

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 15/07/2021.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LEVEDURAS
FERMENTADORAS DE PENTOSE NA PRODUÇÃO DE
ETANOL 2G, A PARTIR DE BAGAÇO DE SORGO**

Aline Ferreira Silva

Bióloga

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LEVEDURAS
FERMENTADORAS DE PENTOSE NA PRODUÇÃO DE
ETANOL 2G, A PARTIR DE BAGAÇO DE SORGO**

Aline Ferreira Silva

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

2019

S586a Silva, Aline Ferreira
Avaliação do potencial de leveduras fermentadoras de pentoses na produção de etanol 2G, a partir de bagaço de sorgo / Aline Ferreira Silva. -- Jaboticabal, 2019
90 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Marcia Justino Rossini Mutton

1. Bioenergia. 2. Explosão à vapor. 3. Pichia membranifaciens. 4. Pichia kudriavzevii. 5. Pré-tratamento. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



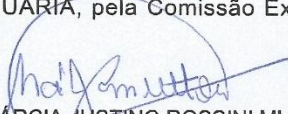
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE PENTOSE NA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G, A PARTIR DE BAGAÇO DE SORGO

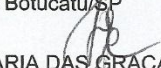
AUTORA: ALINE FERREIRA SILVA

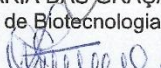
ORIENTADORA: MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

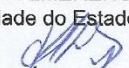
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof.ª Dr.ª MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON
Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. SARITA CANDIDA RABELO
FCA-UNESP / Botucatu/SP


Profa. Dra. MARIA DAS GRAÇAS DE ALMEIDA FELIPE
Departamento de Biotecnologia-EEL/USP / Lorena/SP


Profa. Dra. OSANIA EMERENCIANO FERREIRA
UEMG / Universidade do Estado de Minas Gerais - Frutal/MG


Pesquisadora Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER
Centro de Citricultura / IAC / Instituto Agrônomo de Campinas - Cordeirópolis/SP

Jaboticabal, 15 de julho de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ALINE FERREIRA SILVA – Nascida aos 10 de julho de 1988, na cidade de Porecatu, estado do Paraná. Iniciou sua Graduação em Ciências Biológicas em março de 2008 na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal (FCAV-UNESP) concluindo seu bacharelado em janeiro de 2012 e licenciatura em dezembro de 2013. Durante a graduação, estagiou e foi bolsista de iniciação científica do programa PIBIC/Cnpq. A partir de março de 2012 passou a integrar os grupos de pesquisa “Processos Biotecnológicos Aplicados à Agroindústria” e “Fisiologia e Manejo Sustentável da Cana-de-açúcar”, participando de diversos projetos. Em agosto de 2012 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, a nível de mestrado, da FCAV- UNESP Jaboticabal, SP, sob a orientação da Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, como bolsista Capes, realizando seu projeto de pesquisa intitulado “Influência do desponte de panículas de sorgo sacarino sobre a qualidade da matéria-prima e produção de bioetanol”, obtendo o título de Mestre em Microbiologia Agropecuária em dezembro de 2014. Em agosto de 2015, ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, a nível de Doutorado, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP), no Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Álcool e Microbiologia das Fermentações (Departamento de Tecnologia). No período de agosto de 2017 a fevereiro de 2018 realizou estágio pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) na Universidade de Lund, Lund - Suécia, com bolsa CAPES. Realizou seu projeto de doutorado em conjunto com ambas as universidades, logrando o título de doutora em Microbiologia Agropecuária em julho de 2019.

Epígrafe

O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.

- *Cora Coralina*

Aos meus pais, Rose e Edimilson, exemplos da minha vida, pelo amor infinito, suporte emocional, por acreditarem em mim e nunca medirem esforços para a realização dos meus sonhos. Vocês me ensinaram as lições de vida mais importantes e estarão sempre presentes no meu coração. Amo vocês!

Ao meu irmão, Giovanni, meu companheiro, pelo amor, amizade, carinho, e por estar presente na minha vida em todos os momentos. Eu te amo!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu o privilégio de nascer e viver entre pessoas sensacionais que são o alicerce desta conquista;

Aos meus pais, irmão e demais familiares pelo carinho, incentivo, credibilidade e compreensão nas horas mais difíceis;

À prof. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, orientadora desta tese, pela confiança em meu trabalho, pela acolhida, por todo o conhecimento transferido, pela sabedoria e amizade;

Ao Prof. Dr. Mats Galbe, pela generosidade, estímulo, paciência e por me aceitar e integrar em seu grupo de forma tão acolhedora.

Ao Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton pelos ensinamentos, generosidade e todo auxílio nos momentos de dificuldades.

Aos membros da banca examinadora pela participação e considerações que foram de grande valia para este trabalho;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Microbiologia Agropecuária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) pela oportunidade de realização do curso e aprimoramento profissional;

A todos que fizeram parte do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool ao longo de minha caminhada, pelos bons momentos de aprendizado, alegrias, de muito trabalho e por toda colaboração e amizade, em especial aos amigos que me acompanharam nestes últimos anos do doutorado Calisto, Cristhyane, Franciele, Letícia, Lidyane, Natália, Sérgio e Vitor;

A todos integrantes do grupo de etanol do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Lund pela acolhida, em especial aos amigos Miguel Sanchis e Pia-Maria Bondesson por toda ajuda, ensinamentos e suporte nos experimentos.

As amigas da Suécia Hanna, Josiane, Lilla e Margaréta que foram essenciais para a superação das saudades de casa e pelos bons momentos vividos, que serão para sempre lembrados.

