

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia**

Produção de etanol de segunda geração

Leandro Florentino de Andrade

Belo Horizonte

2014

Leandro Florentino de Andrade

Produção de etanol de segunda geração

Monografia apresentada ao programa
de Pós-graduação em Microbiologia
do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito para obtenção do grau
de Especialista em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Co-orientadora: Fernanda Badotti

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

2014

Agradecimentos

Agradeço a
Deus em primeiro lugar e aos que
colaboraram com mais uma realização,
incluindo colegas de curso, professores,
orientador e co-orientadora.

Dedicatória

Dedico este trabalho a
meus familiares por terem
me ajudado a mais uma conquista.

.

Sumário

1 Introdução	1
2 Revisão de literatura	3
2.1 Produção de álcool no Brasil	3
2.2 Bagaço de cana-de-açúcar	4
3 Etanol	4
3.1 Fermentação etanólica	4
3.2 Conversão de biomassa a etanol	5
4 Produção de etanol de primeira geração	7
5 Produção de etanol de segunda geração	8
5.1 Estratégias para a produção de etanol de segunda geração	9
6 Biomassa lignocelulósica	11
6.1 Celulose	12
6.2 Hemicelulose	12
6.3 Lignina	13
7 Pré-tratamentos	13
8 Hidrólise enzimática da biomassa vegetal	14
8.1 Obtenção de açúcares a partir da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar	15
8.2 Compostos inibidores da fermentação	15
9 Leveduras metabolizadoras de xilose	17
9.1 Metabolismo de xilose em leveduras	17
10 Desafios para a implementação da tecnologia do etanol de 2ª geração	18
10.1 Estratégias de fermentação de novos genes para <i>S. cerevisiae</i>	20
11 Conclusões	21
12 Referências Bibliográficas	22

Resumo

As técnicas de produção do álcool, na antiguidade apenas restritas à fermentação natural ou espontânea de alguns componentes vegetais, como açúcares, começaram a se expandir a partir do processo da destilação. O desenvolvimento de tecnologias para produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos mostra-se promissor devido às várias vantagens da utilização de biomassa residual para produção de etanol de segunda geração. Dessa forma, pode consistir em uma alternativa tecnológica, pois o bagaço de cana-de-açúcar, principal material lignocelulósico em países tropicais, possui enorme potencial energético. O bagaço da cana-de-açúcar é um dos subprodutos da indústria, assim como a palha. O bagaço pode servir como matéria-prima na produção de etanol ao ser submetido à hidrólise ácida ou enzimática, nas quais as frações de celulose e hemicelulose são convertidas a hexoses e pentoses que podem ser fermentadas a etanol. Há dois principais processos para a produção do etanol lignocelulósico ou de segunda geração. Em um deles, a celulose é submetida ao processo de hidrólise enzimática, utilizando-se enzimas denominadas celulasas. Há ainda a hidrólise ácida, feita com ácido clorídrico ou ácido sulfúrico concentrados ou diluídos. Ambos processos produzem um hidrolisado rico em glicose que é então fermentado a etanol com a finalidade de melhorar o potencial dos hidrolisados hemicelulósicos ricos em pentoses, para posterior utilização em processos de conversão. Vários tratamentos têm sido utilizados para remover ou reduzir as concentrações dos compostos tóxicos presentes nos meios fermentativos, visando a superação do efeito negativo destes inibidores nos hidrolisados. O conhecimento acerca de espécies de leveduras que fermentam pentoses ainda é limitado. Quatro novas espécies de leveduras fermentadoras de D-xilose do clado *Spathaspora* são encontradas no norte do Brasil. Estas espécies encontram-se descritas como *Spathaspora brasiliensis*, *Spathaspora suhii*, *Spathaspora roraimanensis*, *Spathaspora xylofermentans*. Todas estas espécies são capazes de fermentar D-xilose durante o crescimento aeróbico, embora com diferentes eficiências. Dentre outras espécies que fermentam D-xilose, pode-se citar: *Pachysolen tannophilus*, *Scheffersomyces stipitis*, *Scheffersomyces shehatae*, *Candida tenuis*, *Brettanomyces naardenensis* e *Scheffersomyces segobiensis*. As linhagens nativas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, organismo de escolha para a produção de etanol em processos fermentativos, são incapazes de metabolizar a D-xilose oriunda da fração hemicelulósica. Visando avançar e tornar a produção de etanol de segunda geração mais eficiente, recomenda a incorporação de técnicas da biologia molecular, a fim de dotar as linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas com a capacidade de fermentar também a D-xilose.

Palavras-chave: etanol, leveduras fermentadoras de pentoses, bagaço de cana de açúcar, hidrólise enzimática.

