

**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



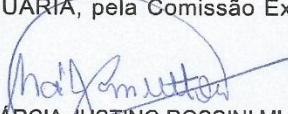
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

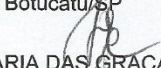
AUTORA: ALINE FERREIRA SILVA

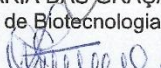
ORIENTADORA: MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

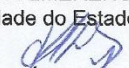
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


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.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biocombustíveis

O uso de combustíveis fósseis como recursos energéticos prioritários contribuíram com o surgimento de problemas mundiais, como a poluição ambiental e o aquecimento global. O petróleo, ainda hoje, é uma das principais fontes de energia que mantém o funcionamento de diversas indústrias. Entretanto, a dependência cada vez maior de energia, o possível esgotamento das reservas fósseis e a preocupação com a questão ambiental cada vez mais forte, são fatores que instigaram a procura e o desenvolvimento de alternativas energéticas. A produção de biocombustíveis surge como alternativa promissora e ambientalmente sustentável, já que se baseia na utilização de fontes naturais renováveis (Nuanpeng et al., 2018)

Biocombustíveis é o termo usado para descrever combustíveis, sejam eles líquidos ou gasosos, que provém de matérias-primas renováveis. Os biocombustíveis líquidos representam a maior parcela de energia renovável no setor de transporte, principalmente devido as misturas com outros combustíveis (Lane, 2017).

O uso de biocombustíveis e outras fontes de energias renováveis tem crescido, principalmente como resultado de medidas políticas, objetivando enfrentar os desafios das mudanças climáticas e o aumento da demanda por energia. O crescimento econômico global contribuiu para um aumento considerável na demanda por energia, que deverá aumentar em 32% até 2040. As biomassas, e outras fontes de energia como, a energia hídrica, eólica, solar e a geotérmica são todas importantes fontes renováveis, constituindo atualmente 14% do mix energético global, e sua participação deve dobrar até 2040. Alternativas de energia e novas fontes renováveis, como os biocombustíveis, possuem um papel-chave a desempenhar no atendimento destas crescentes demandas (IEA, 2017).

Em 2016, foram colocadas em consulta pública as diretrizes do programa RenovaBio, com objetivo declarado de “expandir a participação de biocombustíveis no Brasil” (Brasil, 2016). O RenovaBio está de acordo com o compromisso do Brasil na COP 21, que inclui, entre outros objetivos “aumentar a participação de bioenergia

sustentável na matriz energética para aproximadamente 18% até 2030, expandindo o consumo de biocombustíveis”, e “alcançar uma participação estimada de 45% de energias renováveis na composição da matriz energética em 2030” (EPE, 2016).

Entre as opções de energias renováveis, as biomassas têm o potencial de fornecer biocombustíveis e serve como alternativa aos combustíveis à base de petróleo usados na infraestrutura existente. Além disso, a utilização de recursos locais de biomassa para a produção de biocombustíveis também pode trazer benefícios adicionais, como aumentar a segurança energética, reduzir a dependência das importações de petróleo e contribuir para o desenvolvimento econômico das áreas rurais, criando novas fontes de renda nos setores agrícola e florestal (IEA, 2011).

Atualmente, 64 países estabeleceram ou planejaram metas de uso de biocombustíveis (Lane, 2017). Como resultado, o consumo destes atingiu 1,6 milhão de barris por dia em 2016 (IEA, 2017), enquanto o estoque global de veículos ultrapassou a marca de 2 milhões em 2017.

O interesse mundial na utilização de etanol como fonte de energia tem estimulado os estudos sobre o custo e a eficiência dos processos industriais para sua produção. Neste sentido, pesquisas têm sido conduzidas para a obtenção de eficientes organismos fermentativos, baixo custo de substratos e ótimas condições para o processo (Robak e Balcerek, 2018).

O etanol atualmente produzido em larga escala pertence a “primeira geração”, sendo denominado etanol 1G e produzido principalmente a partir do processamento de matérias-primas sacaríneas (açucaradas) e amiláceas (Robak e Balcerek, 2018). Segundo Silva (2017) nas últimas quatro décadas o Brasil se tornou o segundo maior produtor de etanol através da adoção de estratégias de expansão de produção a partir da cana-de-açúcar. Entretanto este crescimento não será o suficiente para atender a futura demanda de exportações, necessitando de implementação outras matérias-primas e tecnologias. O Brasil possui uma agricultura privilegiada que apresenta características climáticas e geográficas favoráveis à produção de biomassa em larga escala com os menores custos de produção, principalmente em relação a cultura de cana-de-açúcar

As fontes de energia renováveis caracterizam-se, em termos gerais, pela sua disponibilidade descentralizada, por apresentarem uma capacidade de autorregeneração em curtos períodos de tempo e pelos reduzidos impactos ambientais decorrentes da sua utilização (Nielsen, 2016).

2.2. Matérias-primas: Sorgo Sacarino e Sorgo Biomassa

O sorgo é uma planta originária da África, da família *gramineae*, do gênero *Sorghum*, e da espécie *Sorghum bicolor* L. Moench. É cultivado em muitos países da Ásia, África e Américas. O Brasil é o maior produtor na América do Sul, sendo o oitavo no ranking mundial (FAO, 2017). Quarto cereal mais produzido no mundo e quinto em área plantada, ficando atrás do trigo, arroz, milho e cevada. É cultivado principalmente nos trópicos semi-áridos do mundo, onde o sistema de produção é limitado por solos pobres, baixa precipitação com chuvas irregulares com baixa quantidade de insumos, podendo resultar em baixa produtividade (Srinivasa et al., 2009).

É cultivado, geralmente, onde a precipitação anual se situa entre 375 e 625 mm ou sob irrigação suplementar (Ribas, 2008). A temperatura ótima varia entre 16°C e 38°C conforme a cultivar, temperaturas noturnas 5°C acima do valor ótimo podem reduzir em até 33% a produtividade. Devido às características xerofíticas, o sorgo mantém-se dormente durante o período de seca, retomando o crescimento assim que as condições sejam favoráveis (Landau e Sans, 2009). Com relação à nutrição da planta a exigência nutricional está diretamente relacionada com a produtividade. Por sua vez, verifica-se que a produção apresenta exigências por nutrientes, em ordem decrescente para o nitrogênio e potássio, seguido de cálcio, magnésio e fósforo (Silva et al., 2016).

O sorgo, caracteriza-se como planta C4 com elevada atividade fotossintética, elevado rendimento de biomassa, grande quantidade de açúcares nos colmos e eficiência no uso da radiação solar (Fernandes et al., 2014), além de apresentar elevada adaptação a diferentes ambientes, com grande potencial para converter o CO₂ atmosférico em açúcares e biomassa (Pin et al., 2011). Requer um quarto da quantidade de água que a cana-de-açúcar necessita, possui quantidade de açúcares totais (redutores e não redutores) no caldo extraído similares à da cana.

Assim como a cana-de-açúcar, o colmo de sorgo é dividido em nós, entrenós e folhas ao longo de toda a planta. Porém, possui uma inflorescência, a panícula, e seu fruto é uma cariopse ou grão seco (Figura 1). A planta pode atingir de 1 a 4 metros de altura, tendo vários colmos por pé (afilhamento), em que cada um dos quais tem uma influência terminal do tipo paniculado. Uma espiga séssil, fértil, acompanhada por duas espiguetas estéreis pedunculadas, caracteriza o gênero (Ribas, 2008). Durante a fase de instalação da cultura, é importante que a germinação, emergência e crescimento inicial da plântula, ocorram em menor tempo possível garantindo estande ideal de plantas, bem como, ocorra um controle eficiente das plantas daninhas até a fase de indução floral, para que a produtividade não seja reduzida (Diniz, 2010).

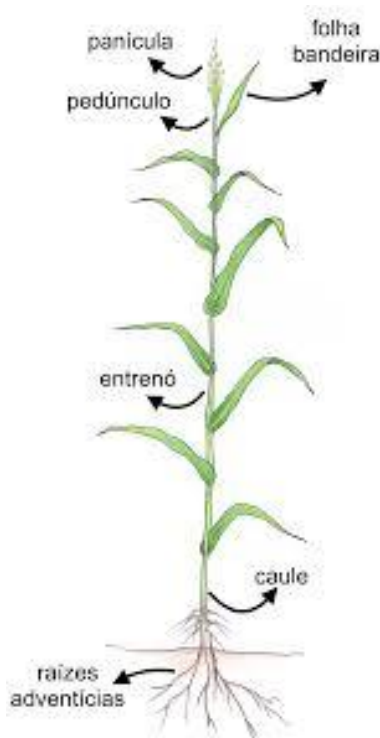


Figura 1. Principais constituintes de uma planta de sorgo.

Segundo Freita (2017), o sorgo é classificado em: granífero, forrageiro, sacarino, vassoura e biomassa. Os diferentes genótipos de sorgo compartilham a elevada taxa fotossintética, a sensibilidade ao fotoperíodo e a temperatura.

Atualmente, o sorgo sacarino e sorgo biomassa surgem como cultura energética promissora, possuindo na constituição três grupos de materiais susceptíveis a fermentação etanólica, os açúcares presentes nos colmos, o amido dos grãos, e o material lignocelulósico, o bagaço.

O sorgo sacarino é utilizado como cultura energética, por apresentar potencialidades atraentes como matéria-prima, por apresentarem apresenta ciclo que possibilita colheita entre 90 e 120 dias, colmos ricos em caldo com elevados teores de açúcares fermentescíveis, além de tolerância ao calor, seca e resistência as mudanças climáticas. Tem potencial para produção de etanol que pode chegar a 3 mil L/ha (Nexsteppe, 2017). Várias vantagens tornam o cultivo comercial do sorgo sacarino viável, dentre estas o fato de possuir ciclo vegetativo bem mais curto quando comparado com a cana de açúcar, de 120 a 130 dias podendo ser alternativa para a entressafra da cana, e adicionalmente produz grãos que também podem ser processados na indústria ou utilizados como opção econômica para elaboração de ração animal como também na alimentação humana (Souza et al., 2005). O bagaço pode ser utilizado para produção de energia na indústria, para a adubação orgânica, fabricação de papel (Wang et al., 2012) e produção de etanol de segunda geração através da conversão bioquímica (Goshadrou, Karimi e Taherzadeh, 2011).

O sorgo biomassa apresenta grande quantidade de massa verde, colmos grossos e fibrosos, pequena produção de grãos e porte muito alto (Embrapa, 2012). Possui a particularidade de ser menos sensível ao fotoperíodo, o que possibilita a ampliação do ciclo vegetativo, ao mesmo tempo, que proporciona o aumento da produção de biomassa por hectare/ciclo, em comparação com as cultivares sensíveis ao fotoperíodo (Fernandes et al., 2014). O sorgo biomassa é matéria-prima energética ideal devido a versatilidade como fonte de amido e fibras. Por estas características, pode se destacar como matéria-prima energética, graças a flexibilidade de uso. Pode ser empregado em combustão direta em caldeiras, assim como para a produção de biocombustíveis através de novas tecnologias (energia verde), além da produção de químicos renováveis (Carrillo et al., 2014).

Considerando-se o sorgo sacarino e o sorgo biomassa, a produção de grãos é um aspecto secundário, destacando-se os processos fisiológicos que

proporcionam maior produção de biomassa total, e no caso do sorgo sacarino, que também resultem maior acúmulo e armazenamento de açúcares nos colmos. O chamado sorgo biomassa tem sido pesquisado e apresenta qualidade para gerar energia com poder calorífico similar ao da cana, do eucalipto e do capim-elefante (Srinivasa Rao et al., 2009).

No Brasil a produção de etanol a partir de sorgo sacarino e sorgo biomassa vem ganhando destaque atualmente por se assemelhar a cana-de-açúcar quanto a fisiologia e características tecnológicas, ou seja, também acumula açúcar no colmo e fornece bagaço para a indústria (Freita, 2016). Este surge como uma alternativa para produção de etanol no período de entressafra da cana, período em que as destilarias permanecem paradas, sobretudo nos meses de março e abril, ou em casos de pouca oferta do produto no mercado (Corsino, 2011).

2.3. Biomassas lignocelulósicas

As biomassas lignocelulósicas incluem uma ampla variedade de materiais-primas, como os resíduos agrícolas, florestais, gramíneas, resíduos da indústria de papel e celulose, resíduos sólidos urbanos, entre outras. Todos esses materiais representam um vasto recurso que podem potencialmente ser usado para a produção de etanol. A escolha da matéria-prima depende da disponibilidade, rendimento por hectare, bem como preço de mercado e decisões políticas (Bondesson, 2016).

É importante entender a composição química e a estrutura das paredes celulares das plantas, a fim de identificar os desafios e as oportunidades potenciais associadas à utilização da biomassa.

A parede celular da planta consiste principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, conhecidas coletivamente como lignocelulose, e também pequenas frações de proteínas, extrativos e compostos inorgânicos (Frankó et al., 2017).

Diferente das culturas à base de açúcar e amido, os açúcares da biomassa lignocelulósica são envoltos dentro de uma matriz complexa e heterogênea. Enquanto os grãos de amido servem como armazenamento de energia para as plantas, fornecendo açúcares facilmente acessíveis, a matriz lignocelulósica das

plantas forma a estrutura rígida que ajuda a planta a suportar os efeitos do clima e o ataque de microrganismos e insetos (Nielsen, 2016).

A estrutura final da parede celular depende do táxon, tecido, tipo de célula e idade da planta (Wiederschain, 2007). Pode haver também diferenças na composição da mesma biomassa devido a diferenças nas condições de cultivo e colheita, bem como variações sazonais (Öhgren et al., 2007).

Devido à sua estrutura altamente complexa, a decomposição da lignocelulose é um dos principais desafios para a produção comercial de etanol lignocelulósico. É, portanto, necessário quebrar essa matriz e superar a recalcitrância da parede celular da planta, a fim de produzir etanol a partir de matérias-primas lignocelulósicas.

Diversas biomassas estão sendo avaliadas para a produção de etanol de segunda geração, dentre elas destacam-se seis grupos principais: coníferas e folhosas, resíduos de celulose (papel de jornal, papel de escritório), biomassa herbácea (feno, gramíneas), resíduos municipais sólidos e resíduos de agricultura (bagaço de cana, palha de milho, palha de trigo, palha e casca de arroz, palha de cevada, bagaço de sorgo, caroços de azeitona e celulose) (Bondesson e Galbe, 2016; Frankó et al., 2017; Macrelli, Mogensen e Zacchi, 2012; Watkins et al., 2015).

2.3.1. Estrutura química e morfologia

Os principais componentes da biomassa lignocelulósica são os polímeros celulose, hemicelulose e lignina. Esses componentes são encontrados na parede celular da planta, onde são altamente interligados (Figura 2).

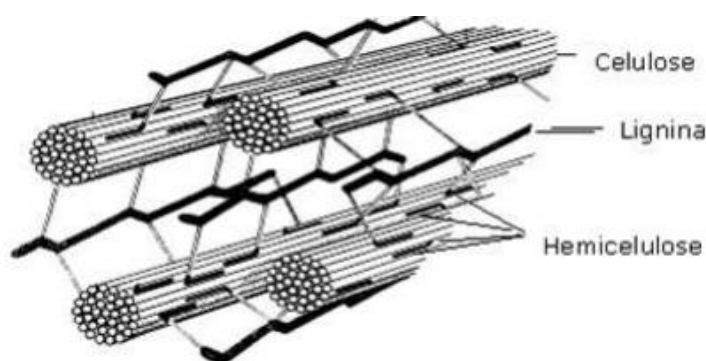


Figura 2. Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico (Lee, 1997).

A celulose, que representa 30-50% da biomassa lignocelulósica com base no peso seco, é geralmente o polímero mais abundante nas plantas, seguido pela hemicelulose (15-35%) e lignina (10-30%) (McKendry, 2002). Além destes componentes, a lignocelulose contém baixas quantidades de pectina, proteínas, compostos inorgânicos e componentes não-estruturais, muitas vezes referidos como extrativos (Frankó et al., 2017). A composição química da biomassa lignocelulósica difere não apenas entre espécies diferentes, mas também varia com a idade, estágio de crescimento e outras condições dentro de uma única planta (Pérez et al., 2002).

A celulose é um homopolímero linear de unidades de D-glicose ligadas por ligações β -1,4 glicosídicas, onde a menor unidade repetitiva é celobiose, um dissacarídeo que consiste em duas unidades de glicose (Figura 3). Estas cadeias de celulose podem ser cristalizadas em feixes de cadeias, chamadas microfibrilas. A força da parede celular depende do comprimento, ângulo e cristalinidade das microfibrilas (McFarlane, Döring e Persson, 2014).

Embora a glicose seja uma molécula altamente solúvel em água, a sua solubilidade diminui drasticamente com um aumento do grau de polimerização, tornando a celulose extremamente insolúvel em água em condições normais. O grau de polimerização das cadeias de celulose varia dependendo da fonte, é tipicamente de ~ 1000 em resíduos agrícolas a ~ 5000 em madeiras (Hallac e Ragauskas, 2011).

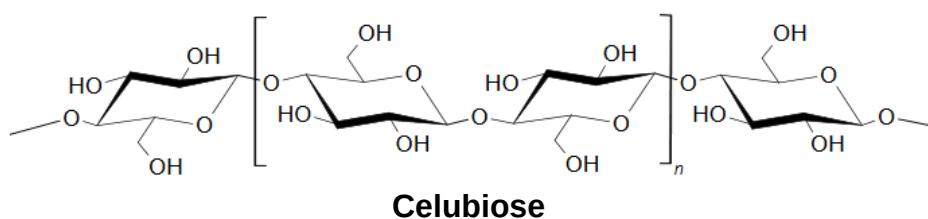


Figura 3. A estrutura da celulose. A menor unidade repetitiva (entre parentêses) é a celobiose, um dissacarídeo que consiste de duas unidades de glicose ligadas pela ligação β -1,4 glicosídica.

As hemiceluloses (Figura 4) são polissacarídeos heterogêneos, onde a maioria dos componentes são amorfos e possuem estruturas ramificadas com cadeias laterais neutras ou ácidas (Olsen, Arantes e Saddler, 2015). A resistência à tração das microfibrilas de celulose é reforçada pela matriz circundante de hemiceluloses. As hemiceluloses tem sido atribuída com o papel de um agente de

reticulação na matriz da parede celular, assim, está quimicamente associada a microfibrilas de celulose, proteínas, lignina e outras hemiceluloses e, portanto, fornece rigidez à estrutura macroscópica da parede vegetal da planta. O grau de polimerização entre diferentes tipos de hemiceluloses pode variar, mas é menor que o da celulose (Olsen, Arantes e Saddler, 2015).

As hemiceluloses, referem-se ao grupo diverso de polímeros ramificados de cadeia curta de açúcares com um certo número de substituintes. Estes polissacarídeos complexos e diversos são constituídos por hexoses (principalmente D-glicose, D-galactose e D-manose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos açucarados (D-glucurônico, D-galacturônico e 4- Ácidos O-metil-D-glucurônicos), e seu grau de polimerização é menor que o da celulose (tipicamente 50-300) (Zhao, Zhang e Liu, 2012).

A composição das hemiceluloses difere no tipo de ligações glicosídicas, composição da cadeia lateral e grau de polimerização, dependendo das espécies de plantas e tecidos celulares. As hemiceluloses são geralmente classificadas pelos açúcares predominantes na estrutura do polissacarídeo ligados a β -1,4, por exemplo, xilanas e mananas (Jeffries, 1994).

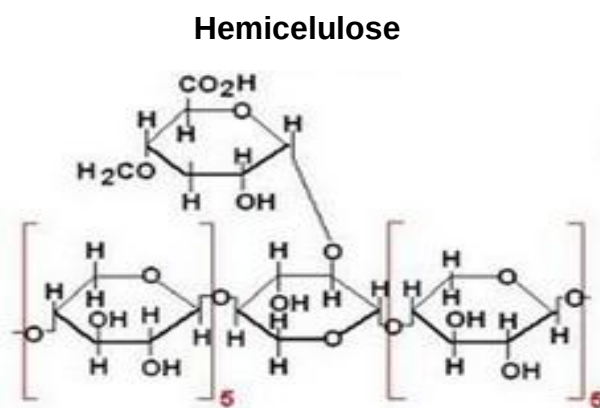


Figura 4. Estrutura molecular parcial da hemicelulose. Fonte: (MAREBEZI, 2009).

A lignina é uma macromolécula que consiste de unidades de fenilpropano conectadas por ambas as ligações éter e carbono-carbono (Jeffries, 1994). As três unidades monoméricas básicas, que diferem em seu grau de metoxilação. A composição da lignina varia entre espécies, células e tipos de tecidos (Yang e

Wyman, 2008). Por exemplo, ligninas de madeiras macias são compostas principalmente de unidades guaiacil, ligninas de madeira rígidas são predominantemente unidades guaiacil e siringil com quantidades pequenas de unidades p-hidroxifenil, enquanto plantas agrícolas contêm quantidades significativas de todas as três unidades em diferentes proporções (Chundawat et al., 2011).

A lignocelulose também contém outros componentes, como pectina, proteínas, cinzas e extrativos. As pectinas são o terceiro principal grupo polissacarídico estrutural das paredes celulares vegetais, constituído por esqueletos de ácido homo-galacturónico com cadeias laterais neutras de açúcar consistindo em L-ramnose, L-arabinose, D-galactose e D-xilose (Kumar, Singh e Singh, 2008). Os extrativos compreendem uma grande variedade de compostos não estruturais solúveis em solventes orgânicos neutros ou água. Estes compostos extracelulares e de baixo peso molecular consistem em ambos os tipos lipofílicos (por exemplo, ácidos resínicos, gorduras e ceras) e hidrofílicos (por exemplo, compostos fenólicos e estilbenos) (Sorek et al., 2014).

A matriz lignocelulósica é disposta em estruturas progressivamente mais complexas com escala crescente, desde o agrupamento de cadeias individuais de celulose, até a estrutura macroscópica das plantas.

A celulose está presente principalmente em uma estrutura cristalina que é intercalada por algumas regiões paracristalinas ou amorfas desorganizadas. A celulose cristalina existe na forma de microfibrilas insolúveis, que são compostas de aproximadamente 24 cadeias de celulose paralelas ligadas por hidrogênio (Fernandes et al., 2011). As ligações de hidrogênio inter e intra-moleculares entre as moléculas de glicose mantêm as correntes retas e empilhadas em uma estrutura semelhante a uma folha, unidas pelas forças de van der Waals (Sorek et al., 2014). Geralmente, as fibrilas de celulose são revestidas com hemicelulose, que funciona como um agente de reticulação, além de microfibrilas de ligação, lignina, proteínas, pectinas e polissacarídeos não-estruturais através de uma variedade de interações covalentes e não-covalentes, para formar a camada rígida estrutural da parede celular (Sorek et al., 2014).

A parede celular das plantas possuem tipicamente uma estrutura de múltiplas camadas composta de três tipos de camadas, a lamela média, a parede primária e a parede secundária, sendo a última dividida em três subcamadas (S1, externa; S2, média; e S3, interior). Essas camadas diferem uma da outra em sua composição química, bem como em sua estrutura e podem variar em diferentes espécies (Zhao, Zhang e Liu, 2012).

2.4. Produção de etanol de biomassas lignocelulósicas

O etanol de segunda geração é baseado no uso de material lignocelulósico de resíduos agrícolas, florestais e urbanos, e são constituídos principalmente por lignocelulose e hemicelulose. A conversão da biomassa lignocelulósica em biocombustíveis, pode ser alcançada por meio de rotas de processamento bioquímico e termoquímico (por exemplo, gaseificação ou pirólises) (Balan, 2014). Como ainda não há uma solução universal para os desafios associados à natureza recalcitrante da biomassa lignocelulósica na produção de biocombustíveis, várias tecnologias de conversão foram exploradas em muitas configurações, cada abordagem tendo suas vantagens e desvantagens.