Aos Sennström, minha família sueca postíça, Katarina, Johan e Elin, por terem me concedido um lar em Lund, por todos os ensinamentos sobre a cultura sueca, e por sempre me tratarem com muito carinho.

A minha família de Estocolmo, tio César, Maria, Olivia e Lovisa, por terem sido minha base e porto seguro durante minha estadia na Suécia.

Aos meus amigos Camila, Gabriela, Luriany, Nayara, Raíssa, Ro e Vitor, por toda a amizade, alegrias e tristezas compartilhadas, e por serem aqueles que eu posso confiar sempre.

Aos funcionários da fazenda experimental da UNESP

A todos os funcionários da seção de pós-graduação;

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a concretização desse estudo;

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Biocombustíveis	3
2.2. Matérias-primas: Sorgo Sacarino e Sorgo Biomassa	5
2.3. Biomassas lignocelulósicas	8
2.3.1. Estrutura química e morfologia.....	9
2.4. Produção de etanol de biomassas lignocelulósicas	13
2.5. Pré-tratamento	14
2.5.1. Explosão à vapor.....	15
2.5.2. Mecanismo do pré-tratamento à vapor.....	16
2.5.3. Inibidores.....	17
2.6. Hidrólise Enzimática	19
2.7. Microrganismos fermentadores	20
2.7.1. Leveduras.....	21
2.8. Fermentação	23
2.8.1. Fermentação de Hexoses e Pentoses.....	24
2.9. Termotolerância	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29

3.1. Instalação e condução do ensaio	29
3.2. Matérias-primas.....	30
3.3. Microrganismos	31
3.3.1. Identificação molecular da levedura isolada.....	31
3.4. Caracterização da composição química dos bagaços	32
3.5. Pré-tratamento de explosão à vapor catalisado por ácido.....	36
3.6. Hidrólise Enzimática	38
3.7. Cultivo em diferentes condições adaptativas.	39
3.8. Testes fermentativos para avaliação dos meios de cultivo.....	40
3.9. Fermentação em biorreatores	41
3.10. Procedimentos analíticos	41
3.11. Cálculos de rendimentos	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. Identificação molecular da levedura isolada.....	44
4.2. Caracterização da composição química dos bagaços	45
4.3. Pré-tratamento de explosão à vapor catalisado por ácido.....	48
4.4. Hidrólise Enzimática	50
4.5. Testes fermentativos para avaliação dos meios de cultivo.....	51
4.6. Fermentação em biorreatores	65
5. CONCLUSÕES	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE PENTOSE NA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G, A PARTIR DE BAGAÇO DE SORGO

RESUMO - A utilização de biomassa lignocelulósica para produzir biocombustíveis, como o etanol, pode fornecer uma alternativa sustentável aos combustíveis fósseis. Os bagaços de sorgo sacarino e sorgo biomassa são considerados matérias-primas lignocelulósicas potenciais para a produção de etanol por meio de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação. Um dos entraves do processo é a utilização de microrganismos capazes de metabolizar pentoses e fermentarem em altas temperaturas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar as condições de adaptação e o desempenho fermentativo das estirpes de leveduras (LJ04 e *Pichia kudriavzevii* LJ03), em temperaturas de 37°C e 40°C, para produção de etanol de segunda geração, a partir de hidrolisados de bagaço de sorgo sacarino (Malibu J53 e Malibu A1001) e sorgo biomassa (Palo Alto) pré-tratados com explosão à vapor catalisada com ácido. Os bagaços dos genótipos foram avaliados quanto a composição química e rendimentos dos açúcares recuperáveis. Testes fermentativos foram realizadas com as leveduras *Pichia kudriavzevii* LJ03 e LJ04, nas temperaturas de 37°C e 40°C para avaliar três meios de cultivo com diferentes teores de hidrolisado (Meio 1 – 0%; Meio 2 – 33%; Meio 3 - 50%) durante 120 horas de fermentação. A partir do melhor meio de cultivo, fermentações em biorreatores foram realizadas com as condições estabelecidas, em 96 horas de fermentação. Os resultados evidenciaram a eficiência do pré-tratamento e da hidrólise enzimática possibilitando a recuperação dos açúcares para os bagaços de sorgo. A cepa LJ04 foi classificada como *Pichia membranifaciens* LJ04. O melhor meio de cultivo foi o enriquecido com 33% de hidrolisado na composição. As leveduras foram eficientes no desdobramento de pentoses e hexoses, resultando em rendimentos de 40,0% (*P. membranifaciens* em 37°C), 38,4% (*P. membranifaciens* em 40°C), 26,5% (*P. kudriavzevii* em 37°C) e 30% (*P. kudriavzevii* em 40°C). Ambas as leveduras apresentaram habilidade de termotolerância sob temperaturas de 37- 40°C.

Palavras-Chave: Bioenergia, Explosão à vapor, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kudriavzevii*, Pré-tratamento.