Abstract

The techniques of alcohol production in antiquity, only restricted to natural or spontaneous fermentation of some plant components such as sugars, began to expand from the development of the distillation process. The development of technologies to produce ethanol from lignocellulosic materials is promising due to several advantages of the use of residual biomass for second generation ethanol. Thus, it can be a technological alternative, because the sugar cane bagasse, the main lignocellulosic material in tropical countries, has enormous energy potential. The sugar cane bagasse is a byproduct of the sugar industry, as well as straw. Bagasse can serve as feedstock for ethanol production, being subjected to acid or enzymatic hydrolysis, in which the cellulose and hemicellulose fractions are converted to hexoses and pentoses that can be fermented to ethanol. There are two main processes for producing lignocellulosic or second generation. Ethanol first, the pulp is subjected to an enzymatic hydrolysis process, using enzymes called cellulases. There is also the acid hydrolysis, taken with concentrated or diluted hydrochloric or sulfuric acid. Both processes produce a hydrolyzate rich in glucose which is then fermented to ethanol with a view to improving the potential of hemicellulose hydrolyzates, rich in pentoses, for use in a subsequent conversion processes. Various treatments have been used to remove or reduce the concentrations of toxic compounds present in the fermentation media, aiming to overcome the negative effect of these inhibitors in the hydrolyzates. The knowledge about yeast species which ferment pentoses is limited. Four new species of D-xylose-fermenting yeasts from the clade *Spathaspora* are found in northern Brazil. These species are described as *Spathaspora brasiliensis*, *Spathaspora suhii*, *Spathaspora roraimanensis*, *Spathaspora xylofermentans*. All of these species are able to ferment D-xylose during aerobic growth, albeit with different efficiencies. Among other D-xylose-fermenting species are: *Pachysolen tannophilus*, *Scheffersomyces stipitis*, *Scheffersomyces shehatae*, *Candida tenuis*, *Brettanomyces naardenensis* and *Scheffersomyces segobiensis*. Native strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the main organism used in the production of ethanol from fermentative processes were unable to metabolize, D-xylose originating from the hemicellulose fraction. Aiming to move forward and make the production of second generation ethanol more efficient, it's recommended the incorporation of molecular biology techniques in order to provide the *S. cerevisiae* strains used to be able to ferment D-xylose.

Keywords: ethanol, pentose -fermenting yeast, sugar cane bagasse, enzymatic hydrolysis.

1 Introdução

Os materiais lignocelulósicos representam a fração mais expressiva da biomassa vegetal, a maior fonte de compostos orgânicos da biosfera. São constituídos por três frações principais que, juntas, perfazem mais de 90% da massa seca total. São elas: celulose, hemicelulose e lignina. (HAHN HAGERDAL *et al.*, 2006).

A celulose é a base para a fabricação de papel. Extraída das árvores, as indústrias também a utilizam para a fabricação de certos tipos de plásticos, vernizes, filmes, seda artificial e diversos produtos químicos. Atualmente, a celulose também é considerada uma importante matéria-prima para a obtenção de etanol. A degradação da celulose produz celobiose e/ou glicose por meio de três enzimas, as endo- β -1,4-glucanases, as exo- β -1,4-glucanases e as β -glucosidases (celobiasas). A conformação estrutural, bem como a estreita relação com lignina, hemicelulose, amido, proteínas e minerais faz com que celulose seja altamente resistente à hidrólise. A decomposição da celulose é feita principalmente por bactérias, actinomicetos e fungos filamentosos (KLINKE *et al.*, 2004). A conversão de celulose a etanol pela utilização de um organismo capaz de degradar a celulose e fermentar o substrato de forma eficiente é considerada uma importante contribuição para tornar o processo de produção do etanol de segunda geração viável economicamente (DEN HAAN *et al.*, 2007).

A utilização de materiais lignocelulósicos em processos biotecnológicos exige na maioria das vezes, etapas preliminares de preparação, mediante hidrólise química ou enzimática, para liberação das frações celulósicas ou hemicelulósicas, seja na forma de mono ou oligossacarídeos (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000). O alto teor de pentoses, particularmente D-xilose, na fração hemicelulósica desses materiais, aliada à sua maior facilidade de extração do complexo lignocelulósico, tem atraído a atenção de pesquisadores para a efetiva utilização desta fração em processos de bioconversão. A utilização dos hidrolisados hemicelulósicos como meios de cultivos para a bioconversão de D-xilose é dificultada pela presença de compostos tóxicos ao metabolismo das leveduras fermentadoras, os quais são provenientes do processo de hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica. Em função das altas temperaturas e condições ácidas empregadas neste procedimento, furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), ácidos alifáticos e compostos fenólicos são produzidos atuando negativamente na fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos, podendo afetar o crescimento celular reduzindo assim a atividade enzimática das leveduras fermentadoras. As leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis* são utilizadas para a hidrólise ácida diluída e

destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, visando estabelecer condições adequadas ao processo de bioconversão da fração para a produção de diversos bioprodutos (WINKELHAUSEN, 1998).