As rotas de conversão bioquímica dependem de biocatalizadores, como enzimas e células microbianas, para converter a biomassa lignocelulósica em um composto misto de açúcar, que pode então ser fermentado para produzir etanol. O processo de conversão de biomassa para etanol geralmente consiste em quatro operações principais: pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e recuperação do produto (Galbe e Zacchi, 2012).

O pré-tratamento a vapor pode ser usado para decompor a matriz lignocelulósica da biomassa e solubilizar grande parte das hemiceluloses para fornecer açúcares monoméricos, a fim de facilitar a hidrólise enzimática subsequente. O líquido pré-tratado pode ser hidrolisado enzimaticamente separadamente da etapa de fermentação, conhecida como hidrólise e fermentação separadas (SHF), ou na presença do microrganismo fermentativo, conhecido como sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) (Bondesson e Galbe, 2016). O produto é recuperado a partir do vinho de fermentação usando destilação e adsorção de peneira molecular para obter etanol anidro. A vinhaça da destilação

pode ser queimada no local para produzir vapor, calor e eletricidade, ou convertido em vários co-produtos. O licor restante da produção é parcialmente reciclado para diluir a pasta pré-tratada antes do SSF, enquanto o restante pode ser digerido anaerobicamente para produzir biogás.

2.5. Pré-tratamento

O pré-tratamento é o primeiro passo necessário no processo de produção de etanol 2G, a fim de quebrar a matriz lignocelulósica recalcitrante da biomassa nativa e facilitar a liberação de açúcares fermentescíveis na hidrólise enzimática subsequente. No entanto, há muitos gargalos na escolha da técnica de pré-tratamento. O pré-tratamento não apenas é considerado a etapa mais cara do processo, mas também afeta o desempenho e o custo de praticamente todas as outras operações no esquema de conversão, desde a escolha da matéria-prima e redução de tamanho, passando pela hidrólise e fermentação enzimática até a recuperação e utilização dos co-produtos (Yang e Wyman, 2008). Assim, os seguintes fatores-chave devem ser considerados para garantir um pré-tratamento economicamente viável:

- um alto rendimento da fração celulósica facilmente digerível para aumentar a taxa e a extensão da hidrólise enzimática subsequente;
- alta recuperação geral de açúcares;
- formação mínima de inibidores;
- fracionamento e recuperação eficientes dos vários componentes da biomassa;
- baixo custo de capital (por exemplo, um reator com um volume mínimo, feito de materiais de construção com preços moderados);
- baixos custos operacionais (por exemplo, eliminação da necessidade de redução extensiva do tamanho da matéria-prima, requisitos mínimos de calor e energia, necessidade mínima e produtos químicos baratos).

Embora vários pré-tratamentos diferentes, envolvendo processos biológicos, físicos e químicos, ou uma combinação destes, tenham sido propostos e estudados

para uma ampla gama de matérias-primas lignocelulósicas, atualmente apenas alguns alcançam os altos rendimentos de açúcares com custo suficientemente baixo para ser considerado atraente para escalas comerciais (Alvira, Ballesteros e Negro, 2010; Galbe e Zacchi, 2012).

Existem diversos pré-tratamentos com diferentes efeitos e rendimentos e a escolha do mais adequado depende da biomassa empregada. Podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, além da combinação entre eles (Moon et al., 2011). Os pré-tratamentos físicos, como a moagem e a extrusão não alteram a composição da biomassa, mas alteram a sua estrutura por meio do aumento da área superficial e redução da cristalinidade. Pré-tratamentos alcalinos, oxidativos, biológicos podem remover principalmente a fração da lignina, logo a biomassa será composta majoritariamente por hemicelulose e celulose ao final do processo. Os pré-tratamentos ácidos, explosão a vapor e hidrotérmico removem as hemiceluloses para a corrente líquida e forma uma corrente sólida rica em celulose e lignina, também chamada de celulignina (Moro, 2015).

O pré-tratamento à vapor parece ser a tecnologia escolhida para várias instalações avançadas de etanol utilizando matérias-primas agrícolas (Brethauer e Studer, 2015), enquanto apenas alguns métodos, incluindo pré-tratamento a vapor catalisado por ácido, alcalina ou sulfito e o pré-tratamento com organossolve, mostraram ser adequado para madeiras macias (Kandhola et al., 2017; Zhu e Pan, 2010).

2.5.1. Explosão à vapor

O pré-tratamento à vapor resulta em altos rendimentos em uma ampla gama de substratos, a um custo suficientemente baixo para ser economicamente viável. Pré-tratamento à vapor (também conhecido como explosão a vapor) refere-se à técnica em que a biomassa lignocelulósica é rapidamente aquecida por vapor de alta pressão, com ou sem a adição de um catalisador ácido, e mantida sob pressão por um certo período de tempo (segundos a minutos), antes da liberação da pressão (Grous, Converse e Grethlein, 2000). Este processo proporciona uma fração insolúvel em água, rica em celulose e lignina, passível de hidrólise enzimática, bem

como uma alta recuperação de hemicelulose, que é essencial para a utilização eficiente de todos os açúcares presentes na matéria-prima.

Outra vantagem do pré-tratamento à vapor é produzir materiais de alta consistência, pois é possível a injeção direta de vapor em uma matéria-prima de biomassa seca. Além disso, matérias-primas com ampla faixa de tamanhos de partículas e umidade podem ser tratadas (Olsen, Arantes e Saddler, 2015), e a carga química do catalisador é geralmente baixa (menos de 5% do peso seco da biomassa) (Galbe e Zacchi, 2012).

O objetivo do pré-tratamento a vapor é facilitar a conversão enzimática da celulose e recuperar tanto quanto possível a hemicelulose na forma monomérica, com a menor concentração de inibidores. Este é um dos principais desafios, pois é necessário um pré-tratamento de severidade mais alto para produzir uma fração de celulose prontamente hidrolisável em baixas cargas enzimáticas, mas isso também leva a considerável degradação dos açúcares hemicelulósicos. A adição de um catalisador ácido, como SO_2 ou H_2SO_4 , mostrou ser benéfica na promoção da hemicelulose e hidrólise da celulose, com limitada degradação de carboidratos (Shen et al., 2011).

2.5.2. Mecanismo do pré-tratamento à vapor

O pré-tratamento à vapor aumenta a suscetibilidade dos materiais lignocelulósicos à hidrólise enzimática, alterando sua organização estrutural e composicional. Do ponto de vista composicional, a lignina e a celulose são retidas na fração sólida, enquanto as hemiceluloses são solubilizadas. A quebra física da estrutura lignocelulósica é causada pela expansão adiabática da água absorvida e reações de hidrólise envolvendo os componentes da parede celular (Tanahashi, 1983). O pré-tratamento a vapor abre a estrutura da parede celular e torna uma área superficial maior acessível às enzimas, reduzindo o tamanho da fibra (fragmentação), removendo a hemicelulose e redistribuindo a lignina (Galbe e Zacchi, 2012).

Embora o pré-tratamento à vapor não remova a lignina, sua reorganização física também influencia a receptividade do material pré-tratado à hidrólise

enzimática, bem como a adequação da lignina remanescente para aplicações de co-produto (Li, Henriksson e Gellerstedt, 2007). A lignina parece circular entre a fase sólida e líquida durante o pré-tratamento à vapor através de um mecanismo complexo que pode envolver transição de fase, reações de despolimerização, repolimerização e/ou solubilização, o que resulta em alterações morfológicas e químicas (Trajano, H., 2013).

Sob condições ácidas, íons intermediários de carbono, com uma alta afinidade por nucleófilos dentro da estrutura da lignina, são formados a partir de estruturas de álcool benzílico. Em estruturas β -O-4-ligadas (a ligação mais abundante que conecta unidades fenilpropano), o íon de carbono pode reagir ainda mais pela clivagem da ligação éter e fragmentação da lignina (despolimerização), ou pela formação de ligações CC estáveis com qualquer anel aromático adjacente com carbono rico em elétrons (polimerização) (Robert, 1988). É esperado que a distribuição do peso molecular da lignina diminua acentuadamente se a clivagem significativa das ligações β -O-4 for o único mecanismo. Como este não é o caso em condições típicas de pré-tratamento a vapor, a despolimerização é obviamente acompanhada por uma repolimerização abrangente, resultando em um aumento no tamanho molecular e uma estrutura da molécula mais condensada (Li, Henriksson e Gellerstedt, 2007).

2.5.3. Inibidores

A existência de reações colaterais que resultam em subprodutos derivados da lignocelulose, muitas das quais são inibitórios nos processos bioquímicos seguintes, são inevitáveis durante o pré-tratamento. A quantidade e variedade dos produtos de degradação formados estão diretamente relacionados ao tipo de biomassa, ao método de pré-tratamento e às condições de pré-tratamento (Jönsson e Martín, 2016). Por exemplo, os principais produtos de degradação do pré-tratamento com vapor catalisado por ácido são geralmente divididos em 3 categorias com base em sua origem: derivados de furano, ácidos fracos e compostos fenólicos. O aumento da severidade do pré-tratamento promove a degradação de açúcares solubilizados (principalmente hemicelulósicos) em derivados de furano (por exemplo, furfural e 5-

hidroximetil furfural), ou ainda em produtos secundários de degradação (por exemplo, ácido levulínico e ácido fórmico).

Temperatura, tempo de residência e pH são considerados os parâmetros mais importantes, sendo os principais responsáveis pela liberação e produção de compostos inibidores da hidrólise e, principalmente, da fermentação. O teor de umidade e o tamanho das partículas de biomassa podem afetar a eficácia do pré-tratamento, mas com menor magnitude (Öhgren et al., 2007).

O ácido acético e os ácidos urônicos não são produtos de degradação do açúcar, mas são liberados como resultado da hidrólise da hemicelulose. Um grande número de compostos fenólicos também é liberado pela quebra parcial da lignina. Como alguns dos extrativos são compostos fenólicos, alguns dos fenóis nos hidrolisados lignocelulósicos são provavelmente originários destes compostos (Hallac e Ragauskas, 2011). Além dos compostos fenólicos, vários compostos aromáticos não fenólicos (por exemplo, ácido benzóico, álcool benzílico) também são encontrados em hidrolisados lignocelulósicos (Jönsson e Martín, 2016). A formação de benzoquinonas (por exemplo, hidroquinona e catecol) a partir de compostos fenólicos é provável que ocorra durante o pré-tratamento (Stagge, Cavka e Jönsson, 2015). Embora a formação de produtos de degradação possa ser minimizada através da otimização do pré-tratamento, os seus efeitos inibidores em enzimas e microrganismos de fermentação tornam-se mais aparentes com carga elevada ou quando se acumulam devido recirculação da água de processamento. Embora os mecanismos sejam diferentes e dependam da estrutura química dos inibidores, os produtos de degradação afetam a fisiologia celular do microrganismo fermentador, freqüentemente resultando em menor viabilidade celular, produção de etanol e produtividade (Zaldivar, Nielsen e Olsson, 2001).

Além dos óbvios problemas de inibição na bioconversão subsequente, o pré-tratamento tem impactos de longo alcance em todas as principais operações no processo. Por exemplo, a concentração de sólidos durante o pré-tratamento determina a concentração potencial dos açúcares liberados e, portanto, a concentração final de etanol, que por sua vez afeta o tamanho requerido do reator de fermentação e o custo da energia para a recuperação do produto. Além disso, a distribuição de açúcares entre as formas monomérica e oligomérica na fase líquida

pode afetar o organismo fermentador, bem como as enzimas, enquanto o pré-tratamento também determina quanto da lignina, e outras frações de biomassa, podem ser recuperadas, e sua adequação para posterior utilização de co-produtos (Bondesson, 2016). Portanto, todo o processo deve ser considerado quando o desempenho do pré-tratamento é avaliado.

2.6. Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática eficiente do material pré-tratado requer várias enzimas diferentes que atuam sinergicamente para decompor a estrutura química da biomassa lignocelulósica. Os coquetéis de enzimas comerciais mais usados são produzidos pelo fungo *Trichoderma reesei*, geneticamente modificado para aumentar a produção de enzimas (Karimi e Taherzadeh, 2016).

O processo de hidrólise enzimática é normalmente realizado a um pH de 4,5 - 5,0 e temperaturas no intervalo de 40 a 50°C. O coquetel de enzimas ótimo, isto é, as enzimas necessárias nas concentrações mais baixas possíveis em proporções ótimas, deve ser especificamente adaptado para uma determinadas matérias-primas, pré-tratada com um determinado método em função de um maior rendimento deste processo (Frankó et al., 2017).

As celulases compreendem endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases, que despolimerizam sinergicamente a celulose pela hidrólise das ligações glicosídicas em diferentes regiões da celulose. Enquanto as endoglucanases atacam aleatoriamente a celulose que cria as extremidades da cadeia livre, as celobiohidrolases clivam a celobiose do final das cadeias de celulose de uma maneira processual (Kostylev e Wilson, 2012).

As celodextrinas solúveis e a liberação de celobiose são depois hidrolisadas em glicose pelas β -glucosidases. Benefícios significativos também podem ser obtidos pela inclusão de enzimas, como hemicelulases e pectinases, que hidrolisam os polissacarídeos não-celulósicos (Hu, 2015). As hemicelulases representam um número muito grande de diferentes atividades enzimáticas que podem ser divididas em enzimas despolimerizantes (por exemplo, endo-xilanases, β -xilosidase, endo-mananase e β -manosidase), que clivam o esqueleto da hemicelulose e enzimas de desramificação (por exemplo, α -l-arabinofuranosidases, α -glucuronidase,

esterases), que removem os substituintes ligados às cadeias principais. Enzimas hidrolíticas, como celulasas e hemicelulasas, também são suplementadas com mono-oxigenases polissacarídicas líticas (LPMOs) para aumentar ainda mais a degradação sinérgica de componentes de biomassa lignocelulósica (Eibinger, 2014).

LPMOs são metaloenzimas que clivam a celulose usando um mecanismo envolvendo oxigênio molecular e um doador de elétrons, o que leva à oxidação de um dos carbonos nas ligações glicosídicas, isto é, oxidação de C1 ou C4 (Eibinger, 2014). Além de enzimas hidrolíticas e LPMOs, uma terceira classe de proteínas não-hidrolíticas tem sido implicada na despolimerização da biomassa (Arantes e Saddler, 2010). Essas proteínas "disruptivas" ou "indutoras da amorfogênese" parecem ser capazes de afrouxar ou romper fibrilas celulósicas sem liberar açúcares solúveis, aumentando assim a acessibilidade da celulose às enzimas (Saloheimo, 2002).

Os fatores que influenciam a taxa e extensão da hidrólise enzimática podem ser divididos em características de substrato (por exemplo, composição, tamanho de partícula, DP, cristalinidade, área de superfície acessível), características enzimáticas (por exemplo, sinergismo, adsorção, inibição) e fatores físicos (pH e temperatura), embora muitos desses fatores estejam inter-relacionados (Mansfield, Mooney Saddler, 1999).

2.7. Microrganismos fermentadores

As leveduras possuem grande importância na fermentação de novas fontes de energia. Algumas espécies estão sendo atualmente estudadas e analisadas para a produção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos (Johnson e Echavarri-erasun, 2011).

Na produção de etanol de primeira geração, a partir do caldo rico em glicose, assim como a produção de etanol de segunda geração, a partir de biomassas de composição lignocelulósicas, a via fermentativa é a mais importante para a obtenção de etanol no Brasil. Um dos fatores que torna a produção de etanol por fermentação a forma mais econômica de sua obtenção, é o grande número de matérias-primas naturais e residuais, como o bagaço de cana-de-açúcar, existentes em todo país (Pereira et al., 2008).

Desde há milhares de anos, leveduras como a *S. cerevisiae* têm sido utilizadas na produção de álcool, especialmente nas indústrias cervejeira e vinícola. Este microrganismo proporciona um altos rendimentos de etanol, alta produtividade e pode suportar concentrações elevadas de etanol (Oberoi et al., 2012). Atualmente, as leveduras são usadas para gerar etanol combustível a partir de fontes renováveis de energia. Certas cepas de levedura, como *P. stipitis* (NRRL-Y-7124), *S. cerevisiae* (RL-11) e *Kluyveromyces fragilis* (Kf1) foram relatadas como boas produtoras de etanol a partir de diferentes tipos de açúcares (Hu et al., 2012).

Para tornar viável a produção de etanol de segunda geração, estudos têm sido feitos na identificação de linhagens de leveduras que sejam termotolerantes, tolerantes ao etanol, resistentes a inibidores liberados durante o pré-tratamento do material lignocelulósico e capazes de utilizar um amplo espectro de substratos, produzindo grandes quantidades de etanol na temperatura ótima para a realização da sacarificação.

Há desafios comuns às leveduras durante a fermentação do açúcar, que aumentam a temperatura (35 - 45 ° C) e a concentração de etanol (acima de 20%). A taxa de crescimento de leveduras e o metabolismo aumentam à medida que a temperatura aumenta até atingir o valor ideal. O aumento na concentração de etanol durante a fermentação pode causar inibição do crescimento e diminuição da viabilidade de microrganismos. A incapacidade de *S. cerevisiae* de crescer em meio contendo alto nível de álcool leva à inibição da produção de etanol (Azhar et al., 2017).

Leveduras industriais devem detectar e responder rapidamente às condições de estresse, adaptando-se aos fatores ambientais adversos por meio do ajuste de suas atividades metabólicas a fim de evitar uma perda substancial de viabilidade. A capacidade de tolerar vários estresses é um dos importantes critérios para selecionar uma linhagem que seja eficiente no processo fermentativo (Zhao, Zhang e Liu, 2012).

2.7.1. Leveduras

As leveduras são definidas como fungos ascomicetos ou basidiomicetos que são capazes de se reproduzir por brotamento ou fissão e formar esporos que não

estão contidos em um corpo frutífero. As subdivisões taxonômicas mais baixas (famílias, subfamílias, gêneros, espécies e estirpe) são determinadas pelas suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas, incluindo a reprodução sexual (Kurtzman, 2011).

O número de leveduras descobertas tem aumentado de ano para ano, supõe-se que apenas 1% das espécies de leveduras sejam conhecidas atualmente. Espera-se que o número total de espécies de leveduras na Terra seja maior que 150.000 (Barriga, 2011). Há uma ampla diversidade de células de levedura, incluindo seu tamanho, forma e cor. O tamanho das células das leveduras é influenciado pela sua espécie e condição de crescimento. O comprimento de algumas células de levedura é de apenas 2 a 3 μm , enquanto as outras espécies podem atingir o comprimento de 20 a 50 μm (Barriga, 2011). A maioria das leveduras tem uma largura na faixa de 1 a 10 μm . (Lopes et al., 2017).

A diversidade de espécies de leveduras em determinados nichos é determinada pela sua capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono e sua seletividade nutricional, uma vez que exibe grande especialização para o habitat. As leveduras podem ser isoladas do ambiente terrestre, aquático e aéreo. A planta é o habitat preferido da comunidade de leveduras. Algumas espécies são encontradas para ter comensalismo ou relações parasitárias com animais. Ambientes extremos como baixo potencial de água (alta concentração de açúcar ou sal) e baixa temperatura podem ser habitados por leveduras (Azhar et al., 2017).

As leveduras possuem uma história muito importante no desenvolvimento de biotecnologias, tendo grande importância em processos fermentativos da indústria alimentícia, farmacêutica e química (Johnson e Echavarri-Erasun, 2011; De Abreu et al. 2015).

Vários fatores afetam a atividade das leveduras dentre eles: fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana), reduzindo o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol (Lima et al., 2001).

2.8. Fermentação

A solubilização das frações de celulose e hemiceluloses pelo pré-tratamento e hidrólise enzimática resultam em uma mistura de açúcares de hexoses (glicose, galactose e manose) e pentoses (xilose e arabinose), juntamente com uma ampla gama de compostos possivelmente com efeitos inibitórios para o microrganismo usado para fermentação. Este fato, coloca demandas extras sobre os microrganismos fermentadores, em comparação com a produção de etanol de primeira geração, para alcançar alto rendimento de etanol e produtividade, que são necessários para minimizar o impacto da etapa de fermentação nos custos de capital e operacionais (Nogué e Karhumaa, 2015).

A conversão fermentativa de biomassas para etanol de primeira geração visa a fermentação de glicose, porém os açúcares disponíveis na biomassa lignocelulósica diferem muito dos substratos do processo de 1G. Embora a fermentação de glicose eficiente ainda seja um aspecto central, o material lignocelulósico também contém quantidades consideráveis de pentoses, principalmente xilose, mas também arabinose. Com isso, dada a importância de se obter altos rendimentos e altas concentrações de etanol após a fermentação, é importante acessar e converter a quantidade abundante de xilose presente em resíduos agrícolas (Robak e Balcerek, 2018).

Cepas de *S. cerevisiae* são as mais utilizadas industrialmente para produzir etanol a partir de hexoses, proporcionando altos rendimentos e produtividades, além de alta tolerância ao etanol e alta pressão osmótica (Azhar et al., 2017). A produção em larga escala de etanol com *S. cerevisiae* é normalmente realizada a um pH em torno de 5 e a temperatura de 30°C sob condições anaeróbicas (1 mol de glicose é convertido em 2 moles de etanol, o que também resulta na produção líquida de 2 moles de CO₂ e ATP).

Para a realização de seus processos metabólicos as leveduras requerem que elementos químicos específicos estejam presentes no meio (Chieppe Junior, 2012). Para que possam crescer e se desenvolver dentro do processo fermentativo, é necessário que além de fontes de carbonos assimiláveis, vitaminas e nutrientes estejam disponíveis no ambiente de cultivo e fermentação, tais como: nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, manganês, zinco, ferro, cobalto, enxofre, cálcio, cobre,

iodo; entre outros elementos em pequenas quantidades (Pavani et al., 2013). A ausência de alguns destes nutrientes pode afetar diretamente a velocidade da fermentação (Silva, 2010).

A seleção de um microrganismo fermentador apropriado e a estratégia de fermentação, é uma importante etapa para induzir a conversão eficiente de açúcares derivados de lignocelulose em etanol. *S. cerevisiae* não é capaz de utilizar açúcares como as pentoses para a produção de etanol, o que é necessário quando se utiliza matérias-primas lignocelulósicas, como resíduos agrícolas contendo grandes quantidades de xilana. Devido à sua base industrial robusta, *S. cerevisiae* foi um alvo óbvio para a adaptação por engenharia metabólica e procedimentos clássicos, como a mutagênese aleatória. A introdução da via de fermentação da xilose em *S. cerevisiae* tem sido abordada pela expressão heteróloga de genes que codificam a xilose isomerase de bactérias, ou genes que codificam a xilose redutase e xilitol desidrogenase de fungos (Nielsen e Olsson, 2001). Além da modificação genética, as cepas de *S. cerevisiae* modificadas podem ser mais desenvolvidas (por exemplo, aumento da tolerância a inibidores) usando estratégias de engenharia evolucionárias (Demeke et al., 2013), ou adaptadas a um determinado hidrolisado lignocelulósico (por cultivo local no hidrolisado líquido) para melhorar o desempenho em um ambiente altamente inibitório (Nielsen et al., 2015).

2.8.1. Fermentação de Hexoses e Pentoses

Os processos biotecnológicos que utilizam materiais lignocelulósicos, requerem etapas preliminares de preparação, tais como pré-tratamento, hidrólise química ou enzimática, a fim de liberar os componentes das frações de celulose e hemicelulose na forma de mono. ou oligossacidos. O alto conteúdo de pentoses, particularmente a D-xilose na fração hemicelulósica desses materiais, combinado com sua fácil extração do complexo lignocelulósico, tem atraído a atenção dos pesquisadores para o uso efetivo dessa fração nos processos fermentativos (Guedes et al., 2011).

