 2G (MUPONDWA et al., 2017; MORAIS et al., 2020). Diante dessa limitação, diferentes pesquisadores têm focado no isolamento e bioprospecção de novas cepas de leveduras selvagens que sejam capazes de metabolizar os açúcares presentes nos hidrolisados, bem como de tolerar os inibidores do processo fermentativo (LEE; JELLISON; ALPER, 2016; ELIODÓRIO et al., 2019; ROMERO-FRASCA et al., 2021).

Diferentes tipos de biomassa podem ser aproveitados para a produção do etanol 2G, como é o caso da casca de coco verde. A indústria de coco verde está presente em mais de 200 países (NOGUEIRA et al. 2018), com uma produção mundial de 61,8 milhões de toneladas, das quais 2,3 milhões de toneladas foram cultivadas apenas no Brasil, sendo este o quinto maior produtor (FAO, 2018). Sabe-se que a estrutura do coco verde é constituída por epicarpo, mesocarpo, endocarpo, albúmen sólido e albúmen líquido (SOARES et al., 2017) e que apenas o albúmen sólido e o líquido são comestíveis. Um coco verde, normalmente, ultrapassa de 1 kg quando fresco e as partes não consumidas representam a metade dessa massa (SOARES et al., 2016). Desse modo, se torna essencial a destinação adequada do grande volume de resíduos dessa produção para evitar a sobrecarga dos aterros sanitários e da poluição ambiental (ARAÚJO et al., 2017).

A casca do coco verde é uma biomassa lignocelulósica constituída por 33,2% de celulose, 29,1% de hemicelulose e 25,4% de lignina (GONÇALVES et al. 2015; SOARES et al., 2017). A elevada proporção de lignina presente na casca de coco, torna essa biomassa imprópria para o reaproveitamento na indústria de papel (SOARES et al., 2016). Por outro lado, os proeminentes percentuais de celulose e hemicelulose tornam a casca de coco uma matéria-prima interessante para a produção de etanol 2G. De fato, ao considerar uma eficiência de fermentação de ~90%, o que é praticado atualmente na indústria do etanol, em relação ao rendimento máximo teórico (0,51 g de etanol/ g de açúcar), é possível perceber esse potencial. Tendo em vista a produção de coco verde do ano de 2018 e impondo as condições de que a celulose seja composta por glicose e a de hemicelulose majoritariamente por xilose, o que totalizaria cerca

de 19,27 milhões de toneladas de açúcares, seria possível obter um volume de 12,39 bilhões de litros de etanol provenientes do reaproveitamento dessa biomassa residual.

Diante do exposto, o presente estudo pretende contribuir com uma alternativa para o reaproveitamento da casca do coco verde para a produção de etanol 2G. Essa alternativa consiste na análise dos parâmetros fermentativos de hidrolisado enzimático de coco verde, proveniente de um pré-tratamento alcalino, com hidróxido de cálcio. Como microrganismos fermentadores, foram utilizadas duas linhagens de leveduras: uma da nova espécie selvagem, ainda não descrita, do gênero *Wickerhamomyces* (UFFS-CE-3.1.2) e uma cepa industrial da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2).

2 METODOLOGIA

2.1 Biomassa lignocelulósica

A biomassa utilizada no estudo foi a casca (epicarpo e mesocarpo) do coco-verde, adquirida no comércio local. Inicialmente, a biomassa passou por um processo de secagem em estufa, entre 60 e 80 °C, por 48 h. Com intuito de aumentar a área superficial da biomassa, foi realizada a moagem em moinho de facas do tipo Willey (AL-032S).

2.2 Caracterização da biomassa lignocelulósica

Para a caracterização físico-química da biomassa foram avaliados os parâmetros de umidade (SLUITER et al., 2005a), de cinzas (SLUITER et al., 2005b), de extrativos (SLUITER et al., 2005c) e da composição lignocelulósica (TEMPLENTON; HERMAN, 1995; SLUITER et al., 2005d; HYMAN et al., 2007), conforme os protocolos do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL). Visando a homogeneização das partículas, foi determinado através da análise granulométrica (HAMES et al., 2005) que o tamanho das partículas empregado no estudo seria de até 0,25 mm.

A composição lignocelulósica (TEMPLENTON; HERMAN, 1995; SLUITER et al., 2005d; HYMAN et al., 2007) foi determinada através de um processo de hidrólise ácida (com ácido sulfúrico 72% m/m), em banho termostático a 30 °C por uma 1h, seguido de auto-clave (1h, 1 bar, a 121 °C). Assim, foram determinados os percentuais de lignina (solúvel e insolúvel). As proporções de celulose (1) e hemicelulose (2) foram estimadas em função das concentrações de açúcares (glicose, xilose e celobiose) e de produtos da decomposição (HMF, furfural, ácido acético) em g L⁻¹, obtidas por meio da quantificação em HPLC (item 2.4). Os fatores de conversão utilizados foram descritos por Rabelo et al. (2011).

$$\text{Celulose (\%)} = 0,95 \cdot \text{Ce (\%)} + 0,90 \cdot \text{G (\%)} + 1,20 \cdot \text{HMF (\%)} \quad (1)$$

$$\text{Hemicelulose (\%)} = 0,88 \cdot \text{X (\%)} + 1,37 \cdot \text{F (\%)} + 0,72 \cdot \text{AA (\%)} \quad (2)$$

Onde: Ce = celobiose; G = glicose; HMF = 5-hidroximetilfurfural; X = xilose; F = furfural; AA = ácido acético.

2.3 Pré-tratamento e hidrólise enzimática

O pré-tratamento realizado no estudo foi do tipo alcalino, com hidróxido de cálcio a 20% (m/m). Os ensaios ocorreram em frascos com razão sólido líquido de 100 g_{biomassa}/L_{solução}. Os recipientes foram levados a incubadora shaker (SL-223), a 70 °C e a 200 rpm, por 24 h.