O etanol caracteriza-se por ser um composto orgânico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), obtido por meio da fermentação de amido e outros açúcares, como a sacarose existente na cana-de-açúcar, nos açúcares da uva e cevada e também mediante processos sintéticos. É um líquido incolor, volátil, inflamável, solúvel em água, com cheiro e sabor característicos (ALVES *et al.*, 1998). A produção de etanol é realizada a partir da fermentação de mono ou dissacarídeos assimiláveis por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que fermentam glicose, manose e frutose bem como os dissacarídeos sacarose e maltose. Esta é a espécie de levedura mais usada nas destilarias. A eficiência de fermentação hoje chega até 18% de concentração de etanol nos processos industriais (FENGEL & WEGENER, 1989).

O etanol de segunda geração está mobilizando um número crescente de pesquisadores para o desenvolvimento de pesquisas voltadas para ampliar a produtividade do etanol de cana brasileiro. O alvo é aproveitar o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, fontes de celulose, como matéria-prima para a produção de bioetanol (ARRUDA & FELIPE, 2009).

A utilização de tecnologias que utilizam os materiais celulolíticos como matéria-prima (resíduos agroflorestais, madeira de florestas plantadas, resíduo urbano) apresenta como vantagens o baixo custo, fato de poderem ser produzidos nas mais variadas condições de solo e clima, impacto positivo na conservação do ambiente, além de diminuir a dependência dos combustíveis fósseis (LYND *et al.*, 2005).

2 Revisão de literatura

2.1 Produção de álcool no Brasil

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol derivado da cana-de-açúcar e o único país do mundo onde se integra totalmente a produção de açúcar e etanol na mesma planta, reduzindo os custos de produção de ambos os processos. Na safra de 2009/2010 foram produzidos 624.991 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e 168,8 milhões de toneladas de bagaço (CONAB, 2011), sendo que para cada tonelada de cana, obtêm-se aproximadamente 140 kg de bagaço seco, composto por 43% de celulose, 25% de hemicelulose e 23% de lignina (RODRIGUES, 2007).

O processo da transformação dos resíduos em bioetanol consiste na transformação da celulose presente na biomassa em açúcares usados na fermentação alcoólica, por meio da ação de enzimas. O interesse brasileiro pelo etanol de celulose busca tornar ainda mais competitivo o etanol de cana, ampliando sua produção sem precisar aumentar na mesma proporção a área plantada de cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar gera uma grande quantidade de fibras na forma de bagaço e palha e estudos apontam que uma destilaria que produz hoje 1 milhão de litros de etanol por dia a partir do caldo da cana poderia, a partir com a tecnologia de hidrólise, gerar um adicional de 150 mil litros de etanol do bagaço. Em 2025, com a técnica aperfeiçoada, a mesma produção poderia ter um acréscimo de 400 mil litros provenientes do bagaço recuperado. A palha da cana é outra fonte potencial para a produção de etanol, e pode ser utilizada como fonte de celulose (KNAUF & MONIRUZZAMAN, 2004).

Os processos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos, podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto (FERRAZ *et al.*, 1994). No Brasil, usa-se como pré-tratamento a explosão a vapor, já conhecida e aplicada pelas usinas que utilizam o bagaço para fazer ração para gado, processo não tão eficiente quanto o de oxidação. O país escolheu o processo de explosão a vapor para pré-tratamento porque ele é dominado pelas usinas, o que em tese facilitaria a adoção mais imediata da tecnologia. Uma técnica para produzir etanol do bagaço e da palha da cana-de-açúcar, poderá aumentar a produtividade das usinas em cerca de 37%.

A tecnologia do processo de produção do etanol de segunda geração visa utilizar o excesso de bagaço para aumentar a produção de álcool e, o mais importante, sem a necessidade de se expandir a área plantada de cana-de-açúcar. O descarte do bagaço da cana-de-açúcar representa um desperdício de

30% da energia que a cana-de-açúcar pode gerar, sendo utilizado para produzir energia. A metodologia do aproveitamento do bagaço da cana-de-açúcar na produção do etanol vai permitir que as usinas de açúcar e álcool produzam o etanol também durante a entressafra, entre os meses de Novembro e Abril (CAMARGO, 2007).

2.2 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço e a palha são subprodutos gerados por usinas e destilarias constituídos por celulose, hemicelulose e pela lignina, um material estrutural da planta, associado à parede celular vegetal, responsável pela rigidez, impermeabilidade e resistência à ataques aos tecidos vegetais. O bagaço de cana-de-açúcar, para a maior parte dos países tropicais, é um dos principais materiais lignocelulósicos que pode ser utilizado para a bioconversão em etanol, uma vez que apresenta alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo relativo de lignina, baixo custo de transporte e de armazenagem (PANDEY & SOCCOL, 2000).