EVALUATION OF PENTOSE-FERMENTING YEASTS POTENTIAL IN ETHANOL 2G PRODUCTION FROM SORGHUM BAGASSE

ABSTRACT - Lignocellulosic biomass to produce biofuels such as ethanol may provide a sustainable alternative to fossil fuels. Sweet sorghum bagasse is considered a potential lignocellulosic raw material for the production of fuel ethanol by means of pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation. One of the difficult to the process is the use of microorganisms capable of metabolizing pentoses and fermenting at high temperatures. In this context, this work aimed to evaluate the adaptation conditions and fermentative performance of two yeast strains (LJ04 and *Pichia kudriavzevii* LJ03), at temperatures of 37° and 40°C, for production of second generation ethanol from hydrolysates of Sweet sorghum bagasse (Malibu J53 and Malibu A1001) and Sorghum biomass (Palo Alto) pretreated with acid catalyzed steam explosion. Bagasse from those genotypes was evaluated for chemical composition and recoverable sugar yields. Fermentation tests were performed with *Pichia kudriavzevii* LJ03 and LJ04 yeast strain at 37°C and 40°C to evaluate three culture media with different hydrolyzed liquor contents (Medium 1 - 0%; Medium 2 - 33%; Medium 3 - 50%) during 120 hours of fermentation. After that, the best culture medium was chosen, fermentation in bioreactors were performed under the established conditions, in 96 hours of fermentation. The results showed the efficiency of pretreatment and enzymatic hydrolysis and the recovery of sugars without the formation of inhibitors. Strain LJ04 was classified as *Pichia membranifaciens* LJ04. The best culture medium was enriched with 33% of the volume of hydrolyzate in the composition. Yeasts were efficient in the consumption of pentoses and hexoses, resulting in yields of 40.0% (*P. membranifaciens* at 37°C), 38.4% (*P. membranifaciens* at 40°C), 26.5% (*P. kudriavzevii* at 37°C). and 30% (*P. kudriavzevii* at 40 ° C). Both yeasts are thermotolerant in fermentation with 37-40°C.

Keywords: Bioenergy, Steam Explosion, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kudriavzevii* Pretreatment.

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes de energia renováveis e economicamente viáveis estimulou o desenvolvimento de pesquisas tecnológicas para encontrar alternativas ao uso de combustíveis fósseis. O etanol é o biocombustível produzido a partir de biomassas, limpo, renovável e ambientalmente correto, que garantem a sustentabilidade do processo.

No Brasil, além da cana-de-açúcar e do milho, o sorgo *Sorghum bicolor* (L.) Moench é uma das culturas energéticas alternativas para a produção industrial de etanol, sendo a biomassa atrativa para a produção de biocombustível devido à adaptabilidade às condições ambientais adversas e período de crescimento de 3-4 meses. Deve-se considerar ainda além o alto teor de açúcares fermentescíveis em seus colmos e rendimento de biomassa verde, que torna esta cultura adequada para a produção sustentável de biocombustíveis. O resíduo após extração do caldo do sorgo é o bagaço, material lignocelulósico que pode ser hidrolisado em açúcar e fermentado em etanol de segunda geração, conhecido como etanol 2G.

As matérias-primas lignocelulósicas oferecem vantagens de reutilização, abundância e baixo custo. Constituída principalmente por lignina, celulose e hemicelulose, estas biomassas são materiais recalcitrantes e oferecem um problema desafiador quando se trata de conversão para açúcares fermentescíveis. Para a utilização de materiais lignocelulósicos, o processo de conversão envolve a etapa de pré-tratamento para quebrar a estrutura complexa de lignocelulose, para reduzir o teor de lignina, cristalinidade da celulose e aumentar a área de superfície para reações enzimáticas. Este processo deve ser seguido de uma hidrólise enzimática e fermentação (Nielsen et al., 2017).

A hidrólise da celulose produz hexoses (C6), a hidrólise das hemiceluloses produz glicose e pentoses (C5), cuja levedura de uso industrial *Saccharomyces cerevisiae* é incapaz de fermentar. O desempenho da fermentação depende da tolerância do microrganismo fermentador à temperatura, aos inibidores e da sua capacidade para converter eficientemente uma variedade de substratos à etanol, como as pentoses (Robak e Balcerek, 2018). Devido a isto, novos microrganismos estão sendo estudados para a fermentação destes açúcares. Existem atualmente

um grande número de leveduras que metabolizam xilose. Entretanto somente cerca de 1% delas são capazes de fermentar xilose em etanol (Hahn-Hagerdal et al., 2007), e dentre estas destacam-se as leveduras do gênero *Pichia*.

Atualmente as pesquisas na área de fermentação buscam selecionar microrganismos que sob condições ótimas aumentam o rendimento fermentativo do processo. As vantagens de uma fermentação em menor período de tempo sob altas temperaturas além de reduzirem custos de resfriamento, diminuem o risco de contaminação. Para conseguir uma alta temperatura de fermentação é necessário o uso de uma estirpe de levedura que apresentem habilidade de termotolerância. Leveduras tolerantes a temperaturas superiores às estabelecidas para os processos fermentativos convencionais (32-34°C) são vantajosas pois mantém o rendimento fermentativo em períodos de temperaturas elevadas dentro de dornas industriais, além de serem uma alternativa para o processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) (Nielsen et al., 2017).

A eficiência da fermentação do etanol 2G depende de muitos fatores, incluindo a cepa de levedura a ser utilizada. Para que novos microrganismos isolados obtenham alta taxa de rendimento é necessário a realização de estudos para estabelecer as condições fermentativas que garantam que as leveduras consigam produzir altas concentrações de etanol. Neste contexto, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar o potencial das leveduras *Pichia Kudriavzevii* LJ03 e a estirpe LJ04 para co-fermentação de pentoses e hexoses em temperaturas de 37°C e 40°C, para a produção de etanol de segunda geração, a partir de em hidrolisados de bagaço de sorgo sacarino e sorgo biomassa pré-tratados com explosão à vapor catalisado por ácido sulfúrico.