Após o término do pré-tratamento, os frascos foram retirados da incubadora shaker, de modo que a temperatura fosse reduzida para prosseguir com o processo de hidrólise enzimática. Em um primeiro momento, o pH foi ajustado com ácido cítrico (1 M) em 5,0-5,5 (pH ótimo para as enzimas). Foram usadas as enzimas CELLIC® CTec2 e CELLIC® HTec2. As enzimas foram diluídas em tampão acetato nas concentrações (em relação a massa seca de biomassa) de 2% para a HTec2 e de 0,5% para a CTec2 e adicionadas aos recipientes. Os frascos retornaram para a incubadora shaker (SL-223) por 24 h, a 50 °C e 200 rpm. Após o término da hidrólise enzimática, o hidrolisado foi neutralizado com carbonato de cálcio, de modo a atingir o pH entre 5-6. Posteriormente, alíquotas do hidrolisado neutralizado foram filtradas utilizando filtros de membrana de 0,22 μm (Millipore), para determinação dos açúcares (item 2.4).

2.4 Determinação de açúcares, etanol e inibidores de fermentação

As concentrações de açúcares (glicose, xilose e celobiose) e do etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, LC-MS 2020, SHIMADZU), com fase móvel de 5 mM H₂SO₄, a 50 °C, com fluxo de 0,6 mL min⁻¹, em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) e detecção por índice de refração RID-10^A, conforme descrito por Barrilli et al. (2020). Com as mesmas especificações foram determinadas as concentrações de ácidos orgânicos (ácido acético e ácido fórmico). Já as concentrações de furfural e de 5-hidroximetilfurfural, utilizadas na caracterização, foram determinadas por HPLC, com fase móvel de uma solução de água pura com acetronitrila (85:15 v/v), acidificada com ácido acético (1%), a 40 °C, com fluxo de 0,8 mL min⁻¹, em coluna NST-18 e detector SPD-M20A (Diodo Array Detector) /SHIMADZU.

2.5 Ajuste de açúcares no hidrolisado

O hidrolisado de coco-verde teve os açúcares ajustados de forma a ter as concentrações de: 25,0 g L⁻¹ de glicose e 25,0 g L⁻¹ de xilose. Também foram adicionados 3,0 g L⁻¹ de fosfato de potássio monobásico, para o ajuste de micronutrientes, e 17,5 g L⁻¹ de cloreto de sódio, para avaliar o efeito do estresse osmótico imposto pela presença desse sal. O hidrolisado teve o pH ajustado conforme os valores do planejamento experimental (item 2.7), e foi esterilizado por meio da filtração à vácuo, utilizando filtros de nylon com poros de 0,45 µm.

2.6 Leveduras utilizadas

Foram utilizadas no estudo duas cepas de leveduras: UFFS-CE-3.1.2 e PE-2. A cepa UFFS-CE-3.1.2 foi taxonomicamente identificada como uma nova espécie, ainda não descrita, do gênero *Wickerhamomyces* (BAZOTI et al., 2017) e pertence ao Grupo de Pesquisa em Processos Enzimáticos e Microbiológicos da Universidade Federal da Fronteira Sul - *campus* Chapecó. A PE-2, utilizada para fins comparativos, é uma das principais linhagens industriais da espécie *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção de etanol 1G no Brasil (BASSO et al. 2008). Essa linhagem nos foi gentilmente fornecida pela empresa Fermentec (Piracicaba - SP).

2.7 Cultivo de leveduras a partir de um planejamento experimental

As células de levedura foram pré-inoculadas em meio YPD (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona e 20 g L⁻¹ de glicose) durante 48 h, a 25°C e 145 rpm. Para avaliar a melhor condição para os ensaios de cinéticas de fermentação, utilizou-se a plataforma Protimiza Experimental Design (<http://experimental-design.protimiza.com.br/>; Rodrigues e Iemma, 2014) para a realização de um planejamento experimental (Tabela 1), do tipo Delineamento Composto Central (DCC), variando pH e temperatura. Como respostas foram analisadas a produção de biomassa (g L⁻¹) e o percentual de açúcares redutores totais (ART) consumido, totalizando 7 ensaios para cada cepa.

Tabela 1 – Planejamento experimental DCC

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
pH	3	5	7
Temperatura (°C)	20	30	40

Os ensaios ocorreram em frascos Erlenmeyer de 50 mL, com 10 mL de hidrolisado. As leveduras foram inoculadas e os frascos foram levados para o shaker orbital, com agitação

constante de 150 rpm e com temperatura ajustada conforme o DCC, por 48 h. Ao final do experimento, amostras foram coletadas para obtenção de resultados.

Para a avaliação da produção de biomassa (3) foi medida a densidade óptica, por meio de espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm. Alíquotas foram coletadas para avaliação dos açúcares redutores totais (ART) por DNS (ácido dinitrosalicílico), conforme o descrito por Santos et al. (2017).

$$\text{Produção de biomassa (g L}^{-1}\text{)} = \text{OD}_{(570 \text{ nm})} \times \text{F.D} \times 0,3 \quad (3)$$

Onde: $\text{OD}_{(570 \text{ nm})}$ = Absorbância a 570 nm; F.D = Fator de diluição.

2.8 Cinéticas de fermentação

Após estabelecida a melhor condição no DCC, foram realizados ensaios de cinética de fermentação. Para isso, as leveduras foram pré-crescidas por 48 h (conforme descrito no item 2.7) e inoculadas em frascos Erlenmeyer, com um quinto do volume de hidrolisado. As fermentações ocorreram na condição determinada pelo planejamento experimental, sob agitação constante de 150 rpm. Os ensaios ocorreram em triplicata.

Foram retiradas alíquotas em intervalos regulares. Essas amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado com filtros de nylon (com poros de 0,45 μm) e armazenados para posterior análise em HPLC (item 2.4), para a determinação da produção, do rendimento, da produtividade de etanol e da eficiência fermentativa (4). Em paralelo, alíquotas foram retiradas para a avaliação da produção de biomassa.

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{[\text{etanol}]}{[\text{açúcar}] \cdot 0,51} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde: [etanol] = concentração de etanol produzido (g L^{-1}); [açúcar] = concentração de glicose ou xilose inicial (g L^{-1}); 0,511 = rendimento máximo teórico de etanol.