3 Etanol

O etanol é um dos produtos químicos orgânicos mais antigos e produzidos no mundo, sendo que atualmente a maior produção ocorre em escala industrial (RATNAM *et al.*, 2005). Além de ser uma fonte de energia renovável, apresenta outras vantagens, como a redução da dependência do petróleo advinda do uso de combustíveis fósseis e redução das alterações climáticas causadas pela poluição (DEMIRBAS, 2005). Os métodos de produção de etanol podem ser divididos em dois grandes grupos: os que utilizam vias sintéticas, tais como a hidratação do etileno, hidratação direta (reação do gás rico em etileno com água) e produção a partir de acetileno, e os que se fundamentam em vias biotecnológicas responsáveis por cerca de 90% do etanol produzido mundialmente (ZALDIVAR *et al.*, 2001).

3.1 Fermentação etanólica

A fermentação etanólica é um fenômeno bioquímico muito complexo que provoca a transformação do açúcar em etanol, gás carbônico, ácido succínico, ácidos voláteis e ésteres (LEHNINGER *et al.*, 2000). Segundo Lehninger (2000), uma molécula de açúcar metabolizada pelo

micro-organismo por meio do processo de fermentação, produz duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato) contra 38 moléculas no processo da respiração.

O etanol produzido durante a fermentação é dependente da quantidade de açúcares presentes no meio. Em organismos metabolizadores de sacarose, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o processo se inicia por meio da atuação da exoenzima invertase, a qual, por meio da hidrólise, transforma a sacarose presente na cana em glicose e frutose (monossacarídeos estruturais). Esses monossacarídeos são transportados para o interior da célula da levedura, que em condições de anaerobiose realiza a fermentação e em condições de aerobiose utiliza estas fontes de carbono no processo de respiração aeróbica (AMORIM *et al.*, 1996).

Ao trabalhar em condições adequadas de fermentação, 5% do açúcar metabolizado pela levedura é desviado para rotas metabólicas alternativas, ou seja, para gerar produtos secundários, enquanto que 95% resultam em etanol. No entanto, nas indústrias pode se verificar que de 8 a 15% do açúcar geram produtos secundários, devido a diversos fatores que afetam o processo (AMORIM & LEÃO, 2005).

3.2 Conversão de biomassa a etanol

Resíduos como aparas de madeira, bagaço de cana ou sabugo de milho são formados por celulose e podem transformar-se em bioetanol quando submetidos à reações de hidrólise, um processo químico de quebra de moléculas. Uma grande vantagem dessa abordagem seria reduzir a competição entre biocombustíveis e alimentos, produzindo, no caso do aproveitamento do bagaço, mais etanol por área plantada. Outra vantagem é o barateamento da produção do etanol (CAMARGO, 2007).

A biomassa vegetal (bagaço de cana e madeira em decomposição) apresenta um grande potencial para produção de álcool combustível. Entretanto, a maioria dos açúcares presentes geralmente encontra-se na forma de polímeros estruturais ou reservas de carbono que precisam ser hidrolisadas até unidades oligossacarídicas menores ou os monossacarídeos constituintes para poderem ser fermentados. Além disso, a produção de etanol a partir de outras fontes de carbono originadas de hidrolisados de plantas, como D-xilose e L-arabinose, por exemplo, requer mudanças nas vias metabólicas de *Saccharomyces cerevisiae*, uma vez que estes açúcares não são prontamente fermentados pelas linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas nas destilarias de álcool (Van MARIS *et al.*, 2006).

Utilizando-se o bagaço e a palha como matéria-prima, e tecnologias apropriadas de conversão, a produção de etanol poderá aumentar entre 50 e 100% por hectare de cana plantada. Assim, o Brasil

poderia produzir de 200 a 300 bilhões de litros de etanol por ano, de forma sustentável e mais barato do que qualquer outra fonte energética (CAMARGO, 2005). Os benefícios da tecnologia de transformação da biomassa em etanol estão relacionados à segurança do suprimento energético, redução em emissões de gás que causam o efeito estufa, uso de recursos renováveis, fundação de indústrias de processos químicos, benefícios macroeconômicos para comunidades rurais e a sociedade como um todo (KNAUF & MONIRUZZAMAN, 2004). Apesar de todas essas vantagens, a comercialização e a aplicação difundida da utilização da biomassa lignocelulósica ocorre lentamente (CARRASCO, 1992).

Os materiais lignocelulósicos apresentam grande potencial para produção do etanol por meio de hidrólise química ou enzimática seguida por fermentação, com a vantagem de estarem disponíveis em todo o território nacional durante o ano todo. Diversas espécies de levedura têm a capacidade de gerar álcool etílico a partir de fontes de carbono. Para a qualidade e eficiência do processo são importantes que, durante a fermentação, sejam usadas linhagens únicas e com grande capacidade fermentativa (VÁSQUEZ, 2007).