5. CONCLUSÕES

Considerando-se as condições em que os experimentos foram desenvolvidos e a metodologia empregada, os resultados obtidos permitem concluir que:

As leveduras *Pichia membranifaciens* LJ04 e *Pichia kudriavzevii* LJ03 apresentaram tolerância aos hidrolisados de bagaço de sorgo sacarino, caracterizando-se como eficientes fermentadoras para a produção de etanol de segunda geração.

As leveduras apresentaram melhor propagação no meio enriquecido com 33% do volume de hidrolisado, com rendimentos fermentativos de 66,3% e 74,5% para a levedura *P. membranifaciens* nas temperaturas de 37°C e 40°C respectivamente, e 58,9% (37°C) e 56,5% (40°C) para a levedura *P. kudriavzevii*.

Dentre as temperaturas estudadas, pode-se considerar que ambas as leveduras possuem a capacidade termotolerante de fermentação na faixa de 37-40°C.

As leveduras foram eficientes no desdobramento de pentoses e hexoses, resultando em rendimentos teórico de 40,0% (*P. membranifaciens* em 37°C), 38,4% (*P. membranifaciens* em 40°C), 26,5% (*P. kudriavzevii* em 37°C) e 30% (*P. kudriavzevii* em 40°C).

Os bagaços de sorgos sacarino Malibu J53 e Malibu A1001, e o sorgo biomassa Palo Alto K1009 apresentaram composições químicas distintas sendo que o pré-tratamento de explosão de vapor, para as condições utilizadas apresentou-se como adequado para estes genótipos, possibilitando a recuperação dos açúcares.

Para trabalhos futuros, é necessário o aprofundamento nos estudos das leveduras *P. membranifaciens* LJ04 e *P. kudriavzevii* LJ03 para uma melhor metabolização de pentoses e maior produção de etanol, sugerindo experimentos com alimentação em batelada, processos de destoxificação do hidrolisado, além de processos fermentativos com separação dos açúcares (pentoses e hexoses).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvira P, Ballesteros M. e Negro MJ (2010). Bioresource Technology Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review, **Bioresource Technology**, [e-journal] vol. 101, no. 13, pp.4851–4861, Available Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>.
- Arantes V e Saddler JN (2010). Access to Cellulose Limits the Efficiency of Enzymatic Hydrolysis: The Role of Amorphogenesis, **Biotechnology for Biofuels**, vol. 3, no. 1, p.4.
- Azhar SHM, Abdulla R, Jambo SA., Marbawi H, Gansau JA, Faik A A M e Rodrigues, KF (2017). Yeasts in Sustainable Bioethanol Production: A Review, **Biochemistry and Biophysics Reports**, vol. 10, no. November 2016, pp.52–61.
- Bajwa PK., Phaenark C, Grant N, Zhang X, Paice M e Martin VJJ (2011). Ethanol Production from Selected Lignocellulosic Hydrolysates by Genome Shuffled Strains of *Scheffersomyces stipitis*, **Bioresour Technol.**, vol. 102, no. 21, pp.9965–9.
- Balan V. (2014). Current Challenges in Commercially Producing Biofuels from Lignocellulosic Biomass, **ISRN Biotechnology**, vol. 2014, no. i, pp.1–31.
- Barcelos, C. A. Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] para a produção de bioetanol. 2012. 334 f. Tese (Doutorado em Ciências (DSc). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- Barriga EJC et al. (2011). Yeasts Biodiversity and Its Significance: Case Studies in Natural and Human-Related Environments, Ex Situ Preservation, Applications and Challenges, in: O. Grillo (Ed.), **Changing Diversity, Changing Environment, InTech, Europe**, pp.55–86.
- Batista VAP., Avaliação bioenergética de sorgos biomassa, sacarino e forrageiro. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – Minas Gerais. 68p. 2016.
- Betancur GJV (2010) **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico para a produção de etanol de segunda geração**. 174 f. Tese (Doutorado) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Blomqvist J, Eberhard T, Schnürer J. e Passoth V. (2010). Fermentation Characteristics of *Dekkera bruxellensis* Strains, **Appl Microbiol Biotechnol**, vol. 87, no. 4, pp.1487–97.
- Bondesson P, Galbe M. e Zacchi G. (2013). Ethanol and Biogas Production after Steam Pretreatment of Corn Stover with or without the Addition of Sulphuric Acid, pp.1–11.
- Bondesson PM. e Galbe, M. (2016). Biotechnology for Biofuels Process Design of

SSCF for Ethanol Production from Steam - Pretreated , Acetic - Acid - Impregnated Wheat Straw, **Biotechnology for Biofuels**, pp.1–12.

Brasil. RenovaBio: Diretrizes Estratégicas. ANP; EPE; Ministério da Agricultura; Ministério de Minas e Energia. 2016

Brethauer S. e Studer MH. (2015). Biochemical Conversion Processes of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals - A Review, *CHIMIA International Journal for Chemistry*, vol. 69, no. 10, pp.572–581.

Bura R, Chandra, R. e Saddler, J. (2009). Influence of Xylan on the Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Corn Stover and Hybrid Poplar, **Biotechnol. Prog.**, vol. 25, no. 2, pp.315–322.

Cadete RM, Rosa CA (2017) The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. **Yeast**, 35: 191-199.

Cardoso MG (2006) Análises físico-químicas de aguardente. In: Cardoso MG (ed) **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, p. 445.

Choudhary, J., Singh, S. e Nain, L. (2016). Thermotolerant Fermenting Yeasts for Simultaneous Saccharification Fermentation of Lignocellulosic Biomass, **Electronic Journal of Biotechnology**, [e-journal] vol. 21, pp.82–92, Available Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.007>.