O rendimento de etanol (Y) é dado através da razão entre a quantidade de etanol produzido e a quantidade de açúcar consumido, apresentado como $\text{g}_{\text{etanol}} \text{g}_{\text{açúcar}}^{-1}$. A produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) é calculada pela relação entre a máxima produção de etanol e o tempo necessário para atingi-la.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da biomassa

A etapa de caracterização da biomassa é indispensável para que essa seja considerada um recurso energético economicamente eficiente, pois auxilia na definição de suas perspectivas de aplicação (SINGH; MAHANTA; BORA, 2017). As características da biomassa variam de acordo com o tipo, a localidade, as condições climáticas e do solo de cultivo. No presente estudo, a casca do coco verde apresentou 5,23% de umidade. Os demais parâmetros determinados estão expressos na Tabela 2, em base seca, para melhor comparação com a literatura.

Tabela 2 – Composição química da biomassa, em base seca.

Componente	% (m/m)
Extrativos	26,26 ± 0,98
Lignina total	26,73 ± 0,99
Celulose	25,11 ± 0,74
Hemicelulose	19,39 ± 0,94
Cinzas	2,51 ± 0,09

Observa-se que o percentual de cinzas é próximo a $2,45 \pm 0,01\%$, valor encontrado por Araújo et al. (2017) para a mesma biomassa, enquanto para a casca do coco maduro esse valor é maior ($3,31 \pm 0,32\%$), conforme exposto por Gonçalves et al. (2016). Soares et al. (2017) encontrou o percentual de $30,1 \pm 0,02\%$ para os extrativos em água, enquanto que Nogueira et al. (2018) encontrou o índice de $19,62 \pm 0,39\%$, utilizando a mesma metodologia. Deste modo, o percentual de extrativos encontrado está entre o já exposto na literatura.

A quantidade de lignina pode ser comparada com o percentual de 25,4% apresentado por Soares et al. (2017), enquanto a holocelulose (celulose + hemicelulose) foi superior ao reportado por Araújo et al. (2017), de $38,03 \pm 0,47\%$. Esse considerável percentual de carboidratos (~44,5%) demonstra que a casca do coco verde pode ser considerada uma fonte potencial de açúcares fermentescíveis para a produção de etanol 2G.

3.2 Hidrolisado de coco

A escolha do pré-tratamento deve ser baseada nas características da biomassa (CHEN et al., 2017). Estudos presentes na literatura demonstram a eficiência do uso de pré-tratamento

alcalino para a produção de hidrolisados de coco (GONÇALVES et al. 2014; ARAÚJO et al. 2017; SOARES et al. 2017). O hidrolisado obtido a partir do pré-tratamento com hidróxido de cálcio, seguido de hidrólise enzimática obteve as concentrações de $4,86 \pm 1,10 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e de $1,42 \pm 0,36 \text{ g L}^{-1}$ de xilose, não sendo detectada a presença do dissacarídeo celobiose. Como inibidores, foi observada a presença de ácido fórmico ($0,76 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$) e de ácido acético ($3,03 \pm 0,12 \text{ g L}^{-1}$). O ácido acético é gerado na desacetilação da hemicelulose (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; SOARES et al., 2016), enquanto o ácido fórmico é produzido através da degradação do furfural e do 5-hidroximetilfurfural (SOARES et al., 2017).

As concentrações de açúcares encontradas equivalem a uma taxa de conversão de 19,33% (m/m) da celulose em glicose e de 7,30% (m/m) da hemicelulose em xilose. Esse percentual de conversão da celulose é próximo ao de ~22% encontrado por Araújo et al. (2017), para a casca do coco, com um pré-tratamento alcalino com peróxido de hidrogênio, seguido de 72 h de hidrólise enzimática. A eficiente bioconversão da hemicelulose vem sendo estudada por sua extrema relevância para a viabilidade econômica do etanol 2G. A baixa conversão da hemicelulose em xilose apresentada no presente trabalho pode ter ocorrido devido ao fato da xilana, polímero hemicelulósico encontrado em maior quantidade na parede celular vegetal, ter sua composição química heterogênea e complexa, necessitando de várias enzimas, com diversas especificidades (MORAIS et al., 2020). A sacarificação da cadeia principal da hemicelulose, pelas endo- β -xilanasas, libera xilo-oligossacarídeos de variados graus de polimerização, que seriam hidrolisados em xilose pela β -xilosidase (NIU et al., 2019). Entretanto, a atividade enzimática da β -xilosidase é deficiente na maioria dos coquetéis enzimáticos comerciais. Isto faz com que a hidrólise da hemicelulose seja incompleta e ocasione o acúmulo de xilo-oligossacarídeos, que podem ainda reduzir a eficiência da celulase (XIN et al., 2015). De forma a otimizar a sacarificação enzimática, estudos presentes na literatura buscam a otimização dessa etapa por meio de processos de *screening* de microrganismos e fungos com celulasas e hemicelulasas de alta atividade enzimática (ALBUQUERQUE et al., 2016; ROBAK; BALCEREK, 2017, MORAIS et al., 2020), bem como através da adição de surfactantes, de proteínas e de polímeros (ARAÚJO et al., 2017; ROCHA-MARTÍN et al., 2017; GUO; CHANG; LEE, 2018).

3.3 Planejamento experimental

A produção de etanol, proveniente da fermentação microbiana, representa 80% da produção mundial de combustíveis renováveis (WALKER; WALKER, 2018; ELIODÓRIO et al., 2019).

Estima-se que para cada litro de etanol produzido são gastos em torno de 1,388 a 9,812 L de água doce (ZAKY et al., 2018). Com o intuito de reduzir a pegada hídrica do etanol, foi adicionado NaCl ao hidrolisado, de modo a testar a tolerância osmótica das leveduras estudadas. Os resultados obtidos para a produção de biomassa celular e para o percentual de açúcares redutores totais (ART) consumido estão expressos na Tabela 3. A concentração de ART inicial do hidrolisado (no tempo zero de fermentação) foi de 76,85 g L⁻¹, sendo esta utilizada para o cálculo da porcentagem consumida em cada ensaio.

A linhagem selvagem obteve maior concentração de biomassa celular em todas as condições analisadas. Essa cepa também se sobressaiu no consumo de ART, ficando atrás da PE-2 apenas no ensaio 5.