Existem várias maneiras de converter o material celulósico a etanol. Uma delas é a conversão direta (DMC - *Direct Microbial Conversion*) onde todos os estágios da produção são interconectados pela síntese de celulase, a hidrólise enzimática e a fermentação. Este método se baseia na utilização de culturas de micro-organismos que metabolizam celulose a etanol (SZCZODRAK & FIEDUREK, 1996). A sacarificação e fermentação simultâneas (SSF- *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) é um processo que combina a hidrólise enzimática e fermentação em um só reator, evitando a inibição da celulase pela glicose resultante da hidrólise. Entretanto, este processo não evita a inibição causada pela celobiose, já que as leveduras industriais que fermentam glicose não conseguem fermentar celobiose. Apesar destas vantagens, a SSF tem alguns pontos negativos, entre eles as diferentes temperaturas ótimas para hidrólise (45-50°C) e fermentação (28-35°C) e a inibição dos micro-organismos fermentativos e da celulase pelo etanol e por substâncias tóxicas vindas do pré-tratamento do material lignocelulósico (SZCZODRAK & FIEDUREK, 1996). Neste caso, o uso de pré-tratamento biológico poderia melhorar o rendimento, já que minimiza a presença de substâncias tóxicas (KELLER *et al.*, 2003). A abordagem que tem mostrado maior flexibilidade para controle das condições operacionais é a sacarificação seguida de fermentação, na qual os processos de hidrólise e fermentação ocorrem separadamente. No entanto, como os produtos da hidrólise enzimática inibem as enzimas, há limitação da taxa de sacarificação, levando a baixos rendimentos em etanol (SZCZODRAK & FIEDUREK, 1996).

Embora a taxa de hidrólise e a composição dos açúcares resultantes dependam do método de pré-tratamento/hidrólise e das circunstâncias empregadas, os constituintes principais dos hidrolisados são a glicose e xilose liberados da celulose e hemicelulose, respectivamente. A glicose obtida da hidrólise da celulose pode facilmente ser fermentada por micro-organismos tais como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como é feito atualmente. Entretanto, na hidrólise da fração hemicelulósica são geradas pentoses, açúcares dificilmente fermentados. Consequentemente, as tecnologias de fermentação que utilizam as pentoses necessitam ser bem desenvolvidas para alcançar a eficiência total do processo da conversão (LEE, 1997). Micro-organismos fermentadores que metabolizam as pentoses vêm sendo isolados e modificados geneticamente, mas o rendimento em etanol ainda não é suficiente para tornar o processo economicamente atrativo (KURTZMAN, 2006).

4 Produção de etanol de primeira geração

Apesar da produção de etanol a partir da sacarose presente na cana-de-açúcar ser um processo bem estabelecido atualmente, com os menores custos e maior produtividade do mundo, ainda há espaço para crescimento e redução de custos. A produção do etanol de cana-de-açúcar demanda menos de 1% das terras cultiváveis do país, podendo facilmente ser expandida sem representar competição com a produção de alimentos (UNICA, 2011).

Existem ainda diversas possibilidades de investimento em pesquisa, desenvolvimento e inovação que visem o aperfeiçoamento do processo de produção de etanol a partir do caldo da cana, elevando-se o rendimento e reduzindo-se os custos. São exemplos de possíveis estudos de otimização da produção de etanol de primeira geração: 1) aplicação de melhores práticas agrônômicas; 2) desenvolvimento de melhores variedades para novas áreas e de cultivares mais produtivas e resistentes; 3) seleção de linhagens e melhoria das características de micro-organismos que garantam alta eficiência fermentativa; 4) maior eficiência de conversão e resistência ao álcool (PACHECO, 2010).

Segundo Andrietta e colaboradores (2008), o emprego dessa nova tecnologia representará uma economia entre R\$ 0,02 e R\$ 0,03 por litro de etanol produzido, o que é muito significativo para as usinas. A eliminação dos estágios de centrifugação e reciclo representa uma economia de 16% nos custos de processamento e de 10% para os custos de instalação. A utilização de leveduras floculantes em reatores de leito fixo, operando nas condições otimizadas, fornece uma produtividade de aproximadamente 15 g_{etanol}/L.h, enquanto uma fermentação contínua convencional, usual de um

processo industrial, em que se utilizam separadoras centrífugas, reatores de mistura e células de leveduras não floculantes, geralmente opera com produtividade de aproximadamente 8 g_{etanol}/L.h quando o melaço é utilizado como matéria-prima.