Chundawat, S. P. S., Beckham, G. T., Himmel, M. E. e Dale, B. E. (2011). Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals, **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, vol. 2, pp.121–145.

Demeke MM., Dumortier, F., Li, Y., Broeckx, T., Foulquié-moreno, M. R. e Thevelein, J. M. (2013). Combining Inhibitor Tolerance and D-Xylose Fermentation in Industrial *Saccharomyces Cerevisiae* for Efficient Lignocellulose-Based Bioethanol Production, **Biotechnology for Biofuels**, no. 1, p.120.

Deshpande, M. (2009). Natural Yeast FLora of Different Varieties of Grapes Used for Wine Making in India., *Food Microbiology*, pp.801–808.

Dhaliwal ,SS, Oberoi HS, Sandhu SK, Nanda D, Kumar D, U. S. (2011). Enhanced Ethanol Production from Sugarcane Juice by Galactose Adaptation of a Newly Isolated Thermotolerant Strain of *Pichia kudriavzevii*., *Bioresour Technol*, vol. 102, no. 10, pp.5968–5975,.

Diniz GMM (2010). Produção de Sorgo (*Sorghum Bicolor* L. Moench) Aspectos Gerais, *Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife*, vol. 23 f.

Eibinger, M. et al. (2014). Cellulose Surface Degradation by a Lytic Polysaccharide Monooxygenase and Its Effect on Cellulase Hydrolytic Efficiency., *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 52, pp.35929–35938.

EPE. Nota técnica DEA 18/14: Inventário energético dos resíduos sólidos urbanos. Empresa de Pesquisa Energética. Rio de Janeiro. 2014.

FAO. (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations, *FAOSTAT*, vol. Disponível.

Felipe MGA, Vitolo M, Mancilha IM, Silva SS (1997) Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 18: 251-254.

Fernandes, A. N., Thomas, L. H., Altaner, C. M., Callow, P. e Forsyth, V. T. (2011). Nanostructure of Cellulose Microfibrils in Spruce Wood, *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, vol. 108, no. 47, pp.1195–1203.

Fernandes, G., Braga, T. G., Parrella, R. A. C., Resende, M. M. De e Cardoso, V. L. (2014). Evaluation of Potential Ethanol Production and Nutrients for Four Varieties of Sweet Sorghum during Maturation, vol. 71, pp.518–524.

Frankó, B., Carlqvist, K., Galbe, M., Lidén, G. e Wallberg, O. (2017). Removal of Water-Soluble Extractives Improves the Enzymatic Digestibility of Steam-Pretreated Softwood Barks, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp.1–17.

Freita, L. A. De. (2017). PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO UTILIZANDO BAGAÇO DE SORGO SACARINO , FORRAGEIRO E BIOMASSA, *Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias*, p.179.

Galbe, M. e Zacchi, G. (2012). Pretreatment: The Key to Efficient Utilization of Lignocellulosic Materials, *Biomass and Bioenergy*, [e-journal] vol. 46, pp.70–78, Available Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.026>.

Gallardo, J. C. M., Souza, C. S., Cicarelli, R. M. B., Oliveira, K. F., Morais, M. R. e Lalluce, C. (2011). Enrichment of a Continuous Culture of *Saccharomyces Cerevisiae* with the Yeast *Issatchenkia Orientalis* in the Production of Ethanol at Increasing Temperatures, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 38, no. 3, pp.405–414.

Goshadrou, A., Karimi, K. e Taherzadeh, M. J. (2011). Improvement of Sweet Sorghum Bagasse Hydrolysis by Alkali and Acidic Pretreatments, *Bioenergy Technology (BE)*, vol. 57, pp.374–380.

Grous, W. R., Converse, A. O. e Grethlein, H. E. (2000). Effect of Steam Explosion Pretreatment on Pore Size and Enzymatic Hydrolysis of Poplar, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 8, no. 5, pp.274–280.

Guedes, B., Rondinele, F., Moutta, D. O. e Oliveira, F. De. (2011). Biological

Detoxification of Different Hemicellulosic Hydrolysates Using *Issatchenkia Occidentalis* CCTCC M 206097 Yeast, pp.199–207.

Gyalay-korpos, M., Feczák, J. e Réczey, K. (2008). Sweet Sorghum Juice and Bagasse as a Possible Feedstock for Bioethanol Production, *Hungarian Journal of Industrial Chemistry*, vol. 36, pp.43–48.

Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. e Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards Industrial Pentose-Fermenting Yeast Strains., *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 74, no. 5, pp.937–53.

Hallac, B. B. e Ragauskas, A. J. (2011). Analyzing Cellulose Degree of Polymerization and Its Relevancy to Cellulosic Ethanol., *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 6, no. 3, pp.246-215–225.

Hollupi, N. T. (2015). Isolamento, Caracterização e Identificação de Leveduras Do Ecossistema de Produção Do Sorgo Sacarino. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado Em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Campus Jaboticabal.

HU,J., et al. (2015). The Addition of Accessory Enzymes Enhances the Hydrolytic Performance of Cellulase Enzymes at High Solid Loadings, *Bioresource Technology*, vol. 186, pp.149–153.

Hu, N., Yuan, B., Sun, J., Wang, S. A. e Li, F. L. (2012). Thermotolerant *Kluyveromyces Marxianus* and *Saccharomyces Cerevisiae* Strains Representing Potentials for Bioethanol Production from Jerusalem Artichoke by Consolidated Bioprocessing., *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 95, pp.1359–68.