Tabela 3 – Produção de biomassa e percentual de ART consumido, após 48 h.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Produção de biomassa (g L ⁻¹)		ART Consumido (%)	
			PE-2	UFFS-CE-3.1.2	PE-2	UFFS-CE-3.1.2
1	3	20	0,76	1,41	24,40	37,03
2	7	20	4,04	8,85	62,50	65,94
3	3	40	0,70	1,33	24,64	39,36
4	7	40	4,64	9,81	58,86	76,48
5	5	30	0,76	3,17	45,06	42,18
6	5	30	0,73	3,44	50,64	81,14
7	5	30	0,78	3,24	39,57	52,65

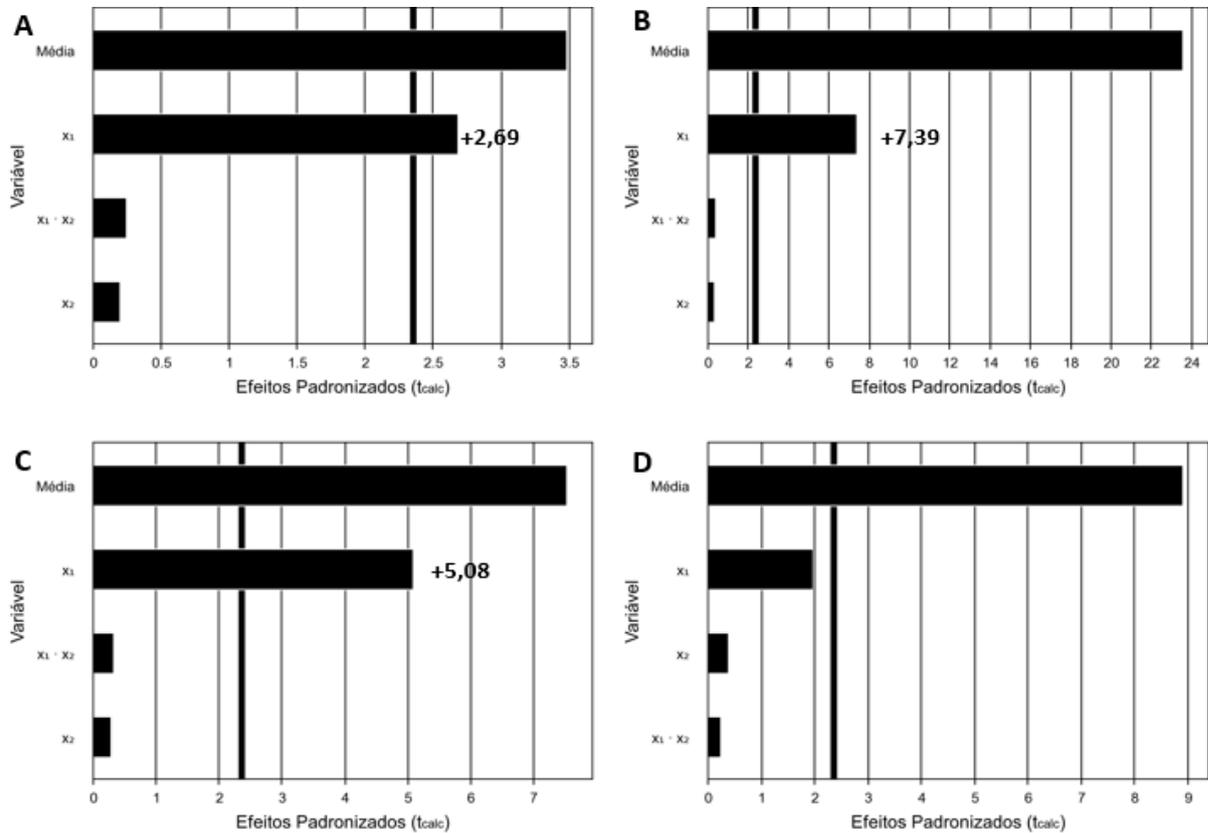
Através da análise dos dados obtidos é possível observar a influência do pH para ambas as linhagens. Quando essa variável está no nível superior, há maior produção de biomassa. Isso se comprova através da análise dos gráficos de Pareto (Figura 1). Com o nível de significância de $\alpha = 10\%$, o pH é uma variável significativa para a produção de biomassa e para o consumo de açúcares para a cepa PE-2, enquanto que para a UFFS-CE-3.1.2, apenas exerce influência significativa para a produção de biomassa. O estudo realizado por Bonatto et al. (2020) observou que fermentações com pH 7 favoreciam o consumo de glicose e de xilose pela a levedura UFFS-CE-3.1.2, elevando também a produção de etanol. Além disso, um pH mais alcalino auxilia na redução dos efeitos inibitórios do ácido acético. De acordo com os autores, esse inibidor, em pH mais baixo, tem sua forma não dissociada facilmente difundida para o interior da célula. Em consequência da diferença de pH, ocorre a dissociação do ácido acético para sua forma iônica, acarretando a liberação de prótons e a diminuição do pH citosólico. A

acidificação do citoplasma danifica a célula, refletindo diretamente no rendimento de etanol. Enquanto que em pH mais elevado, o ácido acético já se encontra em sua forma dissociada, tendo mais dificuldade em transpassar a membrana plasmática.

A variável temperatura não se mostrou significativa (Figura 1). Entretanto, as melhores condições para a produção de biomassa de ambas as cepas, ocorrem em temperaturas mais elevadas. Ainda, para a levedura selvagem, a elevação dessa variável acarreta o aumento do consumo de ART. Apesar de não ser uma variável significativa para o modelo, a otimização da variável temperatura é crucial, devido a sua influência direta na conversão de açúcares em etanol (RIVERA et al. 2017), além de afetar diretamente o metabolismo celular (ELIODÓRIO et al., 2019). Normalmente, a temperatura ótima para leveduras se encontra abaixo de 35 °C (ROBAK; BALCEREK, 2018). Entretanto, as espécies dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* são conhecidas por apresentarem crescimento celular acima de 40 °C (BABIKER et al., 2010). A linhagem *Kluyveromyces maxianus* CICC 1727-5, por exemplo, demonstrou-se capaz de produzir maiores concentrações de etanol, a partir da glicose, a 40 °C (DU et al., 2019). Entretanto, a maior produção de etanol dessa cepa, utilizando a xilose como substrato, ocorreu em temperaturas inferiores. Altas temperaturas de fermentação são desejáveis para a produção de etanol, por evitarem a contaminação bacteriana do mosto (ELIODÓRIO et al., 2019). Além disso, a busca por leveduras termotolerantes pode, também, possibilitar o aumento da eficiência em processos de sacarificação e fermentação simultânea (SSF), excluindo a necessidade de um sistema de resfriamento e, por consequência, a economia de recursos energéticos (KHATUN et al., 2017).