5 Produção de etanol de segunda geração

Tanto para a produção de etanol de primeira geração, a partir de cana-de-açúcar, quanto de segunda geração, a partir de biomassa de composição lignocelulósica, a via fermentativa é a via mais importante para a obtenção destas fontes de energia. Um dos fatores que torna a produção de etanol por fermentação a forma mais econômica para sua obtenção, é o grande número de matérias-primas naturais e residuais existentes em todo país (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

O micro-organismo que mais se emprega na fermentação alcoólica é a levedura *S. cerevisiae*, devido à sua capacidade de assimilar facilmente a glicose da cana ou da celulose de biomassas residuais (SANCHEZ & CARDONA, 2008). Dentre as bactérias, a mais promissora é a *Zymomonas mobilis*, que tem elevada eficiência energética resultando em um elevado rendimento de etanol (maior que 90%). Uma das desvantagens do uso desta bactéria na fermentação do caldo de cana e de outros meios com sacarose é a formação de polissacarídeos, que aumentam a viscosidade do meio de fermentação, e de sorbitol, um produto da redução da frutose que diminui a eficiência da conversão de sacarose a etanol (LEE & HUANG, 2000).

A fermentação alcoólica inicia-se com a glicólise, também chamada de via Embden-Meyerhof, na qual ocorre a oxidação da glicose em dois ácidos pirúvicos em duas etapas, podendo ocorrer na presença de oxigênio ou não. Na primeira etapa, duas moléculas de ATP são utilizadas enquanto uma molécula de glicose é fosforilada, reestruturada e quebrada em dois compostos de três carbonos: gliceraldeído 3-fosfato (GP) e diidroxiacetona fosfato (DHAP), que é imediatamente convertida em GP. Na segunda etapa, as duas moléculas de GP são oxidadas, em várias etapas, em duas moléculas de ácido pirúvico. Nessas reações, duas moléculas de NAD^+ são reduzidas a NADH e quatro moléculas de ATP são formadas pela fosforilação em nível de substrato, com saldo final positivo de duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose que é oxidada. Após a glicólise, as duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e duas moléculas de CO_2 . As moléculas de

acetaldeído são então reduzidas utilizando-se duas moléculas de NADH para formar duas moléculas de etanol, o produto final da fermentação (TORTORA *et al.*, 2005).

Juntamente com o etanol e o CO₂, o metabolismo anaeróbico leva também à formação e excreção de glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético e pirúvico), álcoois superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol e outros componentes em menor quantidade. Estima-se que 5% do açúcar metabolizado pela levedura sejam desviados para gerar tais produtos secundários da fermentação, resultando em um rendimento de 95% em etanol. Entretanto, em condições industriais, nas quais fatores químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos e inibidores), físicos (temperatura, pressão osmótica) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração do micro-organismo, contaminação bacteriana) afetam a levedura, rendimentos de 90% normalmente são obtidos (GUTIERREZ *et al.*, 1991).

5.1 Estratégias para a produção de etanol de segunda geração

Com o intuito de aproveitar ambas as frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose) das biomassas residuais de composição lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração, algumas estratégias são empregadas. A Hidrólise e Fermentação em Separado (*Separated Hydrolysis and Fermentation* – SHF) - é a concepção na qual a hidrólise da celulose, após o pré-tratamento da biomassa para a hidrólise e solubilização da hemicelulose, ocorre em um estágio separado da fermentação, bem como a produção de celulasas que são utilizadas na hidrólise da celulose. Neste tipo de estratégia os açúcares provenientes da hemicelulose após o pré-tratamento podem ser convertidos a etanol em um fermentador separado, sendo o sólido remanescente, denominado celulignina, encaminhado para a hidrólise da celulose (PEREIRA JR. *et al.*, 2008). A principal vantagem dessa estratégia é permitir que a hidrólise e a fermentação possam ser conduzidas nas condições ótimas. Geralmente, a temperatura ótima para as celulasas está entre 45°C e 50°C, dependendo do micro-organismo produtor. E a temperatura ótima para a maior parte dos micro-organismos produtores de etanol está entre 30°C e 37°C (OLSSON *et al.*, 2006). Por outro lado, a principal desvantagem é a inibição do complexo celulolítico pelos açúcares liberados na hidrólise, principalmente celobiose e glicose que se acumulam no meio, conferindo uma hidrólise incompleta da celulose e rendimentos não muito elevados (WINGREN *et al.*, 2005). Segundo Taherzadeh e Karimi (2007), outra desvantagem do SHF é a possibilidade de contaminação. Como o tempo envolvido na etapa de hidrólise é muito longo, a solução de glicídios torna-se uma fonte disponível para os micro-organismos indesejados. Além disso,

as próprias enzimas podem constituir uma fonte potencial de contaminação. Em escala industrial, seria muito difícil esterilizar as celulasas, já que isso deveria ser feito por filtração, pois a autoclavação inativaria as enzimas.