Altas taxas de glicose são facilmente convertidas por linhagens de *S. cerevisiae*, até mesmo em condições aeróbicas. Entretanto, *S. cerevisiae* são

incapazes de assimilar ou fermentar xilose, o principal constituinte da fração hemicelulósica da biomassa.

As espécies *Pachysolen tannophilus* e *Candida tropicalis* (Gong et al., 1981), foram umas das primeiras a serem descritas como fermentadoras de xilose. Pesquisas posteriores demonstraram que outras espécies de leveduras também são capazes de fermentar xilose em etanol, incluindo diversas espécies dos gêneros *Pichia* e *Candida* bem como algumas linhagens de *Kluyveromyces marxianus* (Hu et al., 2012). Cadete et al., (2017) descreveram uma nova espécie de levedura fermentadora de D-xilose, isolada de madeira em decomposição, nomeada *Spathaspora arborariae*.

Muitos avanços foram alcançados na engenharia genética de leveduras e bactérias para a fermentação de xilose e arabinose em etanol e outros produtos como o ácido láctico. No entanto, a bioconversão de pentoses a etanol é ainda considerada um desafio econômico e tecnológico. É essencial que tanto a glicose quanto a xilose presente na biomassa lignocelulósica possam ser fermentadas em etanol, para que esses recursos renováveis possam ser usados como matéria-prima para a produção de combustível renovável de uma forma rentável (Nielsen et al., 2015).

Além da busca por isolamentos de espécies naturais com capacidade de fermentação de pentoses, os problemas de fermentação desta fermentação podem ser solucionados com o uso de híbridos, engenharia genética ou co-cultura de duas linhagens de levedura. As estirpes híbridas de levedura são utilizadas simultaneamente para fermentar açúcares pentoses e hexoses em etanol. Uma cepa híbrida foi desenvolvida pela fusão de protoplasto de *S. cerevisiae* e leveduras fermentadoras de xilose como *P. tannophilus*, *C. shehatae* e *P. stipitis* (Nogué e Karhumaa, 2015).

Diversos microrganismos que são conversores naturais de xilose ou que foram geneticamente modificados são considerados como fermentadores para a produção de etanol. Incluem, entre outras, as leveduras *S. cerevisiae* (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Nevoigt, 2008), *Scheffersomyces stipitis* (Bajwa et al., 2011) e *Dekkera bruxellensis* (Blomqvist et al., 2010) e a bactéria *Escherichia coli* (Jarboe et al., 2007). Todos os potenciais candidatos têm vantagens e desvantagens em

relação à sua capacidade de converter uma variedade de açúcares, tolerância de inibidores, produtividade, produção de etanol, crescimento e capacidade de sustentar a viabilidade sob condições anaeróbicas.

2.9. Termotolerância

A capacidade de manter a homeostase funcional apesar das alterações nos ambientes externos é essencial para a sobrevivência dos microrganismos. Dentre os fatores que afetam o crescimento e a sobrevivência destes, a temperatura é um dos mais importantes. Microrganismos fermentativos para a produção de alimentos, especialmente leveduras, bactérias lácticas e bactérias aceto ácidas, são encontrados principalmente em habitats naturais e utilizados em atividades humanas, estes microrganismos funcionam naturalmente em ambientes mesofílicos. No entanto, geralmente estes microrganismos são expostos a temperaturas mais elevadas, devido ao calor fermentativo gerado durante o processo de fermentação ou devido ao aumento da temperatura ambiente (Kurtzman, 2011).

A fermentação industrial é realizada em fermentadores fechados, que geram muito calor e, portanto, requerem um rigoroso controle de temperatura. No entanto, esses sistemas às vezes experimentam falhas de fermentação devido a aumentos temporários de temperatura que ocorrem devido a falhas de energia, defeitos mecânicos ou erros do operador durante o processo de fermentação. O aquecimento global afeta processos de fermentação em larga escala e exige o uso de mais microrganismos termotolerantes para alcançar uma fermentação estável (Techaparin, Thanonkeo e Klanrit, 2017).

As leveduras são de natureza mesofílica. Quando cultivadas além das temperaturas ótimas, as leveduras apresentam morfologia e fisiologia alteradas de várias maneiras. O crescimento e metabolismo de leveduras a várias temperaturas é determinado pela composição genética da estirpe de levedura, a composição do meio de cultura e outros parâmetros de crescimento. O acúmulo de metabólitos de levedura, tanto dentro como fora da célula, pode ter um efeito sobre a sensibilidade da levedura à temperatura. A temperatura ótima das leveduras varia com as espécies. Termotolerância é a capacidade transitória de células de levedura para sobreviverem a temperaturas mais elevadas. As cepas de leveduras termotolerantes

podem sobreviver a temperaturas acima de 40°C (Limtong, Srisuk e Yongmanitchai, 2005).

Atualmente a maior parte do etanol é produzida usando microrganismos mesofílicos. No entanto, as leveduras termotolerantes recebem considerável interesse devido aos desafios atuais de aumento da temperatura, o que poderia potencialmente superar muitos obstáculos. O uso de leveduras termofílicas/termotolerante para a produção de bioetanol tem várias vantagens de processo, incluindo ampla faixa de utilização de substrato, maiores taxas de sacarificação e fermentação, minimização do risco de contaminação, menores custos de bombeamento e agitação, sem problemas de refrigeração, menos necessidade de energia para mistura e recuperação de produtos (Limtong, Srisuk e Yongmanitchai, 2005).

A temperatura é um dos fatores mais importantes da fermentação. O estudo e conhecimento desta grandeza é de suma importância, pois exerce efeitos no crescimento, viabilidade, metabolismo e fermentação das leveduras. Na literatura, encontram-se divergências sobre a definição de seu valor ótimo na fermentação (Souza, 2005). Segundo Sousa e Monteiro (2011) a temperatura deve ser controlada entre 25 à 30°C; entretanto segundo Mello (2012) a temperatura deve ser estar entre 28°C e 32°C.

Atualmente, a produção de etanol responde pela produção de bilhões de litros de etanol por ano do milho (EUA) e cana-de-açúcar (Brasil). No entanto, o uso de leveduras fermentadoras termotolerantes pode melhorar sua eficiência permitindo que a fermentação ocorra em temperaturas acima de 40°C usando a tecnologia SSF. Durante as últimas décadas, muitos estudos relataram a seleção de cepas de levedura termotolerantes capazes de fermentar em altas temperaturas, que são consideradas adequadas para a produção de etanol por SSF (Choudhary, Singh e Nain, 2016).

Estudos também mostraram que condições de estresse podem induzir tolerância a altas temperaturas em *S. cerevisiae*, no entanto, se a levedura adaptada é cultivada em condições normais/ótimas, esta termotolerância pode ser perdida. Em um estudo recente, cepas de *S. cerevisiae* termotolerantes isolados por adaptação fisiológica (evolução adaptativa) a temperaturas $\geq 40^{\circ}\text{C}$ apresentaram

uma composição de esterol alterada. A modificação na composição de esterol das cepas de levedura foi considerada para manter a fluidez da membrana celular em altas temperaturas, resultando no aumento da termotolerância (Yuangsaard e Yongmanitchai, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi realizada em duas etapas. A primeira, que compreendeu a fase de implantação da cultura, colheita, moagem e secagem dos bagaços, na Universidade Estadual Paulista - Departamentos de Tecnologia e de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, campus de Jaboticabal – São Paulo, Brasil. A segunda etapa, que abrangeu as fases de caracterização das biomassas, pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentações, foi conduzida no Departamento de Engenharia Química, na Universidade de Lund - Lund, Skane, Suécia.

3.1. Instalação e condução do ensaio

Neste estudo foram utilizados dois genótipos de sorgo sacarino, o Malibu J53 e Malibu A1001, e um genótipo biomassa, Palo Alto (N52K1009). Estes foram cultivados na área experimental do departamento de Produção Vegetal da FCAV/UNESP – Jaboticabal (21°14'33.9"S 48°17'57.6"W), na safra 2016/2017, com plantio em 16 de dezembro do ano de 2016 e colheita em maio de 2017. O município de Jaboticabal localiza-se a nordeste do Estado de São Paulo, com altitude média de 583 metros. O solo da área experimental é Latossolo vermelho-escuro, eutrófico, "A" moderado com textura argilosa e relevo predominantemente suave ondulado a ondulado.

O experimento foi conduzido em campo, no período de 16 de novembro de 2016 a 4 de maio de 2017. A cultura foi instalada no sistema de plantio direto e a semeadura foi realizada por uma semeadora/adubadora de 5 linhas, as sementes foram fornecidas pela empresa Nexsteppe. A profundidade de semeadura foi de 3 a 4 cm, utilizando-se de 6 a 7 sementes por metro, com espaçamento de 0,45 metro entre linhas, resultando num estande final de 120.000 a 130.000 plantas/ha. A adubação do plantio constituiu-se da aplicação de 36-126-72 kg. ha⁻¹ de N-P₂O₅-K₂O, utilizando-se 450 kg.ha⁻¹ da fórmula 8-28-16 mais micronutrientes. Aos 28 dias após a semeadura (d.a.s.). foi realizada a primeira adubação de cobertura aplicando-se 45-0-45 kg/ha de N-P₂O₅- K₂O, com o emprego de 225 kg/ha da fórmula 20-0-20. Aos 62 d.a.s., foi realizada a segunda adubação de cobertura utilizando-se 45 kg de N/ha (Uréia).

Durante o experimento, o tratamento fitossanitário foi priorizado, objetivando-se garantir a sanidade da cultura. Para controle de formigas no período inicial de desenvolvimento da cultura, foram realizadas aplicações periódicas de inseticida Regente 800 WG. Para o controle da lagarta do cartucho e de pulgões, aplicou-se 250 mL/ha de Tiametoxam/Lambda cialotrina (Engeo Pleno) aos 27 e 57 d.a.s. Realizou-se ao longo de todo o ciclo da cultura a capina manual, roçadora e aplicação de Atrazina, mantendo a plantação livre de plantas infestantes.

3.2. Matérias-primas

O sorgo sacarino Malibu J53 apresenta ciclo que possibilita colheita entre 90 e 120 dias, seus colmos são ricos em caldo com elevados teores de açúcares fermentescíveis. Esse híbrido é tolerante ao calor e seca e resistente as mudanças climáticas. Tem potencial para produção de etanol que pode chegar a 3 mil L/ha (Nexsteppe, 2017).

O sorgo sacarino Malibu A1001 apresenta ciclo tardio, com ponto de colheita de 110 a 130 dias após plantio, elevado desempenho e rendimento em ambientes tropicais, possibilitando o cultivo durante todo o ano. Possui alto crescimento vegetativo com acúmulo de açúcares na fase final do ciclo (Nexsteppe, 2017).

O sorgo biomassa Palo Alto N52K1009 apresenta porte elevado, quando comparado ao sorgo sacarino, com altura superior a 3 metros. Atinge o ponto de colheita entre 120 e 140 dias, apresentando alto rendimento tanto na safra quanto na safrinha. Os colmos são grossos e fibrosos, porém as panículas são pequenas e a produção de grãos é baixa. Com alta quantidade de biomassa, o sorgo Palo Alto N52K1009 apresenta alto rendimento e baixo custo para a produção de bioenergia, incluindo biogás e biocombustíveis celulósicos (Nexsteppe, 2017).

No estágio de maturação, foram coletados 30 colmos limpos de cada genótipo, sem a presença das folhas e panículas (Ferreira, 2015). Estes foram encaminhados para o Laboratório de Tecnologia do Açúcar e Álcool e Microbiologia das Fermentações FCAV-UNESP, sendo pesados e submetidos à extração do caldo utilizando-se de moenda de laboratório. Após moagem, os bagaços desintegrados, com uso de aparelho desintegrador, objetivando a diminuição das fibras, através de facas picadoras. Em seguida, os materiais foram secos e mantidos em casa de

vegetação com temperatura variando de 24 - 36° C. Após isso, os materiais foram acondicionados e enviados para o Departamento de Engenharia Química da Universidade de Lund, na Suécia, para caracterização da composição dos bagaços e aplicações no processo de pré-tratamento e subsequente hidrólise enzimática e fermentação.

3.3. Microrganismos

Na presente pesquisa foram avaliadas as capacidades fermentativas de duas diferentes leveduras: a *Pichia kudriavzevii* LJ03, a estirpe LJ04. A estirpe *P. kudriavzevii* LJ03, identificada por Freita (2017) e a estirpe LJ04, foram isoladas do ecossistema de produção de sorgo sacarino e fazem parte do banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Tecnologia, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Jaboticabal-SP.

Para a reativação das culturas (*P. kudriavzevii* LJ03 e LJ04), as mesmas foram transferidas para placas de petri estéreis, contendo 5 mL de meio GYMP (20g L⁻¹ de xilose - 5g L⁻¹ extrato de levedura - 10g L⁻¹ extrato de malte - 2g L⁻¹ fosfato de sódio monobásico e 17g L⁻¹ ágar) mantidos por 72 horas a 30°C.

3.3.1. Identificação molecular da levedura isolada

A estirpe de levedura LJ04, proveniente da cultura estoque do banco de leveduras do Laboratório Microbiologia das Fermentações da FCAV/UNESP, Jaboticabal –SP, foi isolada do ecossistema de produção do sorgo sacarino. Foram realizados testes prévios de caracterização morfológicos, fisiológicos e bioquímicos desta levedura, que apresentou habilidade de metabolizar pentoses e fermentar em temperaturas elevadas (Hollupi, 2015).

O isolado LJ04 foi identificado com base em seu material genético, utilizando técnicas de biologia molecular. A extração de DNA foi realizada com o kit Reliaprep gDNA Tisse (Promega), conforme protocolo indicado pelo fabricante, e o gDNA obtido foi quantificado por espectrofotometria UV-Vis no aparelho Nanodrop (Thermo Scientific). Para a amplificação foi utilizado um par de primers degenerados desenhados para abranger a região ITS1-ITS4 (ITS1 F e ITS4 R). O fragmento

amplificado foi purificado a partir do gel de agarose 1% e o sequenciamento foi realizado por eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), utilizando o Kit BigDye® Terminator.1 Cycle Sequencing. A extração de DNA e amplificação por PCR, utilizando par de primers ITS1 e ITS4, compreendendo toda a região ITS, resultou em fragmentos bem definidos e de tamanho esperado (500-750bp) para a amostra. As bandas obtidas em gel de agarose foram cortadas e purificadas para reação de sequenciamento no equipamento ABI3500 Genetic Analyzer. As sequências geradas foram editadas para regiões de baixa qualidade (HQ).

As sequências foram alinhadas e comparadas com a base de dados NCBI utilizando a Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico (ALTSCHUL et al., 1997). As sequências foram alinhadas e comparadas com a banco de dados GenBank disponível no NCBI, utilizando a Ferramenta BLASTn, a fim de se obter a identidade do microrganismo, em nível de espécie.

3.4. Caracterização da composição química dos bagaços

Os teores de matéria seca dos materiais foram medidos secando-os em estufa a 105° C até se obter peso constante. A composição dos bagaços de sorgo foram analisadas para os carboidratos estruturais, lignina, cinzas e extrativos, de acordo com o procedimento do Laboratório Nacional de Energia Renovável (Sluiter et al., 2008b, 2010), descritos a seguir.

Para o cálculo do teor de cinzas, cadinhos de porcelana de 50 mL foram identificados e colocados em forno mufla a 575 ± 25 °C por quatro horas. Após este procedimento, os cadinhos foram removidos da mufla e colocados diretamente em um dessecados por 1 hora. Foram pesados 2,0 g das amostras de bagaço nos cadinhos, que posteriormente foram colocados novamente na mufla e submetidos a rampas de temperaturas, nas condições a seguir:

- *Rampa da temperatura ambiente para 105°C*
- *105°C por 12 minutos*
- *Rampa a 250°C a 10°C/ minuto*
- *250°C por 30 minutos*
- *Rampa para 575°C a 20°C/minuto*

- 575°C por 180 minutos

Após a temperatura da mufla ficar abaixo de 180°C, os cadinhos foram removidos e colocados em dessecador, após 1 hora, estes foram pesados novamente.

Para o cálculo do teor de cinzas temos:

$$\% \text{ cinza} = \left(\frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \right) \times 100$$

M₁: massa do cadinho calcinado vazio, em g

M₂: massa do cadinho + massa do bagaço descontando o teor de umidade, em g

M₃: massa do cadinho com cinzas, em g

Para as análises de carboidratos estruturais, inicialmente foi determinado o teor de umidade da biomassa (Sluiter et al., 2008a). O teor de umidade deve ser menor que 10%, caso contrário uma nova secagem do material deve ser realizada. Para execução do procedimento de quantificação, o material foi moído e passado por uma peneira de 20 mesh. Após isso, 300,0 mg de cada amostra de bagaço foram pesadas em tubos de pressão, descontando o teor de umidade, e adicionados 3,0 mL (ou 4,92 ± 0,01 g) de ácido sulfúrico a 72% em cada tubo. Para homegeinização da amostra foi utilizada um bastão de Teflon. Após isso, os tubos foram incubados em um banho termostático a 30 ± 3°C por 60 minutos. As amostras foram agitadas a cada 10 minutos, com o uso do bastão, sem remover a amostra do banho.

Após a conclusão da hidrólise ácida concentrada de 60 minutos, os tubos foram retirados do banho termostático, e o conteúdo dos tubos foram diluídos com 84,0 mL de água deionizada. Foi preparado um “branco” com ácido sulfúrico a 4%. As amostras foram homogeneizadas, invertendo o tubo várias vezes para eliminar a separação de fases entre as camadas ácidas de baixa concentração. Um conjunto de padrões de açúcares foram preparados para corrigir as perdas devido à destruição de açúcares durante a hidrólise ácida diluída. Os padrões continham glicose, xilose, galactose, arabinose e manose. As concentrações dos padrões de açúcares foram determinadas para se parecerem com as concentrações de açúcares

na amostra de teste. Os padrões de açúcares foram submetidos ao mesmo processo que as amostras, descritos anteriormente.

Os tubos (amostras e padrões de açúcares) foram autoclavados por uma hora a 121°C e 1,1 bar. Após a conclusão do ciclo de autoclave, os hidrolisados foram filtrados à vácuo e alíquotas de 20,0 mL de cada licor foram transferidas para um Erlenmeyer de 50 mL para a neutralização. Carbonato de cálcio foi utilizado para ajustar o pH das amostras para pH 6. Após esta etapa, as amostras foram filtradas em filtros de 0,22 µm (Milipore) para posteriormente serem análises em CLAE com um detector de índice de refração. Glicose, xilose, arabinose, galactose e manose foram separados usando uma coluna Aminex HPX-87P (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) a 85°C com uma taxa de fluxo de 0,5 mL min⁻¹ usando água como eluente.

Carboidratos:

$$\% \text{ açúcares} = \left(\frac{C_{CLAE} \cdot CA \cdot V_{filtrado}}{M1} \right) \times 100$$

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

CA: anidro correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares. Para a glicose, celobiose, xilose e arabinose temos, 0,90; 0,95; 0,88 e 0,88, respectivamente

V_{filtrado}: volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

M1: massa do bagaço utilizado na hidrólise descontado o teor de umidade, em g

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância em um espectrofotômetro UV- visível. Transferiu-se 1 mL de cada hidrolisado ácido para balões volumétricos de 100 mL que tiveram o volume aferido com água destilada. A leitura da solução foi realizada a 220 nM utilizando celas de quartzo. A leitura deve ser realizada até 6 h após hidrólise. A lignina solúvel e insolúvel, quantificadas por espectroscopia e pesagem, respectivamente, foram somadas e expressa como lignina total.

Lignina insolúvel:

$$\% \text{ lignina insolúvel} = \left\{ \left(\frac{M2}{M1} \right) \times 100 \right\} - \text{cinzas}$$

M1: massa do bagaço utilizado na hidrólise descontado o teor de umidade, em g

M2: massa de lignina insolúvel seca, em g

% cinzas: teor de cinzas determinado segundo metodologia descrita anteriormente

Lignina solúvel:

$$C_{\text{lignina solúvel}} = (41,87 \cdot (A_T - A_{PD}) - 0,3279) \cdot 10^{-3}$$

$$A_{PD} = C_1 E_1 + C_2 E_2$$

$$\% \text{lignina solúvel} = \left(\frac{C_{\text{lignina solúvel}} \cdot V_{\text{filtrado}} \cdot FD}{M_1} \right) \times 100$$

A_T : absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação a 280 nm;

A_{PD} : absorvância, a 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF) calculado através da Equação V-3, cujas concentrações C_1 e C_2 foram determinadas previamente por CLAE e E_1 e E_2 são absortividades do furfural e HMF ($146,85$ e $114,0 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

$C_{\text{lignina solúvel}}$: concentração da lignina solúvel obtido através da Equação V-2 e V-3, em g/L

V_{filtrado} : volume do hidrolisado filtrado, 0,087 L

FD: fator de diluição para leitura da absorvância, 100

M1: massa do bagaço utilizado na hidrólise descontado o teor de umidade, em g

Lignina total:

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

Para a determinação dos extrativos presentes nos materiais, primeiramente foram determinados os teores de umidade dos bagaços (Sluiter et al., 2008a). Adicionou-se aproximadamente 5 g da amostra, descontando o teor de umidade, ao cartucho de extração, tendo sua massa devidamente anotada (M_1). Após montagem do extrator, o cartucho preenchido pelo bagaço foi devidamente introduzido no tudo de extração do soxhlet. Foram adicionados 190 ± 5 mL de água destilada em cada balão do extrator juntamente com pérolas de vidro. Os balões foram colocados no

extrator e o aquecimento ajustado para que fornecesse no mínimo 10 sifonações por hora. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho de extração se tornasse incolor. Após extração em água, as amostras foram novamente submetidas à extração, utilizando aproximadamente 190 ± 5 mL de álcool etílico em cada balão do extrator. A extração foi mantida até desaparecimento total da coloração (aproximadamente 8 horas).

Ao término da extração, os sólidos foram transferidos, tão quantitativamente quanto possível, para um funil de Buchner, lavados com aproximadamente 100 mL de etanol, filtrados em multe evaporadores à vácuo e secos em uma estufa a 105°C até massa constante, determinada em balança analítica (M_2).

Para o cálculo do teor dos extrativos no bagaço a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\% \text{ extrativos} = \left(\frac{M_1 - M_2}{M_1} \right) \times 100$$

M_1 : massa do bagaço descontando o teor de umidade, em g

M_2 : massa do bagaço livre de extrativos, em g

3.5. Pré-tratamento de explosão à vapor catalisado por ácido

O pré-tratamento de explosão à vapor foi realizado utilizando ácido sulfúrico como agente de catalização. Os bagaços dos genótipos de sorgo sacarino (Malibu J53 e Malibu A1009) e sorgo biomassa (Palo Alto N52K1009) foram catalisados durante 1 hora, com solução diluída de ácido sulfúrico (0,2% em peso), na proporção de 20 g água/g de bagaço seco. O excesso de líquido dos bagaços foi removido após a catatlização em um filtro prensa (Tinkturenpressen HP5M, Fischer Maschinenfabrik GmbH, Alemanha) com uma capacidade de 5 L. A fração de massa seca após a prensa dos genótipos estava entre 35% e 40%.

A unidade de pré-tratamento (Figura 5) compreendia um reator de 10 L e um tanque coletor para o material pré-tratado. O sistema foi aquecido com vapor de uma caldeira elétrica de vapor (Pannpartner, Suécia). A pressão máxima na caldeira foi de 3 MPa, o que correspondeu a uma temperatura de vapor saturado de 235°C. O vapor foi injetado no reator através de duas válvulas esféricas acionadas a ar diferentes, uma com alto aquecimento rápido, e uma com baixa taxa de

transferência para controle de pressão e temperatura. O tempo de espera, a temperatura e a pressão no reator foram monitorados e regulados por computador.