Diante do exposto, a condição adotada para as cinéticas de fermentação para as duas cepas foi a mesma do ensaio 4: pH 7 e temperatura de 40 °C. A escolha do pH foi baseada na preferência das células das leveduras apontadas na Figura 1. Enquanto que a opção por uma temperatura mais elevada levou em conta sua relevância para a produção de etanol lignocelulósico.

Figura 1 – Gráficos de Pareto para a biomassa celular (A e C) e percentual de ART consumido (B e D), para as linhagens PE-2 (A e B) e UFFS-CE-3.1.2 (C e D), considerando um nível de significância de 10%. No gráfico: x1 = pH e x2 = Temperatura.



3.4 Cinéticas de fermentação

A cepa industrial PE-2 é amplamente estudada por sua adaptabilidade às condições industriais, apresentando maior tolerância ao estresse e grande desempenho fermentativo (BASSO et al., 2008; SILVA et al., 2018; ELIODÓRIO et al., 2019). Entretanto, essa linhagem é incapaz de fermentar a xilose (LOPES et al., 2017), como pode ser comprovado na Figura 2A. Apesar da presença de inibidores e de NaCl, a cepa industrial foi capaz de produzir etanol, a partir da fermentação da glicose. A maior produção de etanol ($4,45 \text{ g L}^{-1}$) ocorreu com 26 h de ensaio, alcançando um rendimento de etanol de $0,24 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{açúcar}}^{-1}$, uma produtividade de $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e 37,89% de eficiência fermentativa. Gonçalves et al. (2016) utilizaram como biomassa a fibra do coco maduro e para a mesma cepa, através de um processo de SSF, obtiveram a produtividade de etanol de $0,30 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e uma eficiência fermentativa de $85,31 \pm 1,17\%$ em relação ao rendimento máximo teórico de etanol. Essa diferença entre os

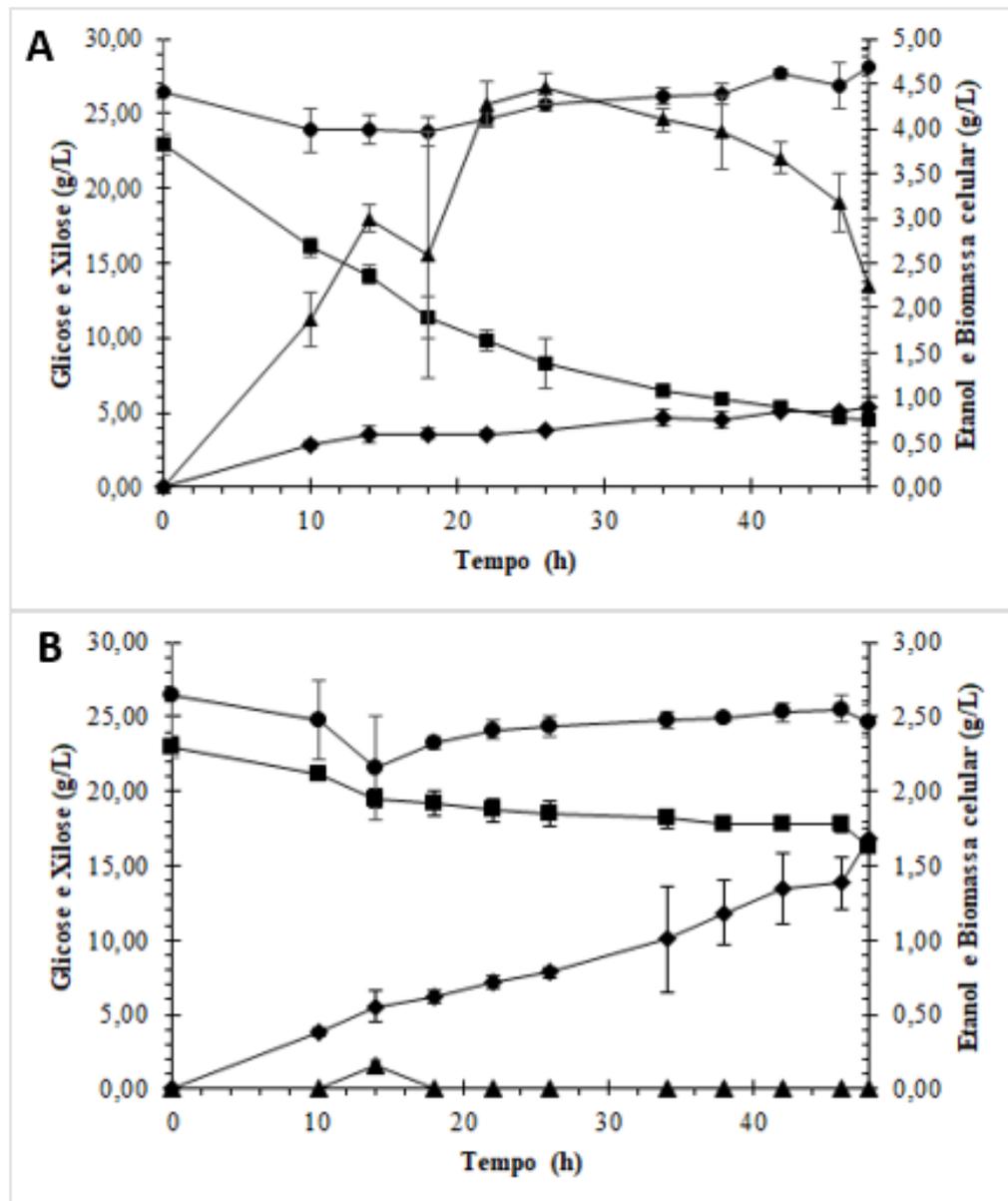
resultados pode demonstrar o efeito negativo do NaCl para a levedura industrial. Ressalta-se então a relevância da busca de leveduras selvagens que apresentem tolerância osmótica, para garantir a diminuição da pegada hídrica do processo. De fato, Zaky e colaboradores (2018) observaram que leveduras marinhas podem apresentar desempenho igual ou superior ao de linhagens industriais terrestres, em condições de alto estresse osmótico. Nesse estudo, os autores constataram que a levedura marinha *S. cerevisiae* AZ65 é uma cepa halotolerante e osmotolerante, com excelente capacidade fermentativa, em meio produzido com água do mar, se comparada com a cepa industrial *S. cerevisiae* NCYC2592.