A Sacarificação e Co-fermentação Simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Cofermentation* – SSCF) - outro modo de operação, no qual a co-fermentação se refere à fermentação de ambos os açúcares, pentoses e hexoses, que ocorre no mesmo reator, juntamente com a sacarificação da celulose. A hidrólise da hemicelulose e a produção de celulasas ocorrem separadamente (TEIXEIRA *et al.*, 2000). No reator do SSF, somente as hexoses são convertidas a etanol e as pentoses são fermentadas em outro reator, por um organismo diferente. Já no processo de SSCF, tanto as hexoses quanto as pentoses são fermentadas por um único micro-organismo em um mesmo reator (HAMELINCK *et al.*, 2005). Para isso, é necessária a aplicação da engenharia genética para desenvolver um micro-organismo que fermente ambos os açúcares (LAWFORD & ROUSSEAU, 1998).

No processo denominado Bioprocesso Consolidado (*Consolidated Bioprocess* – CBP) - tanto a produção de enzimas quanto a de etanol, produzido a partir dos açúcares da hemicelulose e celulose, são conduzidas em um único reator e realizado pelo mesmo micro-organismo (TAHERZADEH & KARIMI, 2007). Duas estratégias podem ser seguidas para a obtenção de organismos para o Bioprocesso Consolidado. A primeira estratégia envolve a modificação de micro-organismos naturalmente produtores de etanol, a fim de torná-los produtores eficientes também de celulasas e/ou xilanases, se a hidrólise da hemicelulose também for enzimática. A segunda estratégia segue o caminho oposto, ou seja, modificar excelentes produtores de celulasas com a finalidade de transformá-los também em eficientes produtores de etanol (LYND *et al.*, 2005). De acordo com Lynd (2002), todavia, não existem organismos ou consórcios de micro-organismos capazes de produzir celulasas nos níveis desejados e também produzir etanol com elevada produtividade e elevadas concentrações, embora vários organismos já combinem ambas as funções.

Fujita e colaboradores (2004) desenvolveram uma linhagem de *S. cerevisiae* em cuja superfície celular foram expressos três tipos de enzimas celulolíticas, obtendo um rendimento de $0,45 \text{ gg}^{-1}$ (gramas de etanol por grama de carboidrato consumido), o que corresponde a 88,5% do rendimento teórico. Outro trabalho similar a este foi publicado por Den Haan e colaboradores (2007), demonstrando a possibilidade de se desenvolver linhagens de leveduras capazes de crescer e de converter celulose em etanol em uma única etapa. O CBP parece ser uma abordagem alternativa com visível potencial e o ponto final na evolução da produção de etanol de segunda geração a partir de materiais lignocelulósicos.

A aplicação do CBP não vincula custos de operação ou investimento de capital para a compra de enzimas ou sua produção, apresentando assim vantagens em relação ao custo de produção do etanol (LYND *et al.*, 2005).

Independentemente da rota tecnológica, é importante notar a relevância que o custo da biomassa tem sobre o custo final do etanol. Em geral, nas estimativas realizadas para os países do hemisfério norte, o custo da biomassa representa cerca de 40% do custo do etanol, e grande parte das reduções do custo do bioetanol para o futuro se baseia na redução do custo da biomassa. Evidentemente, isso cria grandes expectativas quando se considera algumas regiões do planeta, para as quais existem opções de biomassa com custos bem mais baixos, como por exemplo, a cana-de-açúcar no Brasil, ou de resíduos agroflorestais, como os da indústria de celulose (BNDES, 2008).

6 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta de celulose (40-55%), hemicelulose (25-50%) e lignina (10-40%), além de outros componentes em menor quantidade. As hemiceluloses são encontradas no bagaço da cana-de-açúcar na proporção de 25 a 27% e quando sofrem hidrólise ácida podem ser despolimerizadas em xilose, arabinose, ácido urônico e furfural (PATURAU, 1989). As hemiceluloses ou polioses estão intimamente associadas à celulose e são compostas por diferentes unidades de açúcares formando cadeias ramificadas (FENGEL & WEGENER, 1989). Estas diferentes unidades de açúcares são compostas por glicose, manose e galactose (hexoses) além da xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses (CANETTI, 2004). O principal açúcar encontrado nas hemiceluloses do bagaço é a xilose. As concentrações, após hidrólise, para xilose, glicose e arabinose podem equivaler a, respectivamente, 20g/L, 4g/L e 1g/L (MORAES, 2008).

Para que a biomassa possa ser utilizada como matéria-prima para processos químicos e biológicos, ela precisa ser submetida a um pré-tratamento capaz de desorganizar o recalcitrante complexo lignocelulósico. A lignina é um grande obstáculo nesse processo e sua degradação libera substâncias que inibem a fermentação. A lignina é a segunda macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos, representando 20 a 30% da massa total. É uma substância incorporada durante o crescimento vegetal, sendo composta basicamente de unidades fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa. (DEN HAAN *et al.*, 2007).