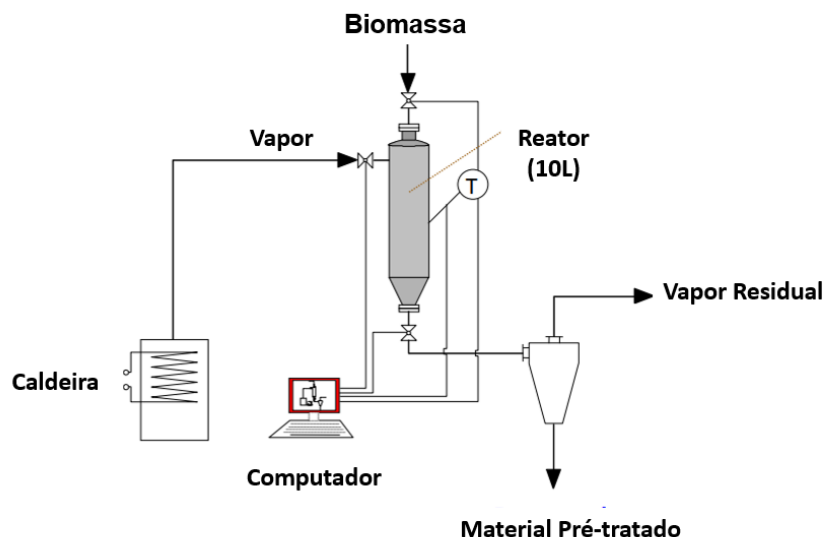


Figura 5: Esquema da estrutura da unidade de pré-tratamento de explosão à vapor. (Adaptado de Galbe et al, 2012).

Para cada genótipo, o reator foi pré-aquecido antes do pré-tratamento e carregado com bagaço de sorgo impregnado correspondendo a 400 g de matéria seca, totalizando 4 kg em total, sem a lavagem do material. As condições de pré-tratamento foram as mesmas para todos os genótipos, com vapor saturado, na condição de 190 °C por 5 min. Após pré-tratamento, a fração sólida foi analisada para carboidratos estruturais, lignina e cinzas, enquanto a fração líquida foi analisada quanto ao teor de açúcares e inibidores (Sluiter et al., 2006). A concentração de sólidos insolúveis em água, do inglês *water insoluble solids* (WIS) foi analisada usando o método desenvolvido por Weiss et al., (2010).

Para

$$\text{Açúcar recuperável (\%)} = \frac{\text{açúcar do material pré tratado}}{\text{açúcar do material in natura}}$$

Por exemplo, para cálculo da glicose temos:

$$\text{Glicose recuperável (\%)} = \frac{\text{glicose pré tratada}}{\text{glicose material in natura}}$$

glicose (g) do material pré-tratado = Kg *slurry* X WIS% X % glucana (fibra) X 1,11 + Kg *slurry* X (1- %WIS) X g/L glicose

glicose (g) material *in natura* = Kg bagaço X %glucana X 1,11

Para o cálculo da xilose recuperável no pré-tratamento temos:

$$\text{Xilose recuperável (\%)} = \frac{\text{xilose pré tratada}}{\text{xilose material in natura}}$$

Xilose material pré-tratado = Kg *slurry* X %WIS X % xilana (fibra) X 1,14 + Kg *slurry* X (1-%WIS) X g/L xilose

Xilose material in natura = Kg bagaço seco X % xilana X 1,14

3.6. Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada com 12,7%, 10,8% e 8,2% de WIS para os genótipos Malibu J53, Malibu A1001 e Palo Alto respectivamente, da fração sólida dos bagaços pré-tratados em um reator de 40 L com um peso total de trabalho de 13,3 ;9,6 e 7,6 Kg para os genótipos Malibu J53, Malibu A1001 e Palo Alto respectivamente. As frações sólidas do bagaço de sorgo sacarino e biomassa pré-tratadas foram hidrolisadas enzimaticamente em um reator de tambor rotativo de capacidade de 30L (Terrafor -Infors AG) com agitação constante, produzindo um hidrolisado enzimático rico em açúcares. O reator rotativo era equipado com uma pá impulsora (Modelo HP25, Lightnin mixers LTD, Inglaterra) e a temperatura foi mantida com através de um banho d'água externo (Figura 6).

A hidrólise foi realizada a 50° C por 96h, utilizando-se um coquetel enzimático Cellic CTec2 (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) com carga enzimática de 15 unidades de papel de filtro (FPU) (em inglês, *Filter Papers Units*) g⁻¹ (WIS) e agitação constante do reator a 10 rpm, determinada de acordo com Ghose (1987). O pH da suspensão foi ajustado para 5 antes da hidrólise, e depois reajustado todos os dias com NaOH a 50%. O sobrenadante após hidrólise enzimática denotada como licor de bagaço hidrolisado foi separado da fração sólida por filtração a vácuo utilizando papel de filtro de grau 5 (Munktell Filter AB) e analisado em relação a açúcares solúveis, produtos de degradação e açúcares solúveis totais, de acordo

com procedimentos NREL. Os licores hidrolisados foram armazenados a -20 °C até a fermentação.

Amostras para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram coletadas durante a hidrólise enzimática e foram analisadas quanto à açúcares monoméricos. Após coletadas, as amostras foram centrifugadas e os sólidos foram removidos do líquido. As amostras líquidas foram então congeladas imediatamente e mantidas no congelador até serem analisadas usando CLAE.

Após 96 horas de hidrólise enzimática, os sobrenadantes foram separados por filtração a vácuo utilizando papel de filtro de grau 5 (Munktell Filter AB). Os licores hidrolisados foram armazenados a -20 °C até a fermentação.



Figura 6. Reator de tambor rotativo de capacidade de 30L para hidrólise enzimática Departamento de Engenharia Química, Universidade de Lund (Fonte pessoal).

O rendimento da hidrólise enzimática foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Rendimento da hidrólise enzimática (\%)} = \frac{\text{açúcar hidrolisado (g)}}{\text{açúcar material prétratado (g)}}$$

Onde, açúcar no hidrolisado = g/L açúcar_(CLAE) x V_{hidrolisado}, em g

3.7. Cultivo em diferentes condições adaptativas.

Para crescimento de massa celular os microrganismos (*P. kudriavzevii* e LJ04) inicialmente foram inoculados com uma alça de platina em frascos Erlenmeyer

de 500 mL, em batelada aeróbica com aeração contínua, contendo 50 mL de meio mínimo estéril com 20 g.L⁻¹ glicose, 20 g.L⁻¹ xilose, 7,5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 3,75 g.L⁻¹ de KH₂PO₄ e 0,75 g.L⁻¹ MgSO₄. Os frascos Erlenmeyer foram incubados por 24 horas à temperatura de 32°C sob agitação orbital (180 RPM).

Após as 24 horas, os microrganismos foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 500 mL, e divididos em 3 meios de cultivo com composições distintas nas concentrações de licor hidrolisado de sorgo e melaço de beterraba (Tabela 1).

Todos os frascos Erlenmeyer foram mantidos por mais 48 horas de sob à temperatura de 32°C sob agitação orbital (180 RPM).

O melaço de beterraba utilizado (Nordic Sugar A/ S) continha 40% em peso de açúcares (sacarose, frutose e glicose), ácido láctico (0,034g g⁻¹) e ácido acético (0,008g g⁻¹). O pH do meio foi ajustado para 5,5 com NaOH 5M em todos os meios de cultura.

As leveduras propagadas foram centrifugadas (3800 × g, 10 min) e lavadas com 9 g.L⁻¹ de solução de NaCl estéril.

Tabela 1. Composição nutricional dos diferentes meios de cultivo para as leveduras *P. kudriavzevii* LJ03 e LJ04.

	Meio 1	Meio 2	Meio 3
Licor Hidrolisado (Sorgo) - mL	-	83	125
Melaço de beterraba - mL	167	85	43
(NH ₄) ₂ SO ₄ - g.L ⁻¹	23,5	23,5	23,5
KH ₂ PO ₄ - g.L ⁻¹	3	3	3
MgSO ₄ *7 H ₂ O - g.L ⁻¹	2,25	2,25	2,25
Biotina - mg.L ⁻¹	33	33	33

3.8. Testes fermentativos para avaliação dos meios de cultivo

Para identificar qual o melhor meio de cultivo para adaptação das leveduras, foram realizados testes de fermentação em frascos de 50mL contendo o hidrolisado enzimático proveniente da hidrólise enzimática do sorgo sacarino Malibu J53.

Para o teste fermentativo as leveduras LJ04, *P. Kudriavzevii* LJ03 provenientes de seus respectivos meios de cultivo (Meios 1, 2, 3 conformes descritos no item 3.7) foram avaliadas em duas temperaturas 37°C e 40°C. A

fermentação foi realizada num agitador orbital (Lab-Therm, Adolf Kühner AG, Basileia, Suíça) anaerobicamente a 180 rpm e pH 5 durante 120 horas (com coletas nos tempos 1, 3, 5, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação) com concentração de 3 g L⁻¹ de leveduras, em frascos com volume de trabalho de 50 mL, contendo hidrolisado da bagaço do sorgo sacarino malibu J53, acrescidos de 0,5 g L⁻¹ de (NH₄)₂HPO₄ e 1 g L⁻¹ de extrato de levedura. Os testes fermentativos foram realizados em triplicatas.

3.9. Fermentação em biorreatores

As fermentações dos licores hidrolisados foram realizadas em biorreatores de 2 L esterilizados (LABFORS). Os licores hidrolisados foram suplementados com solução de 0,5 g L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄ e 0,125 mL L⁻¹ de Vitahop.

A levedura isolada LJ04 e a levedura *P. kudriavizevii* LJ03 foram testadas em duas temperaturas, 37°C e 40°C, para testar a capacidade fermentativa destes isolados em temperaturas elevadas. Como controle, utilizou-se a levedura industrial fermentadora de hexoses *S. cerevisiae* ER, em sua temperatura ótima de fermentação de 32° C, de acordo com o fabricante.

A concentração de leveduras nas fermentações foi de 3g L⁻¹ de peso seco com base no volume final, com uma taxa de agitação de 250 rpm e o pH 5 foi mantido com solução de NaOH a 2,5 M ao longo de 96 horas de fermentação. Amostras foram coletadas nos tempos 1, 3, 5, 8, 12, 24, 48, 72, e 96 horas de fermentação. As fermentações foram realizadas em duplicatas para todos os experimentos nos biorreatores.

3.10. Procedimentos analíticos

Após análise composicional da matéria-prima e dos sólidos obtidos no pré-tratamento e hidrólise enzimática, os açúcares monoméricos foram analisados por cromatografia de troca aniônica de alta performance acoplada à detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Utilizou-se uma coluna Carbo Pac PA (Dionex, Sunnyvale, CA, EUA), uma bomba de gradiente (GP50, Dionex) e um amostrador automático (AS50, Dionex). O fluxo foi de 1 mL min⁻¹ com água

deionizada como eluente. A coluna foi limpa com uma solução de 200 mmol L⁻¹ de hidróxido de sódio dissolvido em 170 mmol L⁻¹ de acetato de sódio. Todas as amostras foram filtradas através de um filtro com poro de diâmetro de 0,20 mm antes das análises.

As quantidades de açúcares, etanol e subprodutos nos líquidos após fermentação, foram determinadas por CLAE com um detector de índice de refração. Glicose, xilose, arabinose, galactose e manose foram separados usando uma coluna Aminex HPX-87P (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) a 85°C com uma taxa de fluxo de 0,5 mL min⁻¹ usando água como eluente. Etanol, ácido láctico, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) foram separados usando uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) a 50°C com uma taxa de fluxo de 0,5 mL min⁻¹ usando 5 mmol L⁻¹ de ácido sulfúrico como eluente. Todas as amostras foram filtradas através de um filtro com poro de diâmetro 0,20 mm antes das análises.

$$\text{Rendimento fermentativo (g/g)} = \frac{\text{Etanol final (gL}^{-1}\text{)}}{\text{Glicose+Xilose inicial (gL}^{-1}\text{)}}$$

3.11. Cálculos de rendimentos

Os rendimentos de etanol foram calculados em dois níveis: um rendimento global (balanço de massa) e um rendimento metabólico.

O rendimento global foi baseado no total de glicose e xilose fornecidas - isto é, a soma de glicose e xilose nos materiais após o pré-tratamento, incluindo monômeros, oligômeros e polímeros.

$$\text{Rendimento global (g/g)} = \frac{\text{Etanol produzido}}{\text{glicose no bagaço}}$$

O rendimento metabólico foi baseado na glicose e xilose consumidas., a glicose e a xilose consumidas foram definidas como a diferença entre a glicose e xilose total na entrada do hidrolisado, e os mesmos açúcares após fermentação.

A porcentagem do rendimento teórico máximo de etanol foi baseada em um rendimento estequiométrico teórico de 0,51g g⁻¹ para glicose e xilose.

Os dados foram analisados por análise de variância, e os valores médios foram comparados com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Os valores

médios para cada tratamento foram comparados pelo teste de Tukey o nível de significância de 5%. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, e o software AGROESTAT foi utilizado para a análise estatística.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação molecular da levedura isolada

O resultado do sequenciamento foi submetido à comparação com sequências do banco de dados GenBank utilizando o programa BLASTn e a comparação da sequência obtida contra a base de dados GenBank (NCBI) apresentou 99% de identidade com a espécie *Pichia membranifaciens* (Tabela 2). Organismos que exibem 99% ou mais de identidade nesta região são considerados como pertencentes à espécie conhecida e depositada no GenBank.

As leveduras do gênero *Pichia* pertencentes à família *Saccharomycetaceae* são relatadas em habitats naturais como solo, água, exsudatos de plantas, insetos e frutas e também como contaminantes em uma variedade de alimentos e bebidas e produtos contendo alto teor de açúcar (Gallardo et al., 2011). Isto representa uma gama mais vasta de habitats na natureza em comparação com outras leveduras comuns como *S. cerevisiae*. *P. membranifaciens* está associada a *Saccharomyces* e outras leveduras não *saccharomyces* em bagas de uva e é utilizado para a produção de vinho (Deshpande, 2009). Além de sua importância nas indústrias alimentícias, *P. membranifaciens* possui potencial atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e fungos patogênicos. Outras potenciais aplicações biotecnológicas de isolados de *Pichia* incluem biorremediação ambiental e biofármacos (Deshpande, 2009; Santos e Marquina, 2014).

Na literatura não há relatos de trabalhos que relacionam a levedura *P. membranifaciens* em fermentações para produção de etanol, por isso esta pesquisa apresenta resultados inéditos para esta levedura. No presente estudo, a levedura *P. membranifaciens* LJ04 foi utilizada para a fermentação de hidrolisado de bagaço de sorgo, e mostrou bons resultados quando fermentada em temperaturas mais altas do que a temperatura ótima de fermentação da *S. cerevisiae*, resultados que serão relatados a seguir.

Tabela 2. Alinhamentos obtidos para a estirpe LJ04 comparada com a levedura *Pichia membranifaciens* pertencente a Coleção de microrganismos CBS: 5170, utilizando pequena subunidade de RNA ribossomal do gene, sequencial parcial, Espaçador transcrito interno 1, 5.

>KY104617.1 <i>Pichia membranifaciens</i> culture-collection CBS:5170 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence Length=853 Score = 915 bits (495), Expect = 0.0 Identities = 500/503 (99%), Gaps = 0/503 (0%) Strand=Plus/Plus			
Query	1	TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACT	60
Sbjct	121	TAGAGGTCGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACT	180
Query	61	GTGATTATACCAACACCACACTGTGTGGGCGCACAAAACACCTAAACCTGGAGTATACAC	120
Sbjct	181	GTGATTATACCAACACCACACTGTGTGGGCGCACAAAACACCTAAACCTGGAGTATACAC	240
Query	121	ACGTCAACAAAAGATCTAAAAGAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAT	180
Sbjct	241	ACGTCAACAAAAGATCTAAAAGAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAT	300
Query	181	CGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCG	240
Sbjct	301	CGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCG	360
Query	241	AGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCGTCGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCG	300
Sbjct	361	AGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCGTCGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCG	420
Query	301	TTTCCTTCTTGTGCACCGGGGGTCTTTGCTGATCTTCTGTGCGCAGAGCTGGCCGTGCCA	360
Sbjct	421	TTTCCTTCTTGTGCACCGGGGGTCTTTGCTGATCTTCTGTGCGCAGAGCTGGCCGTGCCA	480
Query	361	CTGGCCCGGCCGAAAAGAAACGTTGCGGACGAAGCGAACTACATCGGGACGCTTTGGCCG	420
Sbjct	481	CTGGCCCGGCCGAAAAGAAACGTTGCGGACGAAGCGAACTACATCGGGACGCTTTGGCCG	540
Query	421	CCGAGCGAAAAAACACCATTTGAGCTCGACCTCAGATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTT	480
Sbjct	541	CCGAGCGAAAAAACACCATTTGAGCTCGACCTCAGATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTT	600
Query	481	AAGCATATCAWTAAGCGGAGGAA	503
Sbjct	601	AAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	623

4.2. Caracterização da composição química dos bagaços

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da composição química do bagaço de sorgo sacarino Malibu J53, Malibu A1001 e Palo Alto (*in natura*). Da sua análise pode-se observar que a soma dos componentes atingiu 103,99% para o genótipo Malibu J53. Para o genótipo Malibu A1001 a soma foi de 98,3% e para o genótipo Palo Alto foi de 99,6%, estes valores podem ser justificados pelo fato de que alguns componentes presentes no material não foram quantificados, como os compostos inibidores e os ácidos urônicos

Tabela 3. Composição da matéria-prima (Bagaço de sorgo sacarino Malibu J53, Malibu A1001 e sorgo biomassa Palo Alto) expressa em porcentagem de matéria-seca.

(%)	Malibu J53	Malibu 1001	Palo Alto
Cinzas	0,03 ± 0,1	0,08 ± 0,1	1,20 ± 0,1
Extrativos	2,21 ± 0,1	21,20 ± 0,3	32,30 ± 1,5
Glucana	51,73 ± 1,1	35,10 ± 0,6	28,30 ± 1,2
Xilana	21,37 ± 1,2	19,70 ± 1,0	13,70 ± 0,8
Galactana	0,72 ± 1,9	1,20 ± 0,3	1,80 ± 0,2
Arabinana	1,77 ± 0,1	1,42 ± 0,2	1,40 ± 0,4
Manana	1,71 ± 0,2	1,20 ± 0,1	0,60 ± 0,1
Lignina	24,45 ± 1,3	18,40 ± 1,6	20,30 ± 1,2
Total	103,9	98,3	99,6

Todos os dados representam a porcentagem baseada no peso seco e são médias das triplicatas ± desvio padrão.

Conforme Tabela 3, o bagaço de sorgo sacarino Malibu J53 continha principalmente glucana (51,73%), xilana (21,37%), e lignina (24,45%) sendo estes componentes apresentados em menores quantidades no sorgo Malibu A1001, que continha glucana (35,1%), xilana (19,7%), e lignina (18,4%) e o sorgo biomassa Palo Alto que apresentou valores de glucana (28,3%), xilana (13,7%), e lignina (20,3%). Os valores obtidos na análise estão, de um modo geral, dentro da faixa de valores encontrados na literatura.

De acordo com Goshadrou, Karimi e Taherzadeh, (2011), avaliando a composição de sorgo sacarino encontrou como principais componentes glucana (41,3%), xilana (17,9%), e lignina (18,2%). Resultados semelhantes foram relatados por Gyalay-Korpos, Feczák e Réczey (2008), que avaliaram a composição do bagaço de sorgo moído, que resultou em 41,3% glucana, que pode ser considerada como conteúdo de celulose, 17,41% xilana e 17,62% lignina, em peso seco.

A composição dos bagaços *in natura* de sorgo Malibu A1001 e sorgo biomassa Palo Alto indicaram que tanto o conteúdo de carboidratos quanto de lignina foram similares aos de outras culturas, como palha de milho, e inferiores aos das madeiras duras e madeiras macias (Bura, Chandra e Saddler, 2009; Yang et al., 2002). Além disso, a xilana representou aproximadamente 90% em média de toda a hemicelulose nos bagaços estudados, o que também é típico de outras matérias-primas agroindustriais e madeiras herbáceas, em comparação com a manose que

predomina a fração hemicelulose em madeiras macias (Bura, Chandra e Saddler, 2009).

Aproximadamente 60% da matéria seca total é composta de polissacarídeo, em que a maior fração foi glucana no teor total de carboidratos representando 51,73, 35,1% e 28,3% para os sorgos Malibu J53, Malibu A1001 e Palo Alto, respectivamente. Assim, esse alto teor de glucana, assim como as hemiceluloses poderiam estar disponível para hidrólise e posterior fermentação à etanol.

Os teores de cinzas neste estudo foram baixos em comparação com outros resíduos agrícolas, como palha de arroz e milho. Um menor teor de cinzas em material lignocelulósico é potencialmente benéfico para hidrólise enzimática (Yu et al., 2010).

Na análise composicional dos bagaços (Tabela 3), observa-se os genótipos Malibu A1001 e Palo Alto, resultaram em valores mais elevados de extrativos em relação ao Malibu J53. Os extrativos são uma mistura de diferentes componentes, incluindo resinas, proteínas, fitoesteróis, gorduras, ceras, sais e um número de hidrocarbonetos não voláteis disponíveis em pequenas porções. Quando disponíveis, os açúcares livres também estão envolvidos como extrativos. Estes extrativos interferem na análise de alguns componentes, particularmente a lignina. Assim, em materiais com alto teor de extrativos, estes componentes devem ser primeiramente extraídos (Karimi e Taherzadeh, 2016).

As diferenças composicionais encontradas nos diferentes estudos para uma mesma biomassa, podem ocorrer devido a diferenças no clima, nas condições de cultivo e colheita, bem como variações sazonais, infecção e pragas, entre outros.

A escolha da biomassa depende da disponibilidade, rendimento por hectare, bem como preço de mercado e decisões políticas (Bondesson, Galbe e Zacchi, 2013). A composição das principais macromoléculas difere dependendo do tipo de biomassa, o que afeta a escolha dos processos.

Para a produção de etanol 2G, uma das etapas principais é se conhecer a composição da matéria-prima utilizada, que norteará as demais etapas do processo, como o pré-tratamento ideal e o tipo de hidrólise. Quando se avalia a composição, torna-se evidente que existem aspectos particulares que devem ser levados em

consideração, por estarem relacionados à viabilidade técnica, aos balanços energéticos e à economicidade do bioprocesso em desenvolvimento.

Neste estudo, a matéria-prima escolhida foi o bagaço de sorgo sacarino por ser matéria-prima rica em açúcares nos colmos, e o sorgo biomassa ter um grande potencial como cultura energética, principalmente no clima tropical brasileiro. O bagaço de sorgo que sobra após a extração do caldo, geralmente é utilizado para ração animal, adubação orgânica e cogeração de energia e recentemente este bagaço está sendo estudado para produção de etanol de segunda geração (Shen et al., 2011).