O estudo realizado por Bazoti et al. (2017) demonstrou que a cepa UFFS-CE-3.1.2 é capaz de metabolizar a xilose e de produzir etanol, mesmo na presença de inibidores. Entretanto, para o presente estudo, essa linhagem não apresentou consumo significativo dos açúcares analisados, como também não produziu etanol de forma satisfatória. Observa-se também que mesmo consumindo minimamente a glicose e a xilose, a levedura apresentou maior produção de biomassa do que a cepa PE-2. Isso pode indicar a presença de outras fontes de carbono não analisadas, presentes no hidrolisado de coco, o que é comprovado pela concentração de ART inicial do hidrolisado ($76,85 \text{ g L}^{-1}$). Soares et al. (2017) demonstraram a presença de açúcares como a manose e a arabinose em hidrolisados de coco. Ainda, conforme descrito no item 3.2, de acordo com a matéria-prima e o coquetel enzimático utilizado, alguns produtos da hidrólise enzimática das xilanas podem permanecer como oligossacarídeos (ZHANG; VIKARI, 2012; KOYAMA et al., 2014). De acordo com Qing e Wyman (2011), a sacarificação completa dos xilo-oligossacarídeos, em um período típico de 72 h, utilizando apenas doses moderadas de enzimas comerciais, sem que haja a suplementação com β -xilosidase, é um processo árduo. Considerando o tempo de residência utilizado no estudo (24 h) e o uso de um coquetel de hemicelulases comercial, há a possibilidade do acúmulo de xilo-oligossacarídeos, que poderiam ter sido consumidos pela cepa selvagem. Esses compostos podem explicar a concentração inicial de ART observada no hidrolisado. No entanto, a detecção e a separação desses compostos necessitam de outros meios de análise cromatográfica, como a cromatografia de alta performance de troca aniônica acoplada à detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), conforme descrito por Coulier et al. (2013).

A presença de inibidores foi também um fator limitante para o desempenho das leveduras. Estudos demonstram que concentrações de ácido acético entre $2,0\text{-}5,0 \text{ g L}^{-1}$ podem inibir seriamente a maioria dos microrganismos fermentadores de xilose (SENATHAM et al., 2016; DU et al., 2019). Por sua vez, o ácido fórmico, tipicamente presente em menor concentração

em hidrolisados lignocelulósicos, apresenta maior toxicidade do que a do ácido acético (HASUNUMA; SAKAMOTO; KONDO, 2016). A presença desses ácidos fracos afeta negativamente o crescimento e o metabolismo dos microrganismos, em especial o metabolismo da xilose, fazendo com que haja a redução das concentrações de etanol produzido (HASUNUMA et al., 2011). Para que esse desafio fosse superado, Hasunuma, Sakamoto e Kondo (2016) demonstram que aclimação de curto prazo das leveduras a esses ácidos, durante o pré-cultivo, pode melhorar significativamente a fermentação da xilose. Esse processo permite aumentar a tolerância aos inibidores por meio da engenharia metabólica, baseada em uma resposta ao curto período de estresse.

Figura 2 – Cinéticas de fermentação para as linhagens PE-02 (A) e UFFS-CE-3.1.2 (B) e as de concentrações de glicose (■), de xilose (●), de biomassa celular (◆) e de etanol (▲).



4 CONCLUSÃO

A casca do coco é uma potencial matéria-prima para a produção de etanol 2G, devido ao seu alto percentual de holocelulose que pode ser convertido em açúcares fermentáveis. Para melhor aproveitamento dessa biomassa, faz-se necessária a otimização dos processos de pré-tratamento e de hidrólise enzimática, de modo a alcançar maiores concentrações de açúcares fermentescíveis e menores concentrações de inibidores. A levedura selvagem UFFS-CE-3.1.2, apesar de não produzir etanol nas condições impostas, apresentou alto consumo de ART e maior produção de biomassa, mesmo sem consumir a glicose e a xilose de forma significativa. Deste modo, ressalta-se a necessidade de novos estudos, para avaliar e quantificar a presença de xilo-oligossacarídeos no hidrolisado de coco. Ainda, por se tratar de uma levedura isolada em madeira apodrecendo é crucial avaliar a capacidade dessa cepa de produzir xilanases, para melhor aplicabilidade em processos biotecnológicos.

5 REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, E.D.; TORRES, F.A.G.; FERNANDES, A.A.R.; FERNANDES, P.M.B. (2016) Combined effects of high hydrostatic pressure and specific fungal cellulase improve coconut husk hydrolysis. *Process Biochemistry*, 51: 1767-1775.
- ARAÚJO, C.K.C.; CAMPOS, A.O.; PADILHA, C.E.A.; SOUSA JÚNIOR, F.C.; NASCIMENTO, R.J.A.; MACEDO, G.R.; SANTOS, E.S. (2017) Enhancing enzymatic hydrolysis of coconut husk through *Pseudomonas aeruginosa* AP 029/GILVIA rhamnolipid preparation. *Bioresource Technology*, 237: 20-26.
- ÁVILA, P.F.; MARCUS, B.S.; GOLDBECK, R. (2018) Evaluation of the chemical composition of a mixture of sugarcane bagasse and their effects on commercial enzyme combination for the production of fermentable sugar. *Biomass and Bioenergy*, 116: 180-188.
- BARRILLI, E.T.; TADIOTO, V.; MILANI, M.L.; DEOTI, J.R.; FOGOLARI, O.; MÜLLER, C.; BARROS, K.A.; ROSA, C.A.; SANTOS, A.A.; STAMBUK, B.U.; TREICHEL, H.; ALVES, S.L. (2020) Biochemical analysis of cellobiose catabolism in *Candida pseudointermedia* strains isolated from rotten wood. *Archives of Microbiology*, 202: 1729-1739.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; DE OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res*, 8: 1155-1163.
- BAZOTI, S.F.; GOLUNSKI, S.; SIQUEIRA, D. P.; SCAPINI, T.; BARRILLI, E. T.; MAYER, D. A.; BARROS, K.O.; ROSA, C.A.; STAMBUK, B.U., ALVES Jr., S.L.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. (2017) Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. *Bioresource Technology*, 244: 582-587.
- BHUTTO, A.W.; QURESHI, K.; HARIJAN, K.; ABRO, R.; ABBAS, T.; BAZMI, A.A.; KARIM, S.; YU, G. (2017) Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Energy*, 122: 724-745.