6.1 Celulose

A celulose (23% - 50% da matéria seca da biomassa lignocelulósica) é um polímero linear que contém até 15.000 unidades de β -D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 carbono-carbono e por ligações de hidrogênio intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes) (ARANTES & SADDLER, 2010). As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas que se associam formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam desde regiões com elevado grau de cristalinidade, nas quais as cadeias de glicana estão firmemente ligadas em paralelo, até regiões com menor grau de ordenação, chamadas de regiões amorfas. Na região cristalina, as fibras têm maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação (absorção de solvente) que na região amorfa, na qual a fibra possui sua maior flexibilidade (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000).

O índice de cristalinidade e o grau de polimerização são propriedades importantes para a classificação dos polímeros celulósicos. O grau de polimerização informa a frequência relativa de ligações glicosídicas internas e terminais, disponíveis para atuação de celulasas. Pode ser definido com base no número médio de monômeros e no peso médio do polímero, assim como inferido a partir de sua viscosidade. Já o índice de cristalinidade está associado à reatividade do substrato e pode ser quantificado pelo método de difração de raios X (D'ALMEIDA, 1988). Estas características, juntamente com o envoltório de lignina, conferem à celulose uma grande resistência à hidrólise, o que representa um desafio para a utilização dos materiais lignocelulósicos em aplicações biotecnológicas, como a produção de etanol de segunda geração (ARANTES & SADDLER, 2010).

6.2 Hemicelulose

A fração hemicelulósica (15% - 45% do material lignocelulósico seco) consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose. Esta macromolécula contém ainda ácidos hexurônicos, como os ácidos β -D-glucurônico, D-4-O-metilglucurônico e β -D-galacturânico, e deoxi-hexoses. A variedade de ligações e de ramificações, assim como a presença de diferentes unidades

monoméricas, contribui para a complexidade da estrutura hemicelulósica e suas diferentes conformações (KOOTSTRA *et al.*, 2009).

Diferentemente da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molecular (100-200 unidades glicosídicas) e não contém regiões cristalinas, sendo, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas. Porém, a fermentação dos açúcares de cinco carbonos (pentoses) ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a fermentação de hexoses, como a glicose (SUN & CHENG, 2005).

6.3 Lignina

A estrutura bioquímica da fração lignina (10% - 30%) não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo utilizada, portanto, para a produção de etanol por rotas fermentativas. Essa fração, no entanto, desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose. A estrutura da lignina apresenta forma tridimensional e é formada por unidades de *p*-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Esta macromolécula é formada pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

A lignina representa o maior depósito de estruturas químicas aromáticas, constituindo-se em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química. Apesar de ser possível produzir diversos produtos com base na lignina, atualmente o foco dos estudos tem sido voltado para o uso desse material como fonte de energia, o que garantiria a autossuficiência e, eventualmente, até a possibilidade de exportar alguma energia elétrica excedente (D' ALMEIDA, 1988).

7 Pré-tratamentos

A conversão da maioria dos materiais lignocelulósicos a álcool a partir da celulose requer pré-tratamento antes da hidrólise deste polissacarídeo ser realizada. O objetivo do pré-tratamento é remover a hemicelulose e a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade dos materiais. Além disso, deve evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de bioprodutos que possam inibir os micro-organismos fermentadores. Existem diversos tipos de pré-tratamentos, com diferentes

rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e consequente impacto nas etapas subsequentes. Dentre os vários métodos de pré-tratamento, os mais comumente utilizados são pirólise, explosão a vapor, explosão da fibra com amônia, explosão de CO_2 , ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa e solventes orgânicos (organosolv) (SUN & CHENG, 2005).

Para McMillan e colaboradores (1999), os pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos para produção de álcool, que podem ser métodos físicos, físico-químicos e biológicos, devem seguir os seguintes requerimentos: 1) promover a formação de açúcares ou dar condições para sua formação por hidrólise enzimática após o pré-tratamento; 2) evitar a degradação ou perda do teor de carboidratos; 3) evitar a formação de bioprodutos inibidores do processo de hidrólise enzimática e fermentação; 4) ser economicamente viável.

8 Hidrólise enzimática da biomassa vegetal

As celulasas são enzimas envolvidas na hidrólise enzimática de biomassas de origem vegetal, que desempenham uma função de grande importância biotecnológica. Trata-se da hidrólise da biomassa vegetal presente em resíduos lignocelulósicos da agricultura, com a finalidade de se obter xaropes de açúcares fermentescíveis (TEIXEIRA *et al.*, 2000). Os três maiores grupos de celulasas que estão envolvidas no processo de hidrólise são: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidase (SUN & CHENG, 2002).

As endoglucanases agem de forma aleatória, clivando ligações beta dentro da molécula da celulose, as celobiohidrolases (exoglucanases) removem as unidades de celobiose a partir das extremidades redutoras da