4.3. Pré-tratamento de explosão à vapor catalisado por ácido

O pré-tratamento a vapor de bagaço de sorgo catalisado com ácido sulfúrico foi realizado a 190°C durante 5 minutos. O teor de sólidos insolúveis em água (WIS) dos materiais pré-tratados foi de 12,7%, 10,8% e 8,2% para os genótipos Malibu J53, Malibu A1001 e Palo Alto, respectivamente e a recuperação do WIS na fração sólida foi de 72,37% para o Malibu J53, 69,22% para o Malibu A1001 e 52,4% para o Palo Alto (Tabela 4). Freita (2016) com ensaios de pré-tratamento de bagaço de sorgo, nas condições de 140 °C, 20 min e 0,5% (v/v) de ácido sulfúrico obteve para o genótipo BD7605 um rendimento mássico de 74%, 52,69% para o genótipo BRS610 e 41,21% para o genótipo BRS508. Shen et al (2011) avaliando bagaços de sorgo pré-tratados com explosão a vapor catalisado por SO₂, obteve uma recuperação de sólidos com variação de 48,6% a 64,5%. Barcelos (2012) estudando o pré-tratamento de bagaço de sorgo sacarino com ácido diluído (relação sólido/líquido 0,25 g/mL, concentração de 0,9 % v/v de ácido sulfúrico e tempo de exposição de 40 minuto) obteve um rendimento mássico de 66,2%.

Tabela 4. Rendimento mássico das biomassas e recuperação dos açúcares dos genótipos de sorgo após etapa de pré-tratamento para bagaços dos genótipos Malibu J53, Malibu A1001 e Palo Alto.

Genótipos	Fração Sólida Recuperável (%)	Glucana Recuperável (%)	Xilana Recuperável (%)
Sorgo sacarino Malibu J53	72,37%	75,7	79,6
Sorgo sacarino Malibu A1001	69,22%	74,3	67,8
Sorgo biomassa Palo Alto	52,4%	62,7	67,4

A máxima recuperação da glucana ocorreu no genótipo Malibu J53 pré-tratado, com valor 75,7%. A xilana recuperável também foi maior no genótipo Malibu J53. É possível observar que nos bagaços dos genótipos de sorgo avaliados neste estudo, o Malibu J53 apresentou maiores concentrações de açúcares, seguido pelo Malibu A1001 e Palo Alto, o que mostra que diferentes genótipos de sorgo apresentam características estruturais bastante distintas.

Os resultados da composição química dos bagaços de sorgo sacarino e biomassa pré-tratados estão apresentados na Tabela 5. Para o teor de cinzas do bagaço de sorgo, observou-se resultados baixos, valores similares foram observados por Oliveira et al. (2009) que obteve valor de 1,6% de cinzas no bagaço de sorgo não lavado. Batista (2016) indicam teores mais elevados de cinzas para o sorgo sacarino (6,3%) e menores para a biomassa (5,1%) diferentemente do que foi observado neste estudo. Entretanto, sabe-se que o teor de cinzas está relacionado a condições de colheita do material, variando consideravelmente ao longo da safra. Além disso, varia em função do genótipo, idade e ambiente de produção.

O teor de lignina no bagaço do sorgo biomassa foi maior do que nos demais genótipos que apresentaram valores similares, podemos atribuir esses resultados devido a característica do genótipo Palo Alto em possuir mais fibras em relação a quantidade de caldo nos colmos. Em relação ao bagaço *in natura* quando se realizou o pré-tratamento, constatou-se que os teores de lignina foram superiores para todos os genótipos avaliados. Os resultados determinados neste estudo foram superiores que os obtidos por Batista (2016) que encontrou valores da ordem de 7,3% para os genótipos sacarino e energia.

Os resultados da composição química dos bagaços pré-tratados (Tabela 5) indicam que houve redução na porcentagem de hemiceluloses quando comparados aos bagaços *in natura*, e aumentos da fração de celuloses. Isso demonstra que o pré-tratamento à vapor, nas condições avaliadas foi efetivo no aumento da disponibilidade aos açúcares. Devido à estrutura complexa e recalcitrante da biomassa lignocelulósica, o pré-tratamento é necessário para melhorar a utilização das diferentes macromoléculas. A estrutura, o tamanho e a composição química dos componentes da biomassa são alterados pelo pré-tratamento, tornando-os mais acessíveis.

Tabela 5. Composição química dos bagaços de sorgo pré-tratado por explosão a vapor catalisado por ácido para os genótipos de sorgo sacarino Malibu J53 e Malibu A1001, e sorgo biomassa Palo Alto

(%)	Malibu J53	Malibu 1001	Palo Alto
Cinzas	1,3	0,09	1,8
Lignina total	32,5	35,1	39,9
Celulose	52,3	48,2	43,8
Hemicelulose	10,4	9,2	8,7
Total	96,5	92,5	94,2

4.4. Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática dos *slurries* (material após pré-tratamento) dos genótipos Malibu J53, Malibu A1001 e Palo Alto foram realizadas a 12,7%, 10,8% e 8,2% de WIS respectivamente, para fornecer o licor hidrolisado para as fermentações. A hidrólise enzimática foi realizada utilizando preparações de enzimas Cellic CTec2 (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) com carga enzimática de 15 unidades de papel de filtro (FPU). As concentrações finais de glicose e xilose para o genótipo Malibu foram de 86,6 gL⁻¹ e 44,1 gL⁻¹, respectivamente, e foram alcançadas após 72h, valores estes correspondentes à 72% e 77% do rendimento teórico. Para o genótipo Malibu A1001, ao final de 72 horas, as concentrações de glicose e xilose foram de 59,4 gL⁻¹ e 32 gL⁻¹, respectivamente, com valores de rendimento teórico de 68% e 42%. Concentrações de 30,7 gL⁻¹ de glicose, e 41,9 gL⁻¹ de xilose foram alcançadas após a hidrólise do genótipo Palo Alto, sendo estas concentrações correspondente a 75% e 64% de rendimento de rendimento teórico. Uma vez que os açúcares hemicelulósicos são liberados principalmente durante o pré-tratamento a vapor, a concentração de xilose aumentou ligeiramente durante a hidrólise para todos os genótipos nesta pesquisa.

Ao final da hidrólise enzimática o licor de sorgo sacarino Malibu J53, rendeu valores de açúcares de: 86 g L⁻¹ de glicose, 44 g L⁻¹ de xilose, 1,53g L⁻¹ de manose, 1,36g L⁻¹ galactose, 7,956 g L⁻¹ arabinose, valores estes superiores em relação aos demais genótipos e devido a isso este genótipo foi escolhido para ser utilizado no

processo fermentativo. Os demais genótipos de sorgo não foram utilizados para as fermentações.

4.5. Testes fermentativos para avaliação dos meios de cultivo

Para avaliar o melhor meio de cultivo, visando a adaptação das leveduras aos componentes presentes nos hidrolisados e consequentemente um melhor rendimento fermentativo, foram realizados testes fermentativos com 50 mL de hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino durante 120 horas, com as leveduras *P. membranifaciens* LJ04 e *P. kudriavizevii* LJ03, nas temperaturas de 37°C e 40°C, provenientes dos meios de cultivo 1 (0% de hidrolisado), meio 2 (33% de hidrolisado) e meio 3 (50% hidrolisado).

Para a produção de etanol, a levedura *P. membranifaciens* LJ04 quando avaliada na temperatura de 37°C (Figura 7), apresentou menores teores de etanol em gL⁻¹ quando cultivada no meio 1, cujo maior valor, de 36,6g L⁻¹, que ocorreu no tempo de 120 horas de fermentação, com um rendimento de 55,5%. Quando cultivada no meio 2, a levedura *P. membranifaciens* LJ04 resultou em valores maiores, com picos de 40,5 gL⁻¹, 41,3 gL⁻¹ e 41,9 gL⁻¹, nos tempos 5, 8 e 12 horas de fermentação respectivamente, demonstrando uma produção de etanol mais rápida do que quando cultivada nos outros meios, o rendimento para a fermentação do meio de cultivo 2 foi de 66,3%. Quando adaptada no meio 3, a levedura *P. membranifaciens* LJ04 apresentou maior produção após 24 horas de fermentação, sendo o maior teor de etanol produzido no tempo de 48 horas, com valor de 37,9 gL⁻¹ e rendimento de 57,1%.

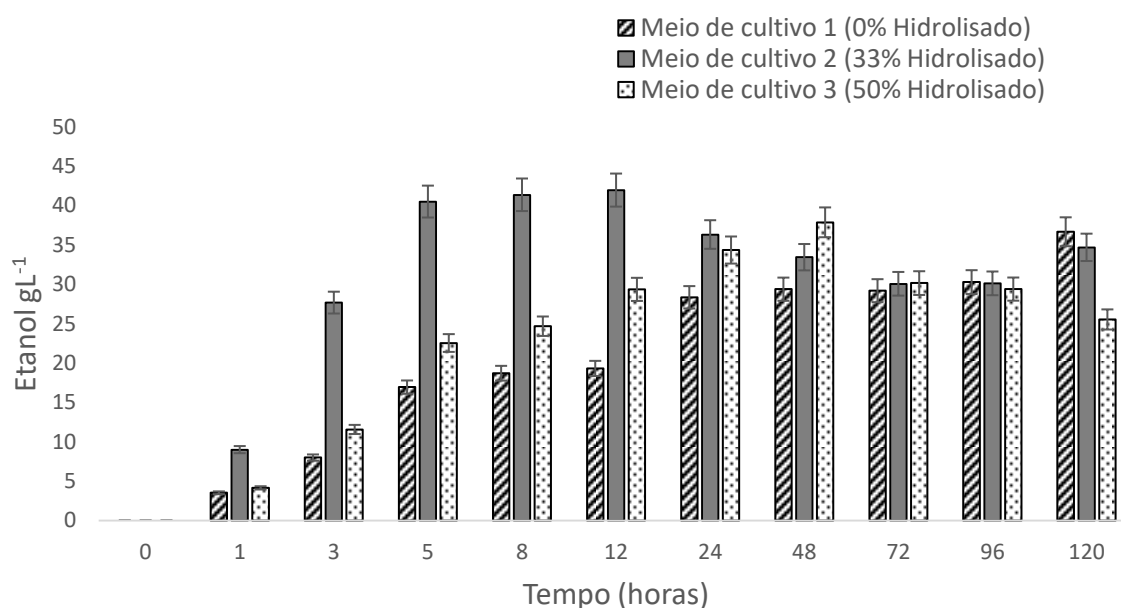


Figura 7. Produção de etanol por *P. membranifaciens* em temperatura de 37°C adaptadas em diferentes meios de cultivo durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erros representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

Para a avaliação da produção de etanol da levedura *P. kudriavzevii* LJ03, na temperatura de 37°C (Figura 8), nos 3 diferentes meios de cultivos, observa-se que o meio de cultivo 1, foi o que resultou em menores concentrações de etanol, sendo que os picos de produção ocorreram em 72 e 96 horas de fermentação, com valores de 16,4 gL⁻¹ e 19,6 gL⁻¹ respectivamente, o rendimento teórico de etanol para este meio foi de 29,7%. O meio 2 foi o que apresentou maiores teores de etanol em gL⁻¹, os maiores valores ocorreram a partir das 24 horas de fermentação, sendo que em 72 horas de fermentação resultou em 39,1 gL⁻¹, com um rendimento de 58,9%. O rendimento fermentativo para o meio 3 foi de 57,7%.

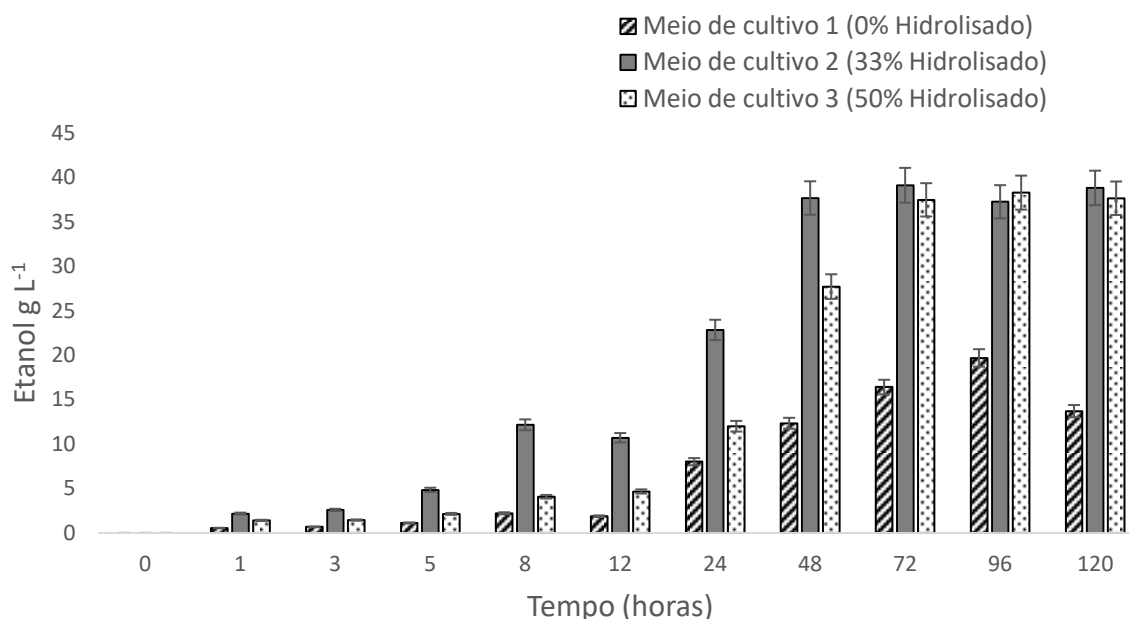


Figura 8. Produção de etanol por *P. kudriavzevii* em temperatura de 37°C adaptadas em diferentes meios de cultivo durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

As Figuras 9 e 10, são resultados da fermentação quanto a glicose residual disponível. Na figura 9, observamos os resultados do comportamento da levedura *P. membranifaciens* LJ04 na temperatura de 37°C, nos 3 meios de cultivo, ao longo de 120 horas de fermentação em relação a glicose. A levedura avaliada nestas condições foi efetiva para o consumo de glicose nos três meios de cultivo, pois consumiu quase toda a glicose disponível. No meio de cultivo 1, a levedura consumiu a maior parte da glicose após 24 horas de fermentação, sendo que ao final desta apenas 2,31 gL⁻¹ não foram consumidas pelas leveduras, 97,3% de toda a glicose disponível para a fermentação foi consumida. Na fermentação do hidrolisado, nos meios de cultivo 2 e 3, os maiores consumos de glicose ocorreram após 12 horas de fermentação, sendo que após 24 horas quase toda a glicose já havia sido consumida em ambos os meios, resultando em 97,7% e 97,1% de consumo para os meios 2 e 3 respectivamente durante toda a fermentação. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Moutta (2009), onde em fermentações de hidrolisado de palha de cana-de-açúcar utilizando-se uma cepa de *Pichia stipitis*, a glicose já havia sido completamente consumida em 15 horas.

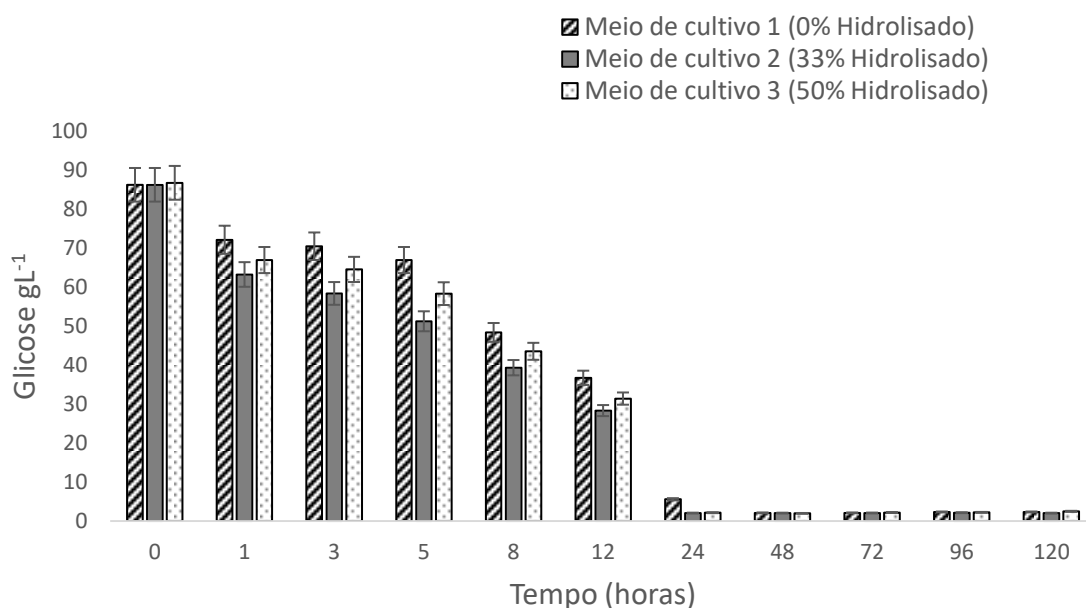


Figura 9. Consumo de glicose por *P. membranifaciens* em temperatura de 37°C adaptadas em diferentes meios de cultivo durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

Na Figura 10, avaliamos o comportamento fermentativo da levedura *P. kudriavzevii* LJ03 na temperatura de 37°C, cultivada em 3 meios de cultivos diferentes, em relação ao consumo de glicose. Pode-se observar que as leveduras que foram cultivadas e adaptadas no meio 1, resultaram em valores menores de consumo de glicose, sendo que no tempo de 120 horas 38,5 g L⁻¹ de glicose não foram consumidas, ou seja 55,4% deste açúcar foi consumido.

Para as leveduras que foram adaptadas nos meios 2 e 3, o consumo de glicose foi maior do que em relação ao meio 1. As leveduras adaptadas no meio 2, após 48 horas já haviam consumido metade da glicose disponível na fermentação, e após 72 horas as leveduras consumiram quase toda a glicose, com a concentração próxima a zero após este tempo de fermentação, o consumo total foi de 98,8%. As leveduras adaptadas no meio 3, também consumiram toda a glicose disponível após 72 horas de fermentação (97,7%), resultando em uma sobra de apenas 1,9 g L⁻¹ após 120 horas de fermentação.

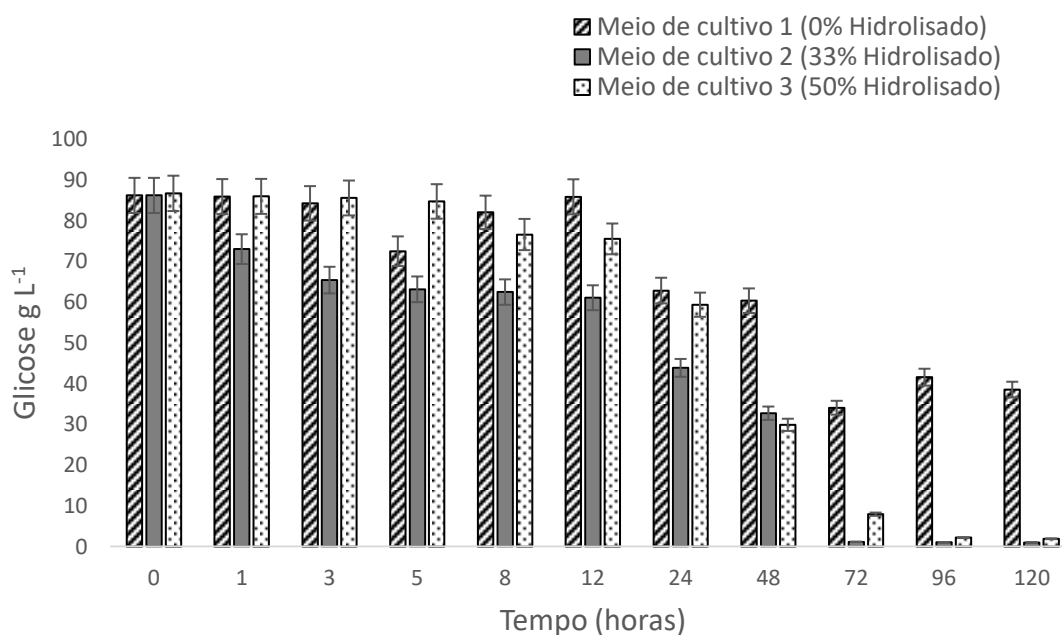


Figura 10. Consumo de glicose por *P. kudriavzevii* em temperatura de 37°C adaptadas em diferentes meios de cultivo durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

Nas Figuras 11 e 12, estão representados o comportamento das leveduras em relação ao consumo de xilose na fermentação do hidrolisado de sorgo sacarino na temperatura de 37°C que foram cultivadas em três meios adaptativos. A levedura *P. membranifaciens* LJ04 (Figura 11), quando fermentada em temperatura de 37°C, não resultou em diferenças em relação aos meios em que foram adaptadas. Ao longo das 120 horas de fermentação, o consumo de xilose foi baixo, quando comparado ao consumo de glicose, porém pode-se observar que houve consumo de xilose principalmente a partir das 24 horas após fermentação nos três meios de cultivo. Ao final das 120 horas, a concentração de xilose disponível no meio foi de 29,0 gL⁻¹, 26 gL⁻¹ e 30,1 gL⁻¹, nos meios 1, 2 e 3, respectivamente, sendo estes valores correspondentes a 59,5%, 57,0% e 59,7% da xilose consumida na fermentação para os respectivos meios.

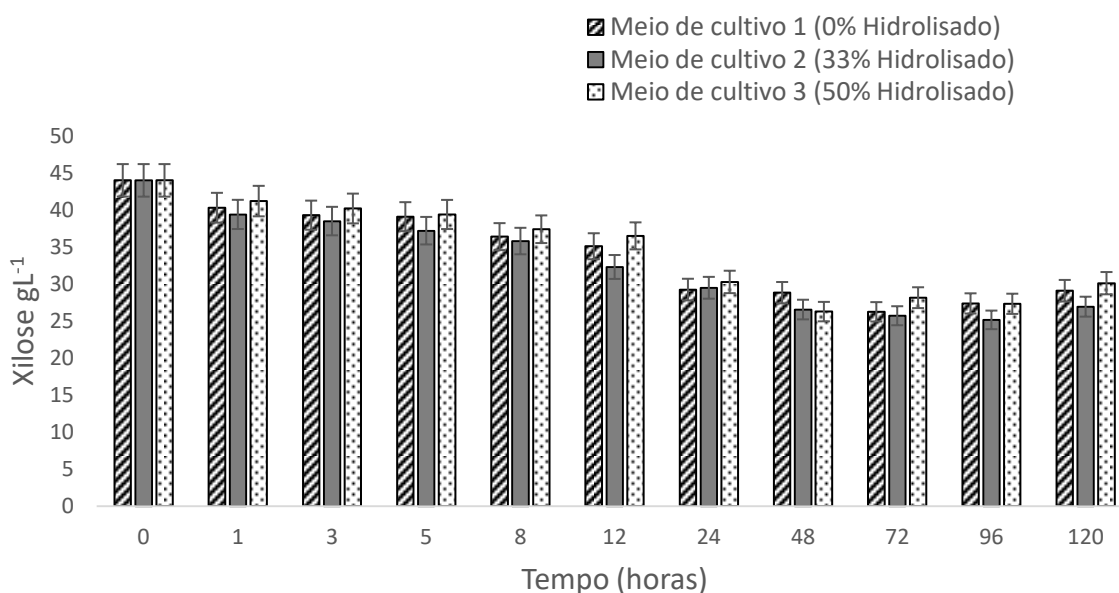


Figura 11. Consumo de xilose por *P. membranifaciens* em temperatura de 37°C adaptadas em diferentes meios de cultivo durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

A levedura *P. kudriavzevii* LJ03 (Figura 12), quando fermentada em temperatura de 37°C, assimilou de forma lenta a xilose. Ao longo das 120 horas de fermentação, para os três meios avaliados, a xilose não foi totalmente consumida, sendo que a concentração de xilose residual foi de 27,5 g L⁻¹, 23,58 g L⁻¹ e 28,43 g L⁻¹, nos meios 1, 2 e 3 respectivamente. As quantidades de xilose consumidas corresponderam a 62,5%, 53,6% e 64,5% para os meios 1, 2 e 3 respectivamente.