- BONATTO, C.; VENTURIN, B.; MAYER, D.A.; BAZOTI, S.F.; OLIVEIRA, D.; ALVES Jr., S.L.; TREICHEL, H. (2020) Experimental data and modelling of 2G ethanol production by *Wickerhamomyces* sp. UFFS-CE-3.1.2. *Renewable Energy*, 145: 2445-2450.
- CHEN, W.C.; LIN, Y.C.; CIOU, Y.L.; CHU, I.M.; TSAI, S.L.; LAN, J.C.W.; CHANG, Y.K.; WEI, Y.H. (2017) Producing bioethanol from pretreated-wood dust by simultaneous saccharification and co-fermentation process. *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 79: 43-48.
- COULIER, L.; ZHA, Y.; BAS, R.; PUNT, P.J. (2013) Analysis of oligosaccharides in lignocellulosic biomass hydrolysates by high-performance anion-exchange chromatography coupled with mass spectrometry (HPAEC-MS). *Bioresource Technology*, 133: 221-231.
- DU, C.; LI, Y.; ZHAO, X.; YUAN, W.; BAI, F.; JIANG, Y. (2019) The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora passalidarum* ATCC MYA-4345. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103: 2845-2855.
- ELIODÓRIO, K.P.; CUNHA, G.C.G.; MÜLLER, C.; LUCARONI, A.C.; GIUDICI, R.; WALKER, G.M., ALVES Jr.; S.L.; BASSO, T.O. (2019) Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. In: *Advances in Applied Microbiology*, edited by GADD, G. M.; SARIASLANI, S. *in press*: Elsevier Inc.: Cambridge.
- FAO. Food and Agriculture Data. (2020) Crops. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- GONÇALVES, F.A.; RUIZ, H.A.; SANTOS, E.S.; TEIXEIRA, J.A.; MACEDO, G.R. (2015) Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 77: 1,12.
- GONÇALVES, F.A.; RUIZ, H.A.; NOGUEIRA, C.C.; SANTOS, E.S.; TEIXEIRA, J.A.; MACEDO, G.R. (2014) Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. *Fuel*, 131: 66-76.
- GONÇALVES, F.A.; RUIZ, H.A.; SANTOS, E.S.; TEIXEIRA, J.A.; MACEDO, G.R. (2016) Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* from delignified coconut fibre mature and lignin extraction according to biorefinery concept. *Renewable Energy*, 94: 353-365.
- GUO, H.; CHANG, Y.; LEE, D. (2018) Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses. *Bioresource Technology*, 252: 198-215.
- HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, A.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. (2005) Preparation of Samples for Compositional Analysis. National Renewable Energy Laboratory (NREL): 1-12.
- HASUNUMA, T.; SAKAMOTO, T.; KONDO, A. (2016) Inverse metabolic engineering based on transient acclimation of yeast improves acid-containing xylose fermentation and tolerance to formic and acetic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100: 1027-1038.

- HASUNUMA, T.; SANDA, T.; YAMADA, R.; YOSHIMURA, K.; ISHII, J.; KONDO, A. (2011) Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 10: 1-13.
- HUANG, H.; GUO, X.; LI, D.; LIU, M.; WU, J.; REN, H. (2011) Identification of crucial yeast inhibitors in bio-ethanol and improvement of fermentation at high pH and high total solids. *Bioresource Technology*, 102: 7486-7493.
- HYMAN, D.; SLUITER, A.; CROCKER, D.; JOHNSON, D.; SLUITER, J.; BLACK, S.; SCARLATA, C. (2007) Determination of acid soluble lignin concentration curve by UV-Vis Spectroscopy. National Renewable Energy Laboratory (NREL): 1-13.
- JÖNSSON, L.J.; MARTÍN, C. (2016) Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199: 103-112.
- KHATUN, M.M.; YUM X.; KONDO, A.; BAI, F.; ZHAO, X. (2017) Improved ethanol production at high temperature by consolidated bioprocessing using *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered with artificial zinc finger protein. *Bioresource Technology*, 245: 1447-1454.
- LEE, S.; JELLISON, T.; ALPER, H.S. (2016) Bioprospecting and evolving alternative xylose and arabinose pathway enzymes for use in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5: 2487-98.
- LOPES, D.D.; ROSA, C.A.; HECTOR, R.E.; DIEN, B.S.; MERTENS, J.A.; AYUB, M.A.Z. (2017) Influence of genetic background of engineered xylose-fermenting industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44: 1575-1588.
- MORAIS, C. G.; SENA, L.M.F.; LOPES, M.R.; SANTOS, A.R.O.; BARROS, K.O.; ALVES, C.R.; UETANABARO; A.P.T.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. (2020) Production of ethanol and xylanolytic enzymes by yeasts inhabiting rotting wood isolated in sugarcane bagasse hydrolysate. *Fungal Biology*, 124: 639-647.
- MUPONDWA, E.; LI, X.; TABIL, L.; SOKHANSANJ, S.; ADAPA, P. (2017) Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part II: Hydrolysis and fermentation technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79: 1535-1555.
- NIU, Y.; WU, L.; SHEN, Y.; ZHAO, J.; ZHANG, J.; YI, Y.; LI, H.; BAO, X. (2019) Coexpression of β -xylosidase and xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* improves the efficiency of saccharification and fermentation from xylo-oligosaccharides. *Cellulose*, 26: 7923-7937.
- NOGUEIRA, C.C.; PADILHA, C.E.A.; LEITÃO, A.L.S.; ROCHA, P.M.; MACEDO, G.R.; SANTOS, E.S. (2018) Enhancing enzymatic hydrolysis of green coconut fiber – Pretreatment assisted by tween 80 and water effect on the post-washing. *Industrial Crops & Products*, 112: 734-740.
- QING, Q.; WYMAN, C.E. (2011) Supplementation with xylanase and β -xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. *Biotechnology for Biofuels*, 4: 1-12.