IEA. (2011). International Energy Agency, *Technology Roadmap: Biofuels for Transport*, vol. OECD/IEA,.

IEA. (2017). International Energy Agency, *World Energy Outlook 2016 Part B: Special Focus on Renewable Energy*, vol. OECD/IEA, no. Paris, France, 2016.

Isono, N., Hayakawa, H., Usami, A., Mishima, T. e Hisamatsu, M. (2012). NOTE A Comparative Study of Ethanol Production by *Issatchenkia Orientalis* Strains under Stress Conditions, *JBIOSC*, [e-journal] vol. 113, no. 1, pp.76–78, Available Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.09.004>.

Jarboe, L., Grabar, T., Yomano, L., Shanmugan, K. e Ingram, L. (2007). Development of Ethanologenic Bacteria, *Biofuels: Springer*, pp.237–61.

Jeffries, T. W. (1994). Biodegradation of Lignin and Hemicelluloses, in *Biochemistry of Microbial Degradation*, C. Ratledge, Editor.

Jönsson, L. J. e Martín, C. (2016). Pretreatment of Lignocellulose: Formation of Inhibitory by-Products and Strategies for Minimizing Their Effect, *Bioresource Technology*, vol. 199, pp.103–112.

Kandhola G., Djioleu, A., Carrier, D. J. e Kim, J. (2017). Pretreatments for Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Pinewood: A Review, **Bioenerg. Res**, vol. 10, pp.1138–1154.

Karimi K. e Taherzadeh MJ (2016). A Critical Review of Analytical Methods in Pretreatment of Lignocelluloses: Composition, Imaging, and Crystallinity, **Bioresource Technology**, [e-journal] vol. 200, pp.1008–1018, Available Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.022>.

Kostylev, M. e Wilson, D. (2012). Synergistic Interactions in Cellulose Hydrolysis, **Biofuels**, vol. 3, no. 1, pp.61–70.

Kumar, R., Singh, S. e Singh, O. V. (2008). Bioconversion of Lignocellulosic Biomass: Biochemical and Molecular Perspectives, **J Ind Microbiol Biotechnol**, vol. 35, pp.377–391.

Kurtzman, C. P. (1998). Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts, in: C.P. Kurtzman, J.W. Fell (Eds.), *The Yeasts: A Taxonomic Study*, Elsevier Science.

Kwon, J., Ma, A. ., Li, Q., Wang, F., Zhuang, G. . e Liu, C. Z. (2011). Effect of Lignocellulosic Inhibitory Compounds on Growth and Ethanol Fermentation of Newly-Isolated Thermotolerant *Issatchenkia Orientalis*, **Bioresour Technol.**, vol. 102, no. 17, pp.8099–8104.

Landau, E. C. e Sans, LMA (2009). Clima. In: RODRIGUES, J. A.S. (Ed.). *Cultivo Do Sorgo*. 5. Ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, *Embrapa Milho e Sorgo - Sistemas de produção*.

Lane, J. (2017). Biofuels Mandates Around the World 2017, *Biofuels Digest*.

Li, J., Henriksson, G. e Gellerstedt, G. (2007). Lignin Depolymerization/Repolymerization and Its Critical Role for Delignification of Aspen Wood by Steam Explosion, *Bioresour Technol*, vol. 98, pp.3061–3068.

Lima, UA.; Basso, L. C.; Amorim, HV. In: LIMA, U. A. (Coord.) *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Edgar Blucher, p.1 43. (*Biotecnologia Industrial*; v.3). 2001.

Limtong, S., Srisuk, N. e Yongmanitchai, W. (2005). *Pichia Thermomethanolica* Sp . Nov ., a Novel Thermotolerant , Methylophilic Yeast Isolated in Thailand in Thailand, no. June 2014.

Lopes, D. D., Rosa, C. A., Hector, R. E., Dien, B. S., Mertens, J. A. e 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 and Biotechnology**, vol. 44, no. 11, pp.1575–1588.

Macrelli, S., Mogensen, J. e Zacchi, G. (2012). Techno-Economic Evaluation of 2nd Generation Bioethanol Production from Sugar Cane Bagasse and Leaves Integrated

with the Sugar-Based Ethanol Process, pp.1–18.

Mansfield, S. D., Mooney, C. e Saddler, J. N. (1999). Substrate and Enzyme Characteristics That Limit Cellulose Hydrolysis, *Biotechnology Progress*, vol. 15, no. 5, pp.804–816.

McFarlane, H. E., Döring, A. e Persson, S. (2014). The Cell Biology of Cellulose Synthesis, *Annual Review of Plant Biology*, vol. 65, no. 1, pp.69–94.

McKendry, P. (2002). Energy Production from Biomass (Part 1): Overview of Biomass., *Bioresource technology*, [e-journal] vol. 83, no. 1, pp.37–46, Available Online: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058829>.

Martini C, Tauk-Tornisielo SM, Codato CB, Bastos RG, Ceccato-Antonini SR (2016) A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32: 80.

Moon RJ., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., Youghblood, J., (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews** 40, 3941-3994.

Moro, Mariana Kuster. Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-rosca. 2015. 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Narendranath NV, Thomas KC, Ingledew WM (2001) Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 26: 171-177.

Nevoigt, E. (2008). Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Microbiol Mol Biol Rev.*, vol. 72, no. 3, pp.379–412.

NEXSTEPPE. (2017). <https://Br.Nexsteppe.Com/Produtos/MalibuA1001/>.

Nielsen, F. (2016). Process Development for Combined Pentose and Hexose Fermentation.