Segundo Martini et al. 2016, mostraram que houve consumo quase total da xilose em 96 horas de cultivo da levedura *Meyerozyma guilliermondi* no hidrolisado detoxificado adicionado de extrato de levedura. Nos estudos de Gong et al. (1999) foi demonstrado que ocorre uma assimilação preferencial de glicose em relação a pentoses e concluíram que o comportamento de leveduras cultivadas em mistura de açúcares, hexoses e pentoses, apresenta uma inibição ou retardamento da utilização de xilose pela presença de glicose no meio, este mesmo fato pode ser observado neste estudo visto que para as leveduras avaliadas, o maior consumo de xilose ocorre após 24 horas de fermentação, mesmo período em que a maior parte da glicose já havia sido consumida.

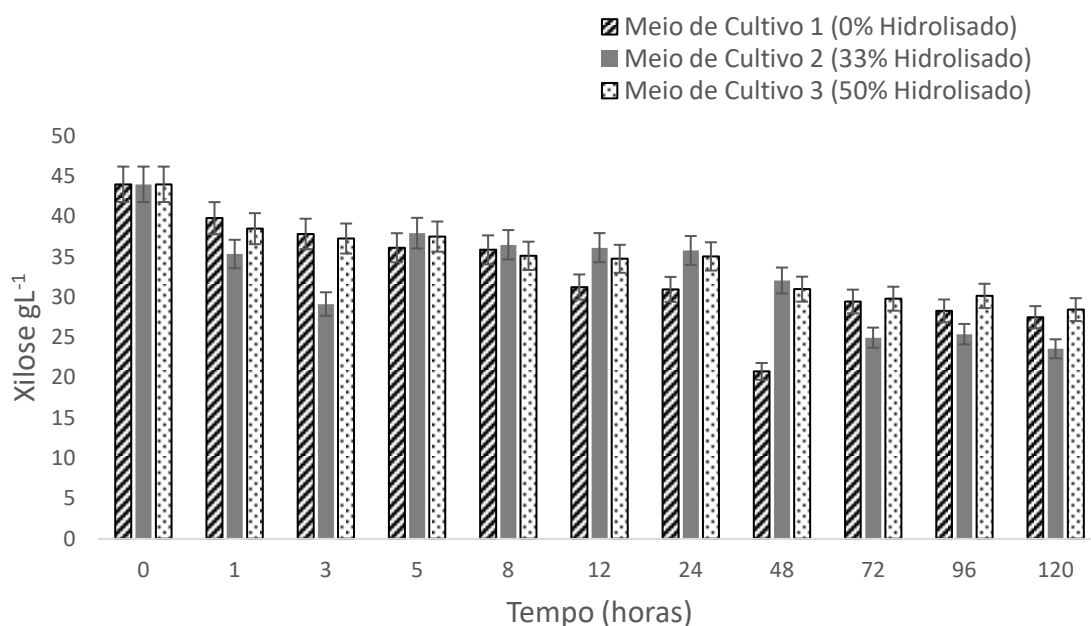


Figura 12. Consumo de xilose por *P. kudriavzevii* em temperatura de 37°C adaptadas em diferentes meios de cultivo, durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

Hähn-Hagerdal et al. (1991) reportaram que concentrações acima de 2 % de glicose, mesmo em espécies que possuem afinidade no transporte de pentoses, como *P. stipitis*, são capazes de reprimir a absorção de xilose.

As leveduras *P. membranifaciens* LJ04 e *P. kudriavzevii* LJ03 também foram avaliadas em meios de adaptação, na temperatura de 40°C, quanto a produção de etanol e consumo de açúcares em fermentação de hidrolisado de sorgo sacarino, em 120 horas de fermentação.

A Figura 13 apresenta os resultados da produção de etanol da levedura *P. membranifaciens* LJ04. Observa-se que, no meio de cultivo 1, as maiores concentrações de etanol ocorreram após 24 horas de fermentação, sendo que em 48 horas de fermentação houve um pico de produção de 40,8 g L⁻¹ de etanol, e o rendimento fermentativo foi de 61,6%.

Os meios 2 e 3 resultaram em valores significativamente maiores de etanol, em relação ao meio 1. No meio 2, após 5 horas de fermentação grandes concentrações de etanol foram produzidas, sendo que em 48 horas de fermentação a concentração de etanol atingiu um valor máximo de 49,4 g L⁻¹, o rendimento deste

meio foi de 74,5%. No meio 3, após 12 horas de fermentação a levedura produziu concentrações crescentes de etanol, sendo que a maior concentração foi de 47,75 gL⁻¹ em 48 horas de fermentação, o rendimento deste meio foi de 72,0%.

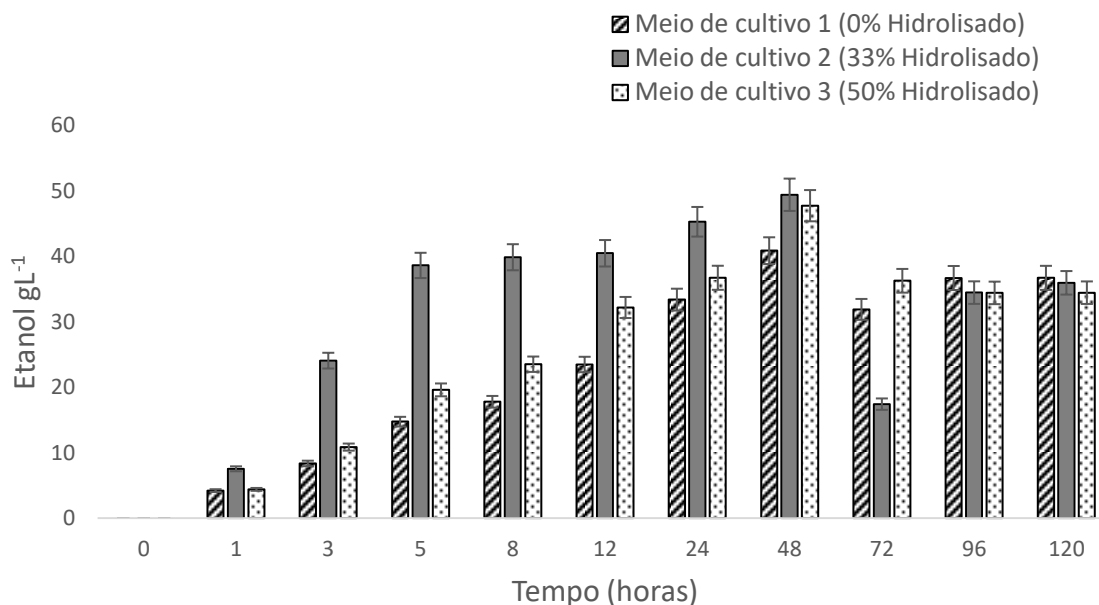


Figura 13. Produção de etanol por *P. membranifaciens* em temperatura de 40°C adaptadas em diferentes meios de cultivo, durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

Na Figura 14, a produção de etanol pela levedura *P. kudriavzevii* LJ03 foi avaliada na temperatura de 40°C. Pode-se observar que maiores concentrações de etanol ocorreram na faixa de 48 a 120 horas de fermentação para todos os meios avaliados. Os meios 1 e 2 resultaram em concentrações de etanol maiores em relação ao meio 3.

No meio de cultivo 1, a maior concentração de etanol produzida foi de 33,95 gL⁻¹, no tempo de 120 horas, com rendimento fermentativo de 51,2%. Já para o meio 2, a maior concentração de etanol foi de 37,53 gL⁻¹, produzida após 72 horas de fermentação e o rendimento de 56,5%. No meio 3, a maior concentração de etanol foi de 27,6 gL⁻¹, produzida em 96 horas de fermentação, o rendimento fermentativo para este meio foi de 41,6%.

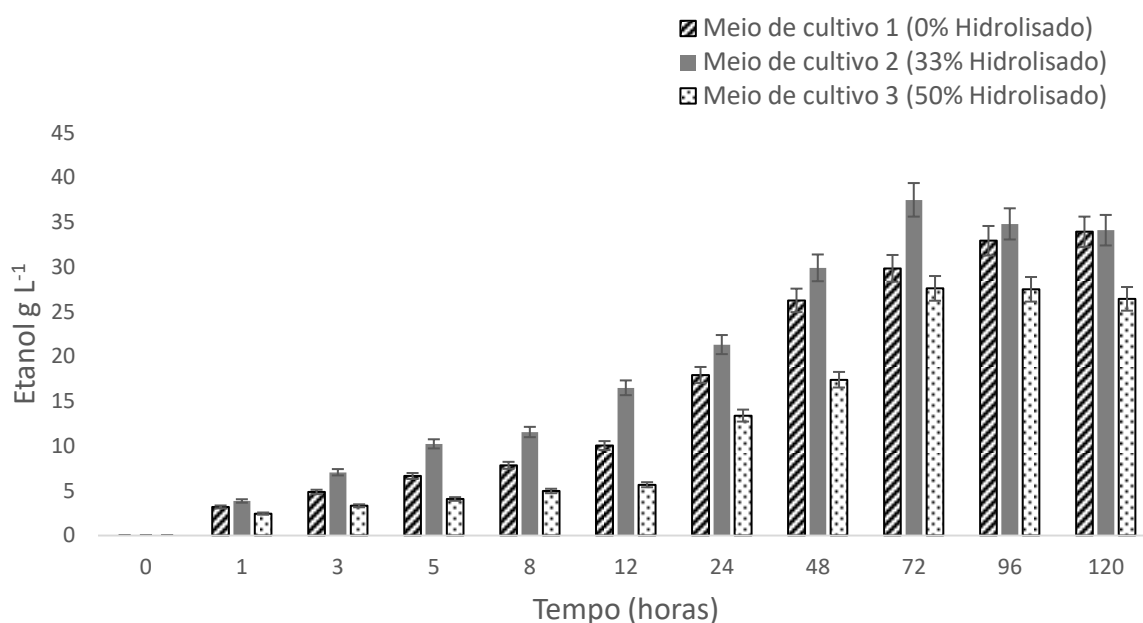


Figura 14. Produção de etanol por *P. kudriavzevii* em temperatura de 40°C adaptadas em diferentes meios de cultivo, durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

O controle da temperatura durante os processos fermentativos possui grande importância, pois valores acima de 35°C podem ocasionar prejuízos às leveduras, causar a evaporação do etanol produzido e fornecer condições ótimas para a propagação de bactérias (Cardoso, 2006). Muitas cepas de *P. kudriavzevii* produziram etanol e cresceram a 41 °C, enquanto algumas cepas cresceram a uma temperatura superior a 41 °C e até 43 °C (Isono et al., 2012). Comparado com *S. cerevisiae*, uma boa espécie de levedura produtora de etanol que apresenta alta tolerância ao etanol (Chi e Arneborg 2000), *P. kudriavzevii* apresenta maior termotolerância que a maioria das cepas de *S. cerevisiae* (Edgardo et al. 2008; Sree et al. 2000), o mesmo pode ser observado nos resultados desta pesquisa, pois as leveduras isoladas *P. kudriavzevii* LJ03 e *P. membranifaciens* LJ04 apresentaram capacidade termotolerante, pois fermentaram em temperatura de 37°C e 40°C.

Ambas as leveduras avaliadas neste estudo resultaram em bons rendimentos fermentativos de etanol, mesmo estas sendo testadas em temperaturas consideradas mais altas do que as temperaturas de fermentações convencionais. Koutinas et al. (2016) avaliando a fermentação em diferentes temperaturas com a

levedura *P. kudriavzevii*, encontrou valores superiores de rendimento fermentativo. A concentração de etanol atingida foi de 54 g L⁻¹ a 42° C e atingiu 39 e 40 g L⁻¹ a 37° e 40° C, respectivamente, porém estas foram avaliadas em condições diferentes do presente estudo.

Quanto ao consumo de glicose (Figura 15), a levedura *P. membranifaciens* LJ04, avaliada em temperatura de 40°C, consumiu quase toda a glicose disponível no meio ao longo de 120 horas de fermentação. O maior consumo de glicose, para as leveduras adaptadas no meio 1, ocorreu após 24 horas de fermentação, e em 120 horas de fermentação a concentração de glicose residual no meio foi de 2,63 gL⁻¹, 97,0% de toda a glicose foi consumida. O meio 2, foi o que as leveduras consumiram de forma mais rápida a glicose do meio, sendo que após 5 horas de fermentação havia uma concentração de 3,33 gL⁻¹ de glicose disponível no meio, e em 120 horas a concentração residual foi 1,97 gL⁻¹ (97,7% consumida). No meio 3, após 24 horas de fermentação quase toda a glicose havia sido consumida, sendo que ao final de 120 horas de fermentação, 2,43 gL⁻¹ de glicose não foram consumidas, ou seja 97,3% deste açúcar foi consumido.

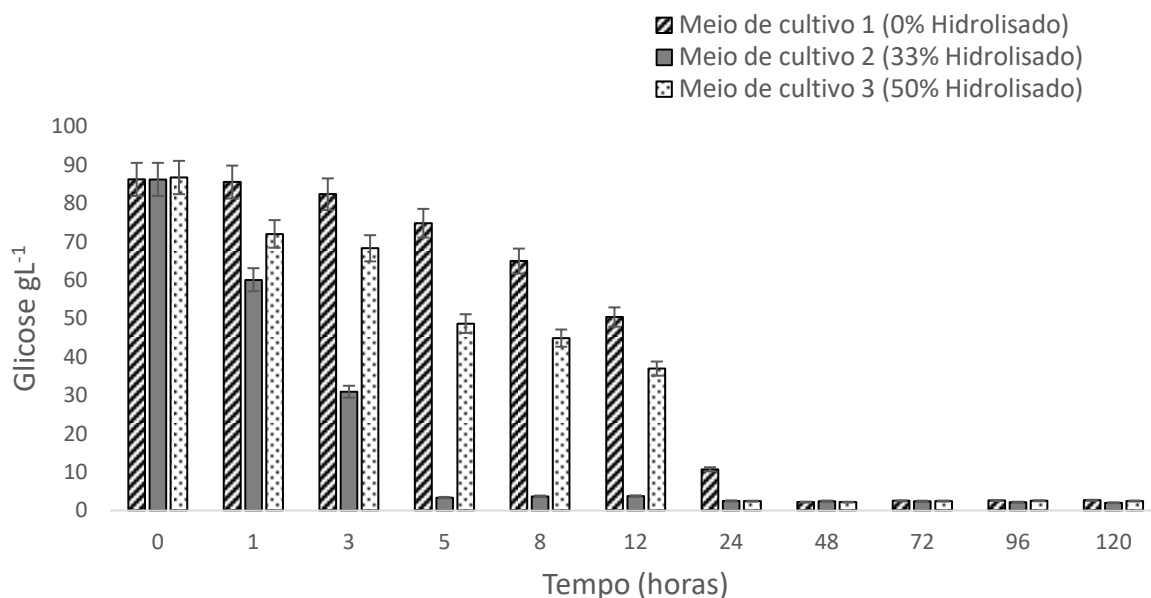


Figura 15. Consumo de glicose por *P. membranifaciens* em temperatura de 40°C adaptadas em diferentes meios de cultivo, durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

Na Figura 16 o comportamento da levedura *P. kudriavzevii* LJ03 foi avaliado em relação ao consumo de glicose na temperatura de 40°C. O melhor meio de adaptação para esta levedura em relação ao consumo de glicose foi o meio 2, que após 24 horas consumiu 97,5% de toda glicose disponível, sendo que ao final de 120 horas de fermentação, apenas 2,22 gL⁻¹ de glicose não foi consumida. No meio 1, após 24 horas de fermentação, metade de toda a glicose disponibilizada foi consumida, porém a concentração de glicose disponível ao final de 120 horas foi de 12,63 gL⁻¹, ou seja 85,4% foi consumida. O meio de adaptação 3 foi menos efetivo para a levedura, pois a levedura foi incapaz de consumir toda a glicose, após 120 horas de fermentação, uma concentração de 18,86 gL⁻¹ ainda estava disponível no meio, o consumo total para este açúcar foi de 78,1%.

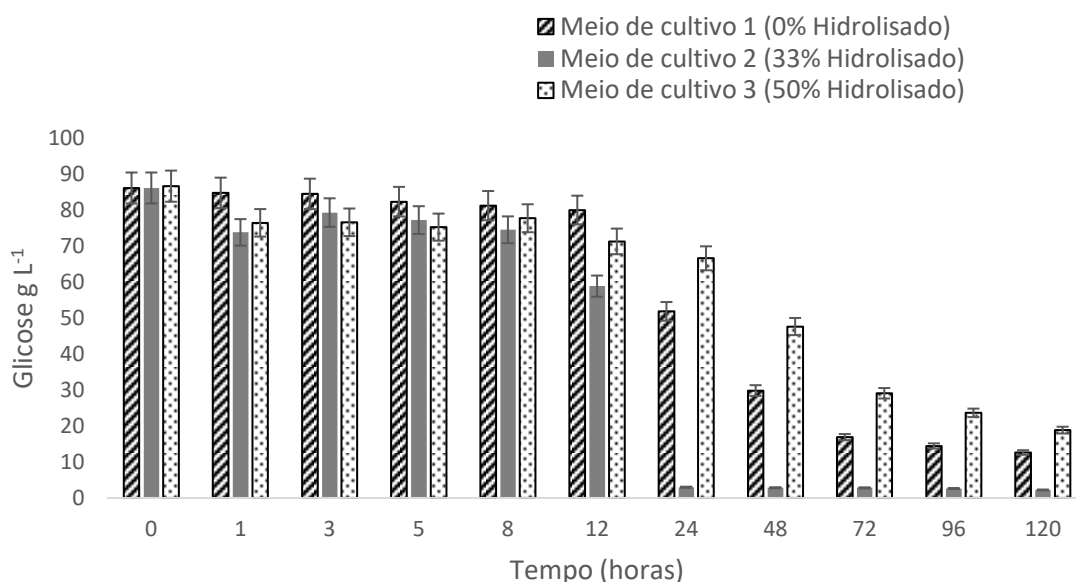


Figura 16. Consumo de glicose por *P. kudriavzevii* em temperatura de 40°C adaptadas em diferentes meios de cultivo, durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

As Figuras 17 e 18 representam o comportamento das leveduras quanto ao consumo de xilose, em temperatura de 40°C.

No meio de adaptação 1 (Figura 17), o consumo de xilose foi lento, sendo que após 48 horas se observou uma maior assimilação deste açúcar. Ao final de 120 horas, 26,65 gL⁻¹ ainda estavam disponíveis no meio, ou seja 42,9,0% foi consumida.

No meio de cultivo 2, a maior assimilação de xilose aconteceu após 24 horas de fermentação. A concentração residual de xilose foi de 22,9 gL⁻¹ ao final de 120 horas de fermentação, sendo 47,7% consumida. No meio 3, após 24 horas de fermentação houve maior assimilação da xilose, porém ao final de 120 horas de fermentação, 24,33 gL⁻¹ não foram consumidas, sendo o consumo total de 44,7%.

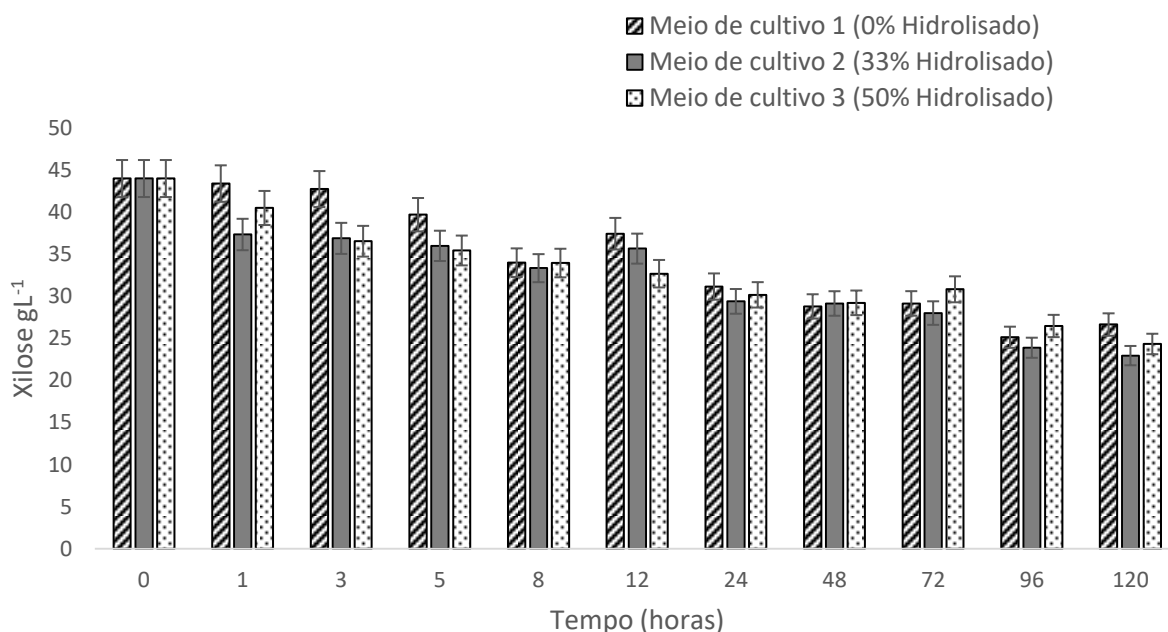


Figura 17. Consumo de xilose por *P. membranifaciens* em temperatura de 40°C adaptadas em diferentes meios de cultivo, durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

Na Figura 18 estão apresentados os resultados do consumo de xilose ao longo das 120 horas de fermentação em 40°C pela levedura *P. kudriavzevii* LJ03. O maior consumo deste açúcar ocorreu para a levedura proveniente do meio 2, que foi capaz de consumir 92,9% de xilose, sendo está a levedura e a condição onde o maior consumo de xilose foi encontrado para este estudo, isto pode estar correlacionado com indisponibilidade de glicose a partir das 24 horas de fermentação, o que fez com que a levedura passasse a consumir e fermentar a xilose disponível. Para os meios 1 e 3 o consumo de xilose foi de 42% e 38% respectivamente.