- RABELO, S.C.; FONSECA, N.A.A; ANDRADE, R.R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA; A.C. (2011) Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass & Bioenergy*, 35: 2600-2607.
- RFA - Renewable Fuels Association (2021) Essential Energy: Ethanol industry outlook. Disponível em: <https://ethanolrfa.org/publications/outlook/>
- RIVERA, E.C.; YAMAKAWA, C.K.; SAAD, M.B.W.; ATALA, D.I.P; AMBROSIO, W.B.; BONOMI, A.; NOLASCO, J.; ROSSEL, C.E.V. (2017) Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modelling and validation under very-high-gravity fermentation conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 119: 42-51.
- ROCHA-MARTÍN, J.; MARTINEZ-BERNAL, C.; PÉREZ-COBAS, Y.; REYES-SOSA, F.M.; GARCÍA, B.D. (2017) Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 244: 48-56.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. (2014) Experimental design and process optimization. CRC Press: Boca Raton, F.L.
- ROMERO-FRASCA, E.; VELASQUEZ-ORTA, S.B.; ESCOBAR-SÁNCHEZ, V.; TINOCO-VALENCIA, R.; LADESMA, M.T.O. (2021) Bioprospecting of wild type ethanologenic yeast for ethanol fuel production from wastewater-grown microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 14: 1-10.
- RULLI, M.C.; BELLOMI, D.; CAZZOLI, A.; CAROLIS, G.; D'ORICO, P. (2006) The water-land-food nexus of first-generation biofuels. *Scientific Reports*, 6: 1-10.
- SANTOS, A.A.; DEOTI, J.R.; MÜLLER, G.; DÁRIO, M.G.; STAMBUK, B.U.; ALVES Jr., S.L. (2017) Dosagem de açúcares redutores com o reativo DNS em microplaca. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20: e2015113.
- SENATHAM, S.; CHAMDUANG, T.; KAEWCHINGDUANG, Y.; THAMMASITTIRONG, A.; SRISODSUK, M.; ELLISTON, A.; ROBERTS, I.N.; WALDRON, K.W.; THAMMASITTIRONG; S.N. (2016) Enhanced xylose fermentation and hydrolysate inhibitor tolerance for efficient ethanol production from non-detoxified lignocellulosic hydrolysate. *Springer Plus*, 5:1040.
- SILVA, P.C.; DOMINGUES, L.; COLLINS, T.; OLIVEIRA, R.; JOHANSSON, B. (2018) Quantitative assessment of DNA damage in the industrial ethanol production strain *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *FEMS Yeast Research*, 18: 1-7.
- SINGH, S.; CHENG, G.; SATHITSUKSANO, N.; WU, D.; VARANASI, P.; GEORGE, A.; BALAN, V.; GAO, X.; KUMAR, R.; DALE, B.E.; WYMAN, C.E.; SIMMONS, B.A. (2015) Comparison of different biomass pretreatment techniques and their impact on chemistry and structure. *Frontiers in Energy Research*, 2: 1-12.
- SINGH, Y.D.; MAHANTA, P.; BORA, U. (2017) Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass through proximate, ultimate and compositional analysis for bioenergy. *Renewable Energy*, 103: 490-500.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. (2005) Determination of total solids in biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), a: 1-6.

- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. (2005) Determination of ash in biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), b: 1-8.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. (2005) Determination of structural carbohydrates and lignina in biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), d: 1-18.
- SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. (2005) Determination of extractive in biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL), c: 1-6.
- SOARES, J.; DEMEKE, M.M.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; VELDE, M.V.; VERPLAETSE, A.; FERNANDES, A.A.R.; THEVELEIN, J.M.; FERNANDES, P.M.B (2016) Green coconut mesocarp pretreated by an alkaline process as raw material for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 216: 744-753.
- SOARES, J.; DEMEKE, M.M.; VELDE, M.V.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; KERSTENS, D.; SELS, B.F.; VERPLAETSE, A.; FERNANDES, A.R.; THEVELEIN, J.M.; FERNANES, P.M.B (2017) Fed-batch production of green coconut hydrolysates for high-gravity second-generation bioethanol fermentation with cellulosic yeast. *Bioresource Technology*, 244: 234-242.
- TEMPLETON, D.; EHRMAN, T. (1995) Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL): 1-4.
- VELÁZQUEZ-MARTÍ, B.; GAIBOR-CHÁZVEZ; NIÑO-RUIZ, Z.; NARBONA-SAHUQUILLO, S. (2018) Complete characterization of pruning waste from lechero tree (*Euphorbia laurifolia* L.) as raw material for biofuel. *Renewable Energy*, 129: 629-637.
- WALKER, G.M.; WALKER, R.S. (2018) Enhancing yeast alcoholic fermentation. In: *Advances in Applied Microbiology*, edited by GADD, G. M.; SARIASLANI, S. *in press*: Elsevier Inc.: Cambridge.
- XIN, D.; SUN, Z.; VIKARIN, L.; ZHANG, J. (2015) Role of hemicellulases in production of fermentable sugars from corn stover. *Industrial Crops and Products*, 74: 209-217.
- ZAKY, A.S.; GREETHAM, D.; TUCKER, G.A.; DU, C. (2018) The establishment of a marine focused biorefinery for bioethanol production using seawater and a novel marine yeast strain. *Sci Rep.* 8: 12127.
- ZHANG, J.; VIKARI, L. (2012) Xylo-oligosaccharides are competitive inhibitors of cellobiohydrolase I from *Thermoascus aurantiacus*. *Bioresource Technology*, 117: 286-291.