Nielsen, F., Pejó, E. T., Olsson, L. e Wallberg, O. (2015). Short-term Adaptation during Propagation Improves the Performance of Xylose - Fermenting *Saccharomyces Cerevisiae* in Simultaneous Saccharification and Co- Fermentation, *Biotechnology for Biofuels*, vol. 8, no. 219, pp.1–15.

Nielsen, F., Zacchi, G., Galbe, M. e Wallberg, O. (2017). Sequential Targeting of Xylose and Glucose Conversion in Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation of Steam-Pretreated Wheat Straw for Improved Xylose Conversion to Ethanol, pp.800–810.

Nielsen, J. e Olsson, L. (2001). Fuel Ethanol Production from Lignocellulose : A Challenge for Metabolic Engineering and Process Integration, no. May 2014.

Nogu , V. S. e Karhumaa, K. (2015). Xylose Fermentation as a Challenge for Commercialization of Lignocellulosic Fuels and Chemicals, **Biotechnol Lett**, vol. 37, pp.761–772.

Nuanpeng, S., Thanonkeo, S., Klanrit, P. e Thanonkeo, P. (2018). Ethanol Production from Sweet Sorghum by *Saccharomyces Cerevisiae* DBKKUY-53 Immobilized on Alginate-Loofah Matrices, **Brazilian Journal of Microbiology**, [e-journal] vol. 49, pp.1–11, Available Online: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.011>.

Oberoi, H. S., Babbar, N., Sandhu, S. K., Dhaliwal, S. S., Kaur, U. e Chadha, B. (2012). Ethanol Production from Alkali-Treated Rice Straw via Simultaneous Saccharification and Fermentation Using Newly Isolated Thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1, **J Ind Microbiol Biotechnol**, vol. 39, pp.557–66.

 hgren, K., Bura, R., Saddler, J. e Zacchi, G. (2007). Effect of Hemicellulose and Lignin Removal on Enzymatic Hydrolysis of Steam Pretreated Corn Stover, **Bioresource Technology**, vol. 98, no. 13, pp.2503–2510.

Olsen, C., Arantes, V. e Saddler, J. (2015). Optimization of Chip Size and Moisture Content to Obtain High , Combined Sugar Recovery after Sulfur Dioxide-Catalyzed Steam Pretreatment of Softwood and Enzymatic Hydrolysis of the Cellulosic Component, **Bioresource technology**, [e-journal] vol. 187, pp.288–298, Available Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.084>.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De La Rubia, T. e Martínez, J. (2002). Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: An Overview, *International Microbiology*, vol. 5, no. 2, pp.53–63.

Pin, M., Picco, D., Vecchiet, A. e Macchia E. (2011). Sweet Sorghum to Produce in Italy Sustainable Ethanol, Electricity and Heat in Decentralised Small-Medium Biorefinery, *CETA, Centre for Theoretical and Applied Ecology*. **Green Engineering**, vol. 44.

Piper, PW (1995). The Heat Shock and Ethanol Stress Responses of Yeast Exhibit Extensive Similarity and Functional Overlap., **FEMS Microbiol Lett**, vol. 134, no. 2–3, pp.121–127.

Ribas, P. M. (2008). Plantio: A Implanta   Da Cultura. In: RODRIGUES, J.A. S. (Ed.). Cultivo Do Sorgo., *Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo*, 2008. *Sistemas de produção*, vol. 5. ed.

Robak, K. e Balcerek, M. (2018). Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass, vol. 56, no. 2, pp.0–3.

Robert D, et al. (1988). Structural Changes in Aspen Lignin during Steam Explosion Treatment, **Cellulose chemistry and technology**.

Roviero JP (2016) **Biomassa derivada de cana-de-açúcar e cana energia submetidas a hidrólise ácida e enzimática para produção de etanol**. 119f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e

Veterinárias, Jaboticabal.

Saloheimo, M. et al. (2002). Swollenin, a *Trichoderma Reesei* Protein with Sequence Similarity to the Plant Expansins, Exhibits Disruption Activity on Cellulosic Materials, *European Journal of Biochemistry*, vol. 269, no. 17, pp.4202–4211.

Santos, A. e Marquina, D. (2014). Killer Toxin of *Pichia Membranifaciens* and Its Possible Use as a Biocontrol Agent against Grey Mould Disease of Grapevine, *Microbiol*, vol. 150, pp.2527–2534.

Shen, F., Saddler, J. N., Liu, R., Lin, L., Deng, S., Zhang, Y., Yang, G., Xiao, H. e Li, Y. (2011). Evaluation of Steam Pretreatment on Sweet Sorghum Bagasse for Enzymatic Hydrolysis and Bioethanol Production, *Carbohydrate Polymers*, [e-journal] vol. 86, no. 4, pp.1542–1548, Available Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.059>.

Silva, A. F., Ferreira, O. E., Costa, G. H. G., Montijo, N. A., Mutton, M. A. e Mutton, M. J. R. (2016). Technological Quality of Sweet Sorghum Processed without Panicles for Ethanol Production, *Australian Journal of Crop Science*, vol. 10, no. 11.

Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. e Wolfe, J. L. (2008a). Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples., *Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory*;

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. e Templeton, D. (2010). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass., *Gold Colo Natl Renew Energy Lab*, no. Report No.TP510-42618, p.Jun. 17.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. e Crocker, D. (2006). Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples., *Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory*;

Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. e Templeton, D. (2008b). Determination of Extractives in Biomass, *Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory*, no. Report No. TP-510-42619., p.Jan. p.12.