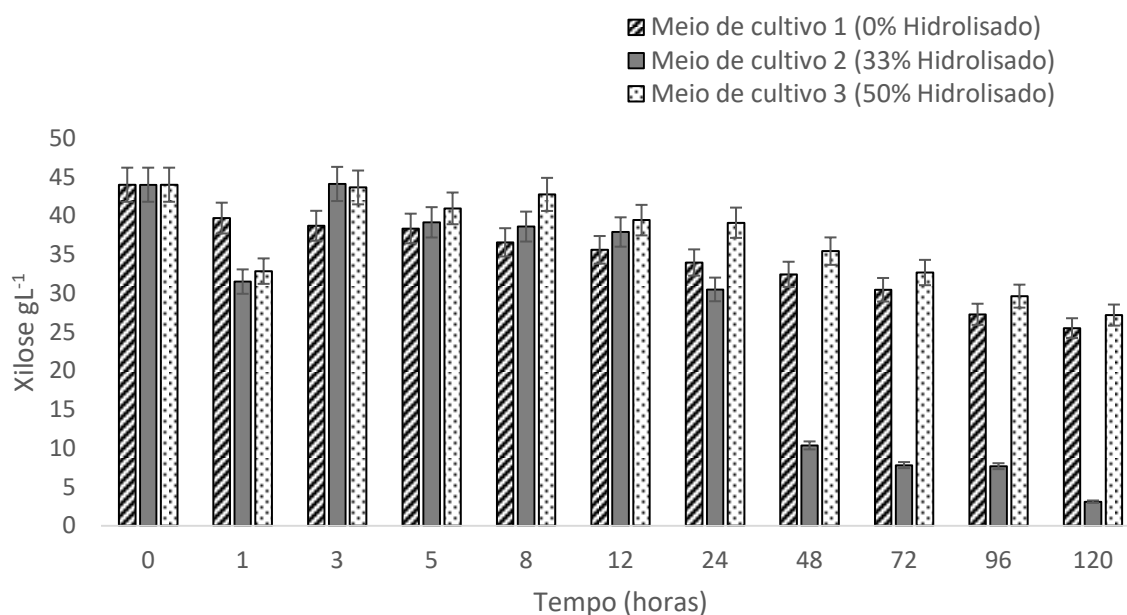


Figura 18. Consumo de xilose por *P. kudriavzevii* em temperatura de 40°C adaptadas em diferentes meios de cultivo, durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

Algumas linhagens de leveduras termotolerantes e produtoras de etanol foram isoladas e modificadas para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósicas. Segundo Watanabe et al. 2009, *Candida glabrata* é uma candidata promissora para o desenvolvimento do processo de SSF, já que esta levedura é tolerante tanto à alta temperatura quanto à alta concentração de ácidos, juntamente com uma capacidade superior de produção de etanol. *Kluyveromyces marxianus* também é promissora na produção de etanol a temperaturas mais elevadas. Muitas cepas de *K. marxianus* crescem bem a temperaturas tão altas quanto 45–52 °C e pode eficientemente produzir etanol a temperaturas que variam de 38 a 45 °C. Além disso, *K. marxianus* oferece outras vantagens como alta taxa de crescimento e a capacidade de utilizar uma ampla gama de açúcares como substratos (por exemplo, galactose, arabinose, xilose e manose) a níveis elevados de temperaturas (Fonseca et al., 2008). *K. marxianus* DMKU 3-1042 foi obtido por isolamento e seleção na produção de etanol a alta temperatura a partir de caldo de cana a 40 e 45 °C (Limtong et al. 2007a), e teve a capacidade de crescer e fermentar etanol a partir de hexoses e pentoses a 40°C (Rodrussamee et al. 2011). Brooks (2008) isolou *S.*

cerevisiae R-8 de casca de banana madura para produzir etanol e mostrou que era uma cepa de levedura floculante que pode tolerar de 4,7-9,4% (v/v) de etanol e é capaz de fermentar etanol a 37- 42°C. Kumar et al. (2009) relataram o isolamento de *Kluyveromyces* sp. IIPE453 do solo que poderia fermentar 20% de glicose em 48 h a 50° C e produzir uma concentração máxima de etanol de $8,2 \pm 0,5\%$ (p / v). Kwon et al. (2011) isolaram e selecionaram *Issatchenkia orientalis* (*P. kudriavzevii*) que foi capaz de produzir etanol com rendimentos teóricos de 85 e 47% a 42 e 45°C, respectivamente.

As leveduras *P. kudriavzevii* LJ03 e *P. Membranifaciens* LJ04 avaliadas nesta pesquisa, são candidatas promissoras para fermentações com temperaturas de acima de 37°C, além de mostrarem-se aptas a serem utilizadas em fermentações com pentoses e hexoses.

Ressalta-se que nos testes de fermentação, os resultados de consumo de arabinose foram inexpressivos neste estudo, e devido a isto estes não estão apresentados graficamente. Em relação a produção de xilitol, em ambas as leveduras avaliadas, não houveram resultados detectáveis para a produção deste composto.

A Tabela 6, apresenta os resultados de rendimento metabólico teórico para as leveduras e os meio avaliados neste estudo.

Em relação ao rendimento metabólico teórico, ou seja, o quanto as leveduras foram capazes de metabolizar os açúcares, podemos observar que no meio 1 a levedura *P.membranifaciens*, tanto nas temperaturas de 37°C quanto em 40°C, foi a que apresentou maiores rendimentos metabólico teórico em comparação com as demais leveduras. Para o meio 2 a levedura com maior rendimento teórico foi a *P.membranifaciens* fermentada em temperatura de 40°C , o mesmo para o meio 3, cuja a levedura *P.membranifaciens* atingiu valores de 90% do rendimento.

Avaliando os meios por leveduras, podemos observar que para a levedura *P. Kudriavzevii* em temperatura de 37°C, os melhores meios de adaptação foram os meios 2 e 3, que não diferiram estatisticamente entre si. Para a *P. Kudriavzevii* 40°C o melhor meio de adaptação foram os meios 2, que resultou em valores de rendimentos estatisticamente superiores aos meio 2 e 3. Para a levedura *P.membranifaciens* 37°C o meio 2 foi o meio cuja a levedura apresentou os maiores

rendimentos metabólicos teórico. Para esta mesma levedura quando fermentada em 40°C, os meios 2 e 3 resultaram em valores de rendimentos metabólicos superiores a 90%.

Tabela 6. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para rendimento metabólico teórico para as leveduras *P. kudriavzevii* e *P. membranifaciens* fermentadas em licor hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino nas temperaturas de 37°C e 40°C.

	Rendimento Metabólico Teórico		
	Meio 1	Meio 2	Meio 3
<i>P. kudriavzevii</i> - 37°C	50%Cb	72%Ca	75%Ba
<i>P. membranifaciens</i> - 37°C	72%Ab	81%Ba	76%Bb
<i>P. kudriavzevii</i> - 40°C	64%Bb	84%Ba	60%Cb
<i>P. membranifaciens</i> - 40°C	79%Ab	92%Aa	90%Aa
Teste F	3,76*	4,93*	5,98*
DMS	0,04	0,05	0,08
CV	0,8	0,9	0,4

*significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$); ns - não significativo ($p \geq 0,05$). Letras maiúsculas comparam médias na coluna, Letras minúsculas comparam as medias na linha. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. D.M.S = Desvio Mínimo Significativo. C.V = Coeficiente de Variação.

De acordo com estes resultados, para a fermentação em maior escala (biorreatores de 2L), a melhor condição de adaptação para as leveduras escolhida foi a do meio de cultivo 2 que continha 33% de hidrolisado durante a propagação da levedura.

4.6. Fermentação em biorreatores

A partir dos resultados dos testes fermentativos, as melhores condições de adaptação foram escolhidas de acordo com a maior produção de etanol, maior consumo de açúcares e rendimento fermentativo, para a realização da fermentação em biorreatores de 2L. A melhor condição de cultivo, de acordo com os resultados, foi o meio de cultivo 2, que era composto de 33% total do volume de hidrolisado, que rendeu maiores teores de etanol, e também foi a condição em que as leveduras assimilaram mais eficientemente os açúcares.

No processo de fermentação nos biorreatores, as leveduras *P. membranifaciens* LJ04 e *P. kudriavzevii* LJ03 foram avaliadas duas temperaturas, 37°C e 40°C, para se testar qual a temperatura ótima de fermentação para estas estirpes. Em relação a produção de etanol g L⁻¹ (Figura 19), todas as leveduras

tiveram uma concentração crescente ao longo das 96 horas de fermentação. A levedura *P. membranifaciens* (37°C) foi a que atingiu maiores valores de etanol, 26,5 g L⁻¹, sendo o pico máximo de produção às 96 horas de fermentação, com rendimento de 40%. Com 40°C de fermentação, a levedura *P. membranifaciens* LJ04 obteve resultados de produção de etanol, de 25,4 g L⁻¹, com rendimento de 38,4%, após 96 horas de fermentação, não apresentando diferenças em relação a temperatura para esta levedura. A levedura *P. kudriavzevii* na temperatura de 37°C atingiu os maiores valores de concentração de etanol na faixa de 24 a 96 horas de fermentação, sendo que a concentração máxima de etanol foi às 48 horas de fermentação, com valor de 19,6 g L⁻¹ e rendimento de 26,5%. Na temperatura de 40°C, a levedura *P. kudriavzevii* apresentou as maiores concentrações de etanol a partir de 24 horas de fermentação, a maior concentração foi de 20,3 g L⁻¹ em 72 horas de fermentação e rendimento de 30%.

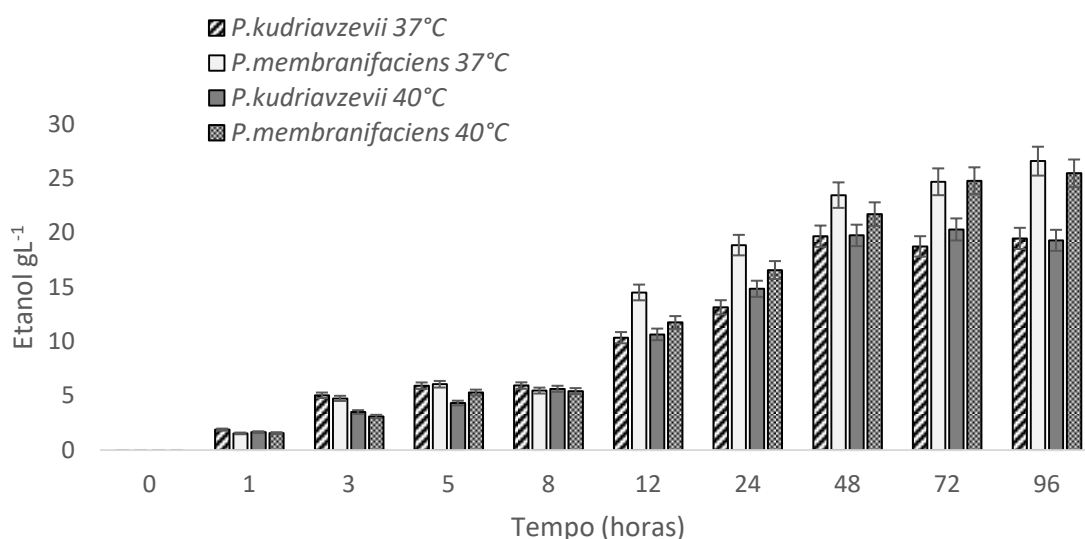


Figura 19. Produção de etanol por *P. membranifaciens* e *P. kudriavzevii* em temperaturas 37°C e 40°C fermentadas em biorreatores de 2L durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

Segundo Koutinas et al. 2015 avaliando a fermentação em diferentes temperaturas com a levedura *P. kudriavzevii*, encontrou concentrações de etanol de 54 g L⁻¹ a 42° C e atingiu 39 e 40 g L⁻¹ a 37° e 40° C, respectivamente. Freita (2017) avaliando a fermentação com *P. kudriavzevii* LJ03, observou que a produção de

etanol a partir de hidrolisado de genótipos de sorgo, foi crescente a partir de 12 horas de fermentação com produção 42 g L^{-1} , com 12 horas de fermentação.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que os rendimentos teóricos de etanol nas fermentações foram menores do que em relação aos testes fermentativos em frascos com 50 mL de licor hidrolisado de sorgo, isto mostra que para se trabalhar em escalas maiores, talvez outras condições devam ser avaliadas, como a quantidade de levedura a ser utilizada e a alimentação em batelada.

Algumas cepas de *Scheffersomyces parashehatae*, *S. illinoensis* e *Spathaspora arborariae* utilizadas para a produção de etanol celulósico em hidrolisados sintéticos e hidrolisados hemicelulósicos de cana-de-açúcar, apresentaram resultados diferentes ao deste estudo, demonstrando que após chegar ao pico máximo de produção de etanol as concentrações exibiram diminuição constantes, comportamento este atribuído à assimilação de etanol pelas cepas devido ao rápido esgotamento de açúcar do meio durante o tempo em que o oxigênio estava disponível (Cadete e Rosa, 2017).

Para que as leveduras garantam sua sobrevivência é necessário que realizem a assimilação de uma ou mais fontes de carbono, conseqüentemente o esgotamento de glicose em um curto período pode induzir à metabolização de outros compostos presentes no meio.

Temperatura elevada e altas concentrações de etanol induzem respostas de estresse em células de levedura, estas respondem às tensões de calor e etanol sintetizando proteínas de choque térmico após exposição a temperaturas acima de 35°C ou níveis de etanol superiores a 4-6% (v/v) (Tikka et al., 2013).

A combinação de uma temperatura de 35°C e uma concentração de etanol de 4% (v/v) é adequada para selecionar leveduras termotolerantes. Se uma levedura for capaz de crescer a uma temperatura ligeiramente acima da temperatura máxima de levedura mesofílicas, que varia de 35 a 40°C , está pode ser considerada termotolerante (Piper, 1995). Muitos estudos relataram leveduras termotolerantes crescendo em faixas de temperatura semelhantes às descritas neste estudo, como os de Sree et al.(2000) e Choi et al. (2010), isto demonstra que as leveduras *P. kudriavzevii* LJ03 e *P. membranifaciens* LJ04 podem ser denominadas leveduras termotolerantes.

Altas temperaturas e altas concentrações de etanol são os principais fatores de estresse para levedura durante o processo de fermentação, inibindo a divisão celular e a taxa específica de crescimento. Além disso, esses fatores afetam vários sistemas de transporte, como os processos gerais de aminoácidos e absorção de glicose (Techaparin, Thanonkeo e Klanrit, 2017). Os isolados de levedura obtidos neste estudo, possuem níveis de tolerância à alta temperatura e ao etanol. Suutari et al. (2012) encontraram uma correlação negativa entre a capacidade de fermentação e o aumento da temperatura, essa correlação foi atribuída a mudanças na fluidez da membrana de *S. cerevisiae* a altas temperaturas.

A Figura 20, apresenta os resultados em relação ao consumo de glicose pelas leveduras. As leveduras estudadas consumiram quase totalmente a glicose presente na fermentação ao longo das 96 horas de fermentação. Não houve diferenças entre as leveduras e as temperaturas em relação ao consumo de glicose. Podemos observar que a partir das 48 horas a concentração de glicose manteve-se constante e isto está diretamente relacionada com a produção de etanol, que a partir de 48 horas também não resultou em alterações significativas nas concentrações deste componente. Visando uma produção industrial de etanol, a fermentação seria mais rentável e economicamente viável se ocorresse apenas até 48 horas de fermentação, visto que não há incrementos significativos nas concentrações de etanol após este período.

O consumo de xilose (Figura 21) não foi significativo para as leveduras estudadas, as leveduras consumiram de forma lenta a xilose presente no hidrolisado. Ao final das 96h de fermentação grande parte da xilose não foi metabolizada pelas leveduras, demonstrando que a levedura em sua via metabólica possui preferência e o rápido consumo de glicose primeiramente. Antunes (1997) e Betancur (2010) relataram que o sistema de transporte para glicose é constitutivo e indutivo para xilose, podendo acarretar repressão do consumo de xilose na presença de glicose. Devido a isso, observou-se neste estudo que não houve total esgotamento de glicose e as menores concentrações deste açúcar só ocorreram após 48 horas, e neste período o consumo de xilose não foi maior.

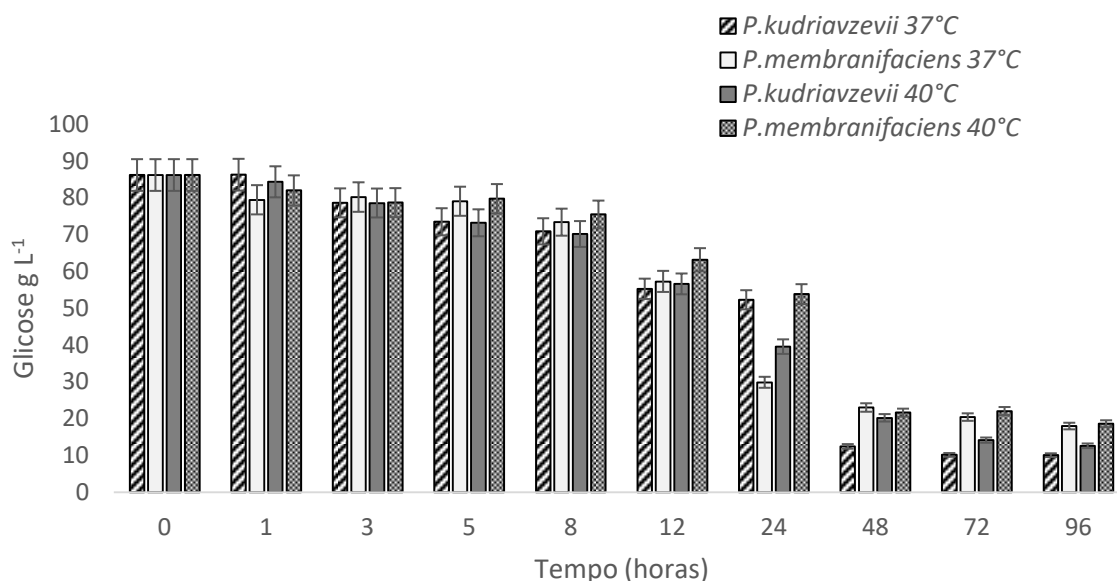


Figura 20. Consumo de glicose por *P. membranifaciens*; *P. kudriavzevii* em temperaturas 37°C e 40°C fermentadas em biorreatores de 2L durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino. *As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

Em seus estudos, Freire (2012), percebeu que a velocidade de assimilação da xilose era maior na presença de glicose, em relação ao consumo apresentado somente na presença de pentose em uma cepa de bactéria recombinante utilizada para produção de etanol de segunda geração.

P. kudriavzevii já foi relatada anteriormente para produzir etanol a partir de caldo de cana, hidrolisado de milho e hidrolisado de mandioca (Zhang et al., 2017), porém para a levedura *P. membranifaciens* ainda não há relatos na literatura da utilização desta levedura em fermentações para a produção de etanol.

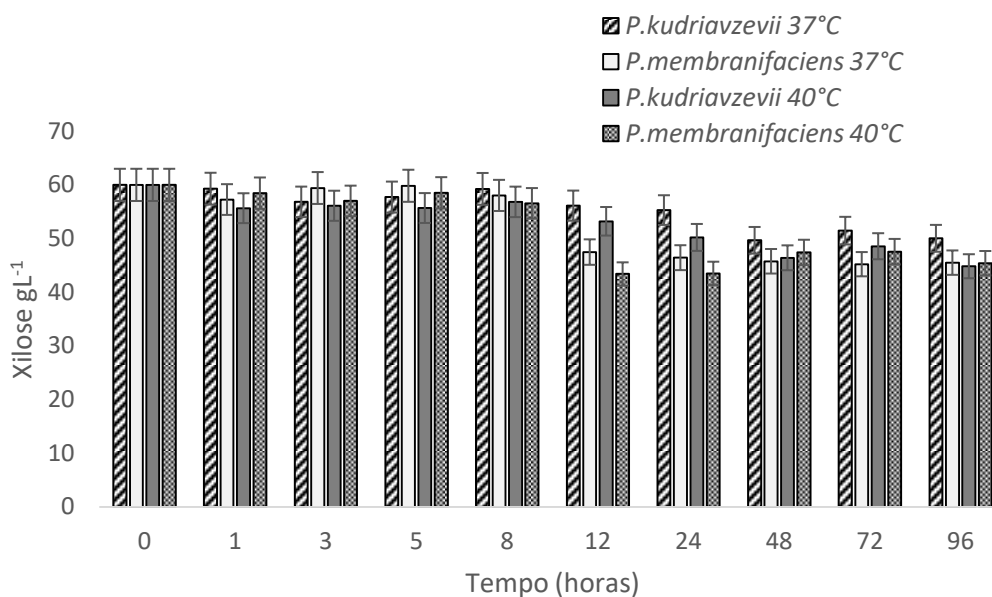


Figura 21. Consumo de xilose por *P. membranifaciens* e *P. kudriavzevii* em temperaturas 37°C e 40°C fermentadas em biorreatores de 2L durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino. As barras de erro representam os desvios $\pm$ dos resultados dos experimentos em triplicadas.

Na Figura 22, observamos que mesmo em baixas concentrações, a arabinose foi um açúcar pouco utilizado pelas leveduras avaliadas neste estudo durante o processo fermentativo, obtendo uma taxa de assimilação média de apenas 2gL^{-1} para todos os tratamentos. O baixo consumo desta pentose por leveduras já foi relatado anteriormente em licores obtidos de bagaço de cana-de-açúcar (Felipe et al., 1997; Roviero, 2016) e de bagaço de sorgo (Freita, 2017).

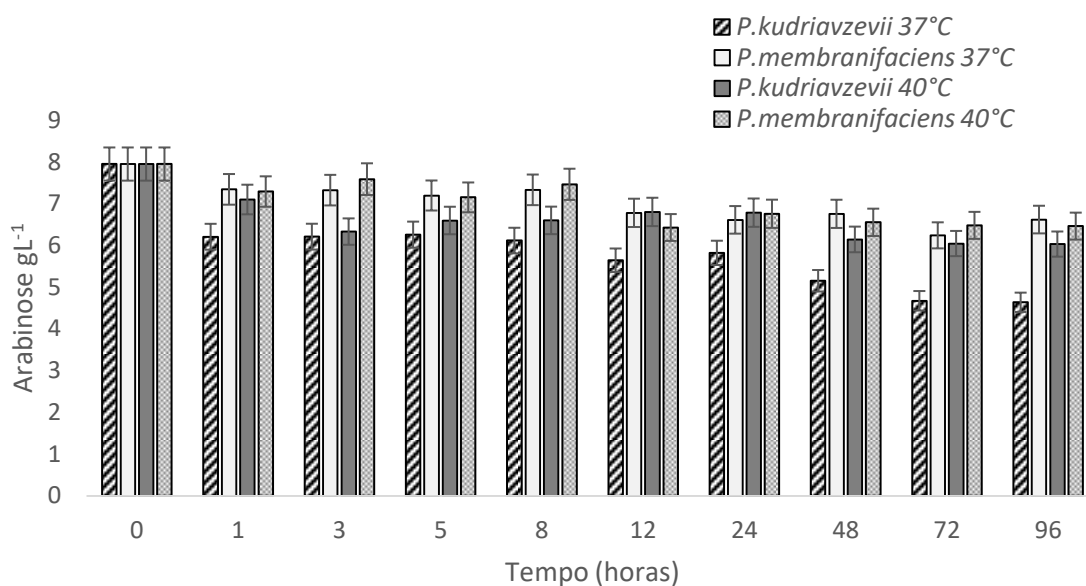


Figura 22. Consumo de arabinose por *P. membranifaciens*; *P. kudriavzevii* em temperaturas 37°C e 40°C fermentadas em biorreatores de 2L durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino. As barras de erro representam os desvios $\pm$ dos resultados dos experimentos em triplicadas.

A concentração dos inibidores tem uma forte influência no desempenho de fermentação da levedura. Os hidrolisados lignocelulósicos contêm concentrações variáveis de compostos inibitórios dependendo da composição da matéria-prima utilizada no processo, e da severidade e tipo de pré-tratamento utilizado.

Concentrações elevadas de furfural inibem o metabolismo oxidativo da levedura, enquanto a concentração de HMF é suficientemente baixa para ser rapidamente reduzida e pode não inibir o metabolismo celular. Da degradação das pentoses resulta o furfural e da degradação das hexoses, o inibidor produzido é o HMF, os quais são muito problemáticos para a etapa de fermentação.

Na Figura 23, podemos observar que as concentrações de furfural presentes nas fermentações avaliadas não foram expressivas, variando de 0,1 a 0,8 g L⁻¹, e a partir de 24 horas este componente não foi detectado nas fermentações. Este componente é proveniente principalmente do processo de pré-tratamento, e a baixa concentração nos resultados de fermentação indicam que o pré-tratamento de

explosão à vapor foi efetivo, não resultando na formação de grandes concentrações de inibidores.

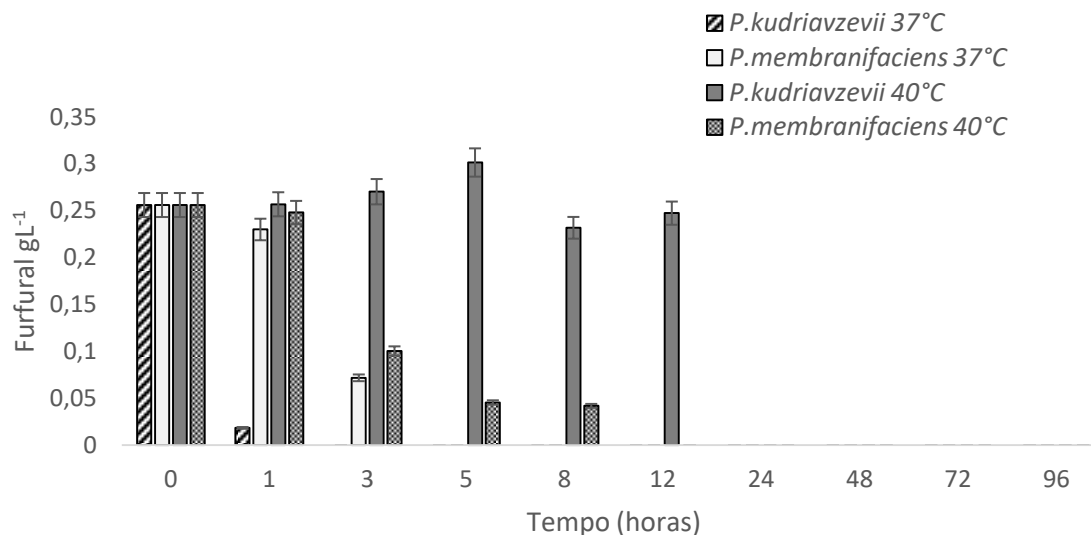


Figura 23. Concentração de furfural em fermentação por *P. membranifaciens*; *P. kudriavzevii* em temperaturas 37°C e 40°C fermentadas em biorreatores de 2L durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios $\pm$ dos resultados dos experimentos em triplicadas.

Na figura 24 são apresentados os resultados do composto inibidor HMF, nota-se que as concentrações deste componente foram de um modo geral baixas, sendo que os valores não ultrapassaram $0,7 \text{ gL}^{-1}$ para nenhuma das leveduras em estudo. Este composto é formado no processo de pré-tratamento através da degradação das hexoses. Observa-se que ao longo das 96 horas de fermentação as concentrações de HMF foram decrescentes para todas as leveduras, exceto para a levedura *P. kudriavzevii* na temperatura de 40°C, em que as concentrações se mantiveram acima de $0,5 \text{ gL}^{-1}$ ao longo dos tempos de fermentação.

Para atenuar o efeito dos inibidores e melhorar a eficiência da fermentação, estratégias que melhorem a tolerância natural do microrganismo estão sendo desenvolvidas, como os processos de detoxificação. Este processo, que envolve diferentes tipos de tratamentos dos hidrolisados, é uma das técnicas utilizadas, que demonstrou melhorar drasticamente a fermentabilidade do hidrolisado

lignocelulósico com presença de inibidores. Neste estudo, devido a característica do processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática utilizados, o licor hidrolisado não foi detoxificado, devido à baixa concentração de inibidores formados no processo de pré-tratamento de explosão à vapor.

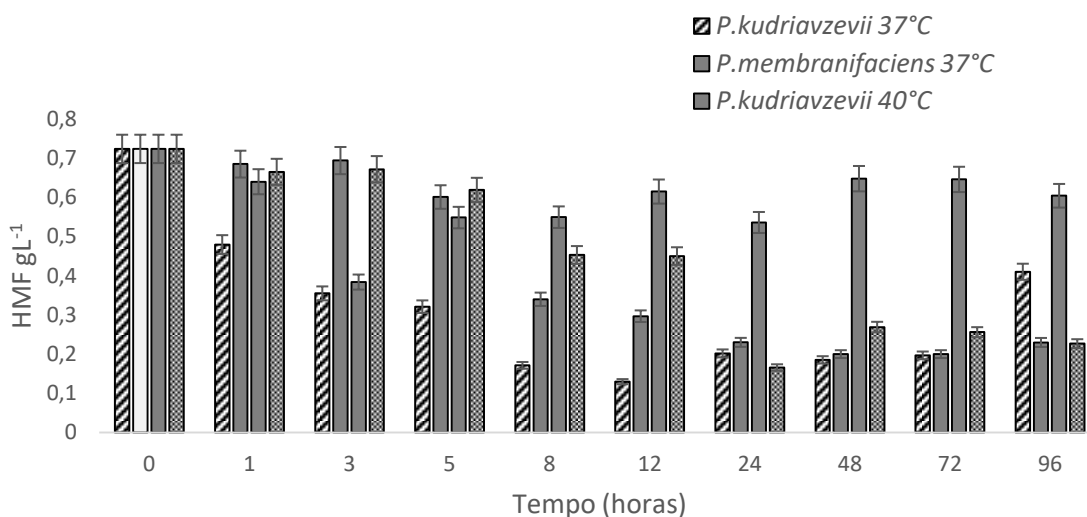


Figura 24. Concentração de hidroximetilfurfural (HMF) em fermentação por *P. membranifaciens*; *P. kudriavzevii* em temperaturas 37 e 40°C fermentadas em biorreatores de 2L durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios $\pm$ dos resultados dos experimentos em triplicadas.

A Figura 25 apresenta os resultados de produção de glicerol. Nos tratamentos avaliados, as menores concentrações de glicerol foram produzidas na fermentação por *P. kudriavzevii* LJ03 na temperatura de 40°C, para os demais tratamentos os valores foram em média de 10g L⁻¹, valores estes considerados prejudiciais para as leveduras e os rendimentos fermentativos. A produção de glicerol é principalmente uma resposta metabólica das células de levedura à elevadas concentrações de etanol (Goshadrou, Karimi e Taherzadeh, 2011).

O glicerol é um composto secundário que se forma na mesma via do etanol e é inversamente proporcional à sua produção, portanto o ideal de uma fermentação é a menor produção possível de glicerol (Amorim et al., 1996). Nesta pesquisa, podemos relacionar as concentrações elevadas de glicerol formadas às condições estressantes do ambiente fermentativo, como a elevada temperatura e a alta concentração de etanol. Um outro fator que pode estar relacionado a maior

produção de glicerol é alta concentração de açúcar, efetuado de uma única vez, no qual a levedura não metaboliza todo esse açúcar, gerando estresse osmótico, aumentando-se a produção de glicerol e, diminuindo o rendimento fermentativo.

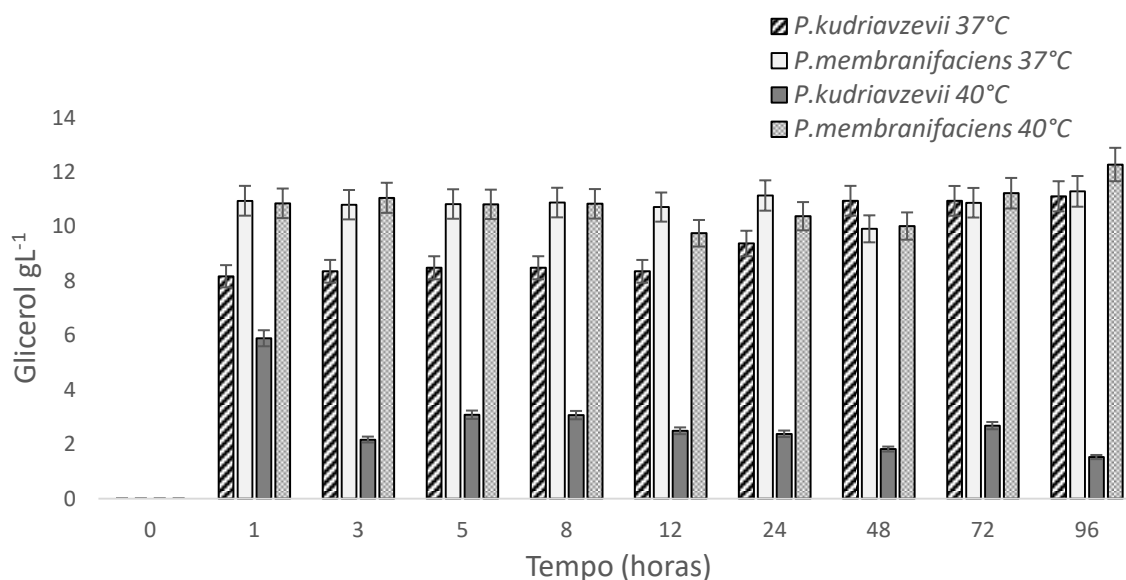


Figura 25. Concentração de glicerol em fermentação por *P. membranifaciens* e *P. kudriavzevii* em temperaturas 37°C e 40°C fermentadas em biorreatores de 2L durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios dos resultados dos experimentos em triplicadas.

O ácido acético (Figura 26) é um produto formado em pequenas quantidades. As presenças de ácidos orgânicos, como o acético e láctico, resultam em um aumento no consumo de ATP pela levedura. Nessas condições, parte do ATP que seria utilizado para crescimento ou fermentação é desviado para manutenção de seu pH interno (Narendranath et al., 2001).

Nas fermentações avaliadas, as concentrações de ácido acético foram elevadas, com médias gerais ao longo das 96 horas de fermentação de 9,4 gL⁻¹, 11,28 gL⁻¹, 5,09 gL⁻¹ e 11,2 gL⁻¹ para *P.kudriavzevii* 37°C, *P. membranifaciens* 37°C, *P.kudriavzevii* 40°C e *P.membranifaciens* 40°C, respectivamente. A levedura *P. membranifaciens* em ambas as temperaturas avaliadas, resultaram em maiores concentrações de ácido acético, à vista desses resultados, podemos aferir, de acordo com a literatura, que concentrações de ácido acético encontradas nos tratamentos, podem ser indícios da utilização do etanol como substrato pelas

leveduras, uma vez que ele é convertido em acetaldeído, que pode ser transformado em acetato ou sofrer oxidação e gerar ácido acético (Walker, 1998).

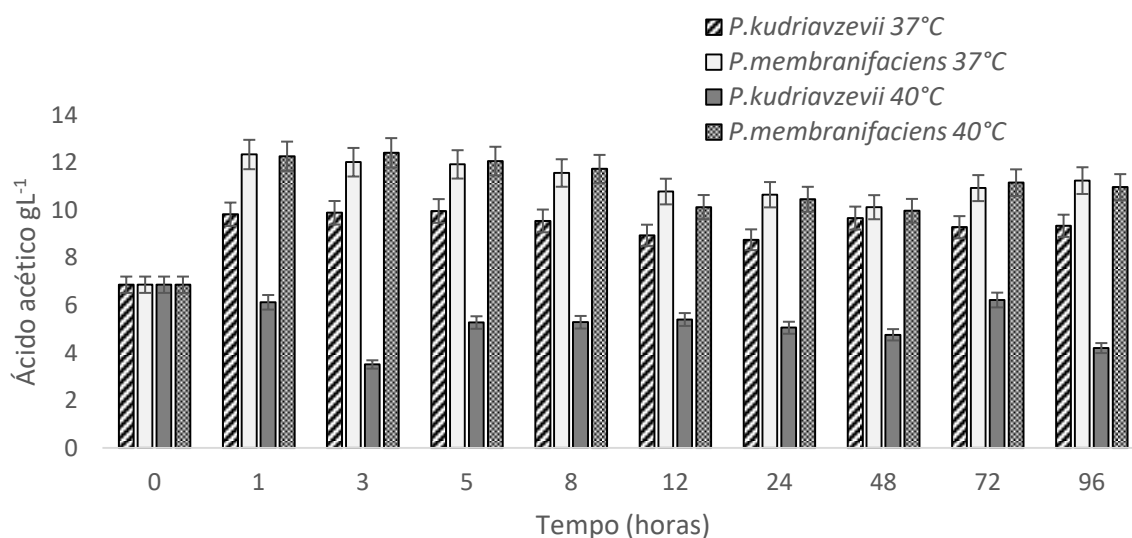


Figura 26. Concentração de ácido acético em fermentação por *P. membranifaciens* e *P. kudriavzevii* em temperaturas 37°C e 40°C fermentadas em biorreatores de 2L durante 120 horas de fermentação em hidrolisado de bagaço de sorgo sacarino.

*As barras de erro representam os desvios $\pm$ dos resultados dos experimentos em triplicadas.

As Figuras 27, 28, 29 e 30 apresentam os resultados cinéticos do consumo dos açúcares (glicose e xilose) e produção de etanol para as leveduras *P. kudriavzevii* LJ03 e *P. membranifaciens* LJ04 nas temperaturas de 37°C e 40°C.

Na Figura 27, observa-se que a levedura *P. kudriavzevii* LJ03 na temperatura de 37°C, no início da fermentação consumiu a glicose preferencialmente, sendo que com 48 horas de fermentação 86% da glicose já havia sido consumida, mesmo período em que a produção máxima de etanol foi alcançada. A levedura consumiu xilose, porém este consumo foi maior a partir de 48 horas, mesmo período em que a glicose já não estava mais disponível no meio, e pode-se observar incrementos na concentração de etanol a partir de 72 horas de fermentação, demonstrando que o etanol estava sendo produzido a partir da xilose. Apenas 16,7% de toda a xilose disponível foi consumida ao longo das 96 horas de fermentação.

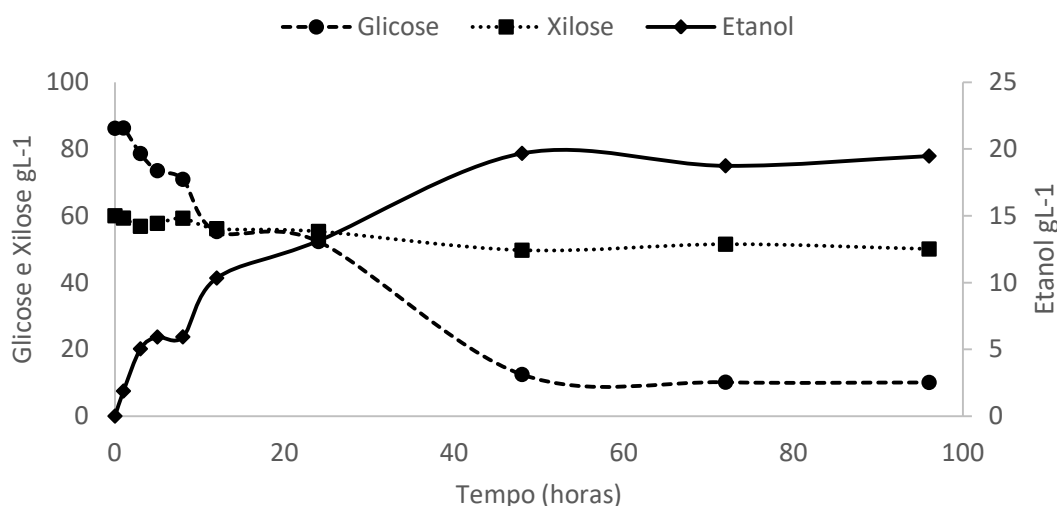


Figura 27. Concentração de glicose (círculos), xilose (quadrados) e etanol (triângulos) durante a fermentação em 37°C pela levedura *P. kudriavzevii* LJ03.

Na Figura 28, a cinética de consumo dos açúcares e produção de etanol da levedura *P. membranifaciens* fermentada em 37°C mostra que 79,2% de toda a glicose disponível foi consumida, sendo que com 24 horas de fermentação 65% deste açúcar já havia sido consumido. Comparando-se com a levedura *P. kudriavzevii* fermentada em 37°C, o consumo de glicose pela *P. membranifaciens* foi menor, porém ocorreu de forma mais rápida. Em relação ao consumo de xilose, esta levedura foi capaz de metabolizar 24,2% de toda quantidade disponível. O maior consumo ocorreu a partir de 12 horas de fermentação, porém a partir de 48 horas observa-se que este consumo foi estabilizado, visto que ainda existia muita glicose disponível no meio fermentativo. A maior concentração de etanol ($26,6 \text{ g L}^{-1}$) ocorreu em 96 horas de fermentação, produção está maior do que a observada na fermentação com *P. kudriavzevii* LJ03 a 37°C que foi de $19,6 \text{ g L}^{-1}$.

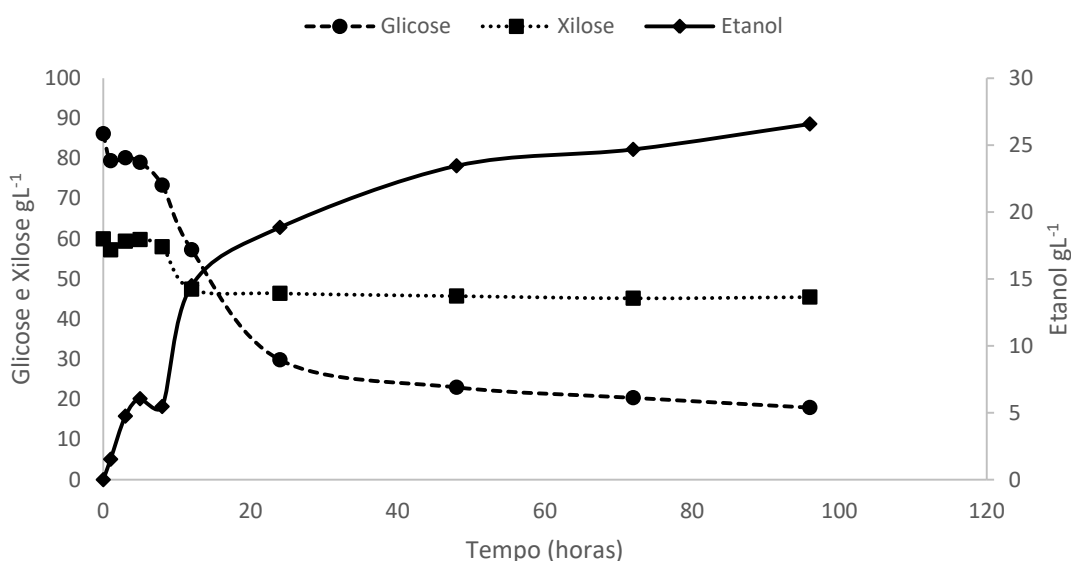


Figura 28. Concentração de glicose (círculos), xilose (quadrados) e etanol (triângulos) durante a fermentação em 37°C pela levedura *P. membranifaciens*.

As Figuras 29 e 30 apresentam os resultados consumo de açúcares e produção de etanol em fermentação de 40°C.

A levedura *P. kudriavzevii* LJ03 em temperatura de 40°C (Figura 29), consumiu 85,3% de glicose durante a fermentação, sendo que o consumo foi crescente a partir de 24 horas. Em relação à xilose, 25% deste açúcar foi consumido no período fermentativo avaliado, sendo que a partir de 48 horas de fermentação este consumo foi crescente, demonstrando que em co-fermentação de açúcares (hexoses e pentoses) esta levedura preferencialmente consome glicose primeiramente, e em seguida inicia o consumo de xilose mais efetivamente quando este açúcar está em maior concentração no meio. A maior concentração de etanol foi de 20,3 gL⁻¹ a partir de 72 horas de fermentação, resultado do consumo de ambos os açúcares.

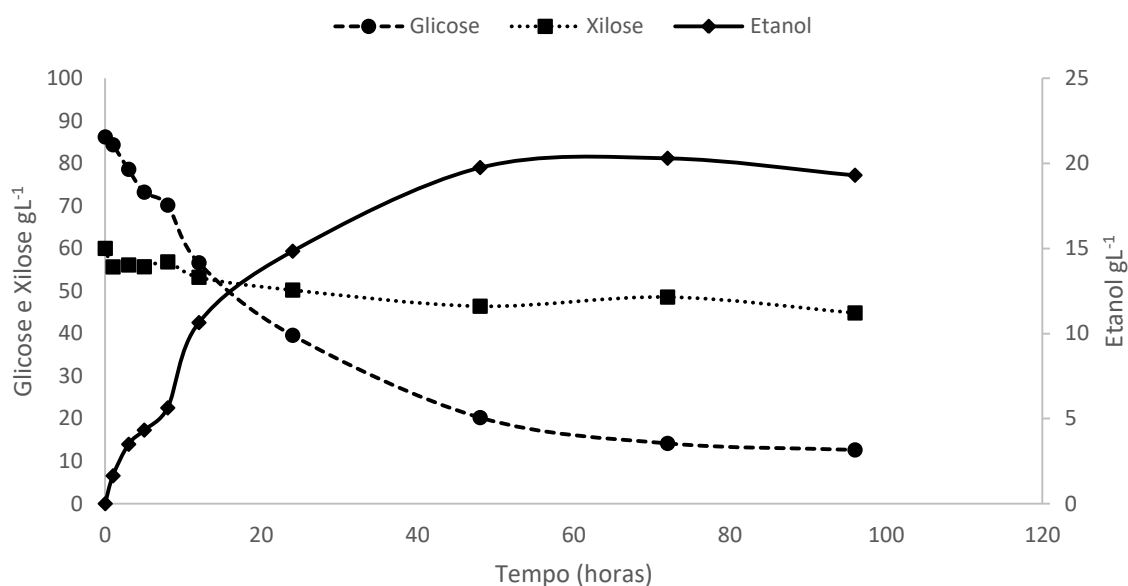


Figura 29. Concentração de glicose (círculos), xilose (quadrados) e etanol (triângulos) durante a fermentação em 40°C pela levedura *P. kudriavzevii* LJ03.

Na Figura 30, os resultados mostram que a levedura *P. membranifaciens* quando fermentada em 40°C consumiu ambos os açúcares, sendo que 78,4% de toda a glicose e 24,3% de xilose foram consumidas durante a fermentação. A partir de 24 horas de fermentação observa-se crescente consumo da glicose e o consumo de xilose inicia-se a partir de 12 horas de fermentação e depois estabilizado a partir de 40 horas. A maior concentração de etanol foi de 25,4g⁻¹ em 96 horas de fermentação.

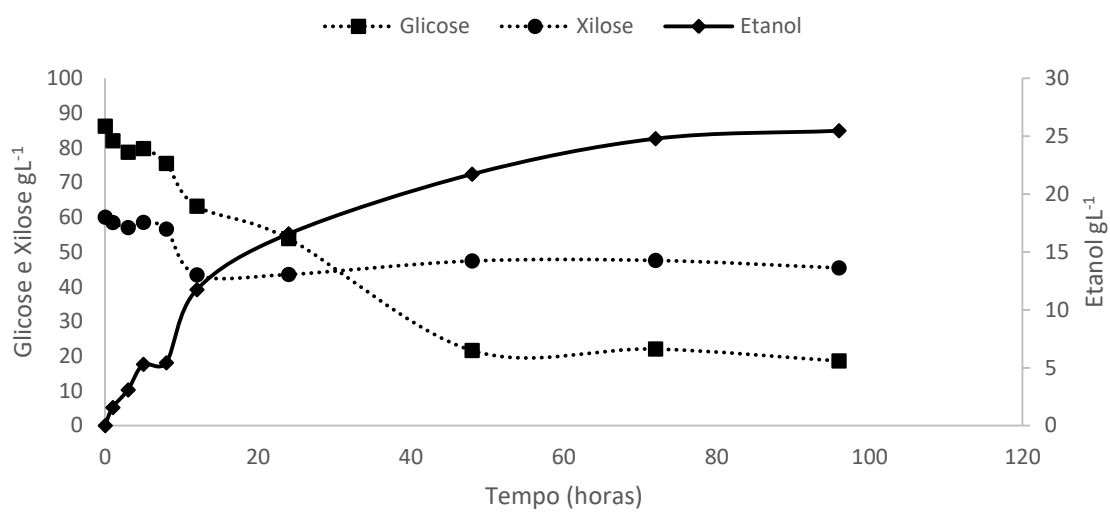


Figura 30. Concentração de glicose (círculos), xilose (quadrados) e etanol (triângulos) durante a fermentação em 40°C pela levedura *P. membranifaciens*.

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 Ecosistema 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.

Nogué, 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.

Öhgren, 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 Implantação 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>.