Sorek, N., Yeats, T. H., Szemenyei, H., Youngs, H. e Somerville, C. R. (2014). The Implications of Lignocellulosic Biomass Chemical Composition for the Production of Advanced Biofuels, *BioScience*, vol. 64, no. 3, pp.192–201.

Souza, C. C., Dantas, J. P., Silva, S. ., Souza, V. C., Alemida, F. A. e Silva, L. E. (2005). Produtividade Do Sorgo Granífero Cv. Sacarino e Qualidade de Produtos Formulados Isoladamente Ou Combinados Ao Caldo de Cana-de-Açúcar, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 25, no. 3, pp.512–517.

Sree NK, M, S., K, S., IM, B. e L., V. R. (2000). Isolation of Thermotolerant, Osmotolerant, Flocculating *Saccharomyces Cerevisiae* for Ethanol Production., *Bioresour Technol.*, vol. 72, no. 1, pp.43–46.

Srinivasa, P., Rao, S. S., Seetharama, n., Umakanth, A. V., Reddy, S. P., REDDY, B. V. S. e GOWDA, C. L. L. (2009). Sweet Sorghum for Biofuel and Strategies for Its Improvement., *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*, p.80.

Stagge, S., Cavka, A. e Jönsson, L. J. (2015). Identification of Benzoquinones in Pretreated Lignocellulosic Feedstocks and Inhibitory Effects on Yeast, *AMB Express*, vol. 5, no. 1, p.62.

Tanahashi, M. et al. (1983). Characterization of Explosion Wood: 1. Structure and Physical Properties.

Techaparin, A., Thanonkeo, P. e Klanrit, P. (2017). Biotechnology and Industrial Microbiology High-Temperature Ethanol Production Using Thermotolerant Yeast Newly Isolated from Greater Mekong Subregion, *Brazilian Journal of Microbiology*, [e-journal] vol. 48, no. 3, pp.461–475, Available Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.006>.

Tikka, C., Osuru, H. P., Atluri, N. e Raghavulu, P. C. V. (2013). Isolation and Characterization of Ethanol Tolerant Yeast Strains., *Bioinformation*, vol. 9, no. 8, pp.421–425.

Trajano, H., et al. (2013). The Fate of Lignin during Hydrothermal Pretreatment, *Biotechnology for Biofuels*, vol. 6, no. 1, p.110.

Walker GM (2004) Metals in Yeast Fermentation Processes. **Advances in Applied Microbiology**, 54: 197-229.

Wang W., Zhuang X., Yuan Z., Yu Q. QI, W., Wang, Q. e Tan, X. (2012). High Consistency Enzymatic Saccharification of Sweet Sorghum Bagasse Pretreated with Liquid Hot Water, **Bioresource Technology**, vol. 108, pp.252–257.

Watkins, D., Nuruddin, M., Hosur, M., Tcherbi-Narteh, A. e Jeelani, S. (2015). Extraction and Characterization of Lignin from Different Biomass Resources, **Journal of Materials Research and Technology**, [e-journal] vol. 4, no. 1, pp.26–32, Available Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmrt.2014.10.009>.

Weiss, N. D., Stickel, J. J., Wolfe, J. L. e Nguyen, Q. A. (2010). A Simplified Method for the Measurement of Insoluble Solids in Pretreated Biomass Slurries, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 162, pp.975–87.

Wiederschain, G. Y. (2007). Polysaccharides. Structural Diversity and Functional Versatility, *Biochemistry (Moscow)*, vol. 72, no. 6, pp.675–675.

Yang, B., Boussaid, A., Mansfield, S. D., Gregg, D. J. e Saddler, J. N. (2002). Fast and Efficient Alkaline Peroxide Treatment to Enhance the Enzymatic Digestibility of Steam-Exploded Softwood Substrates, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 77, no. 6, pp.678–684.

Yang, B. e Wyman, C. E. (2008). Pretreatment: The Key to Unlocking Low-Cost Cellulosic Ethanol, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 2, no. 1, pp.26–40.

Yu, J., Zhong, J., Zhang, X. & Tan, T. (2010). Ethanol Production from H₂SO₃-Steam-Pretreated Fresh Sweet Sorghum Stem by Simultaneous Saccharification and Fermentation, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 160, no. 2, pp.401–409.

Yuangsaard, N. & Yongmanitchai, W. (2013). Selection and Characterization of a Newly Isolated Thermotolerant *Pichia kudriavzevii* Strain for Ethanol Production at High Temperature from Cassava Starch Hydrolysate, pp.577–588.

Zaldivar, J., Nielsen, J. & Olsson, L. (2001). Fuel Ethanol Production from Lignocellulose: A Challenge for Metabolic Engineering and Process Integration, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 56, no. 1, pp.17–34.

Zhang, Y., Wang, C., Wang, L., Yang, R., Hou, P. & Liu, J. (2017). Direct Bioethanol Production from Wheat Straw Using Xylose/Glucose Co-Fermentation by Co-Culture of Two Recombinant Yeasts, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 44, no. 3, pp.453–464.

Zhao, X., Zhang, L. & Liu, D. (2012). Biomass Recalcitrance . Part I : The Chemical Compositions and Physical Structures Affecting the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose, pp.465–482.

Zhu, J. Y. & Pan, X. J. (2010). Bioresource Technology Woody Biomass Pretreatment for Cellulosic Ethanol Production: Technology and Energy Consumption Evaluation Q, *Bioresource Technology*, [e-journal] vol. 101, no. 13, pp.4992–5002, Available Online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.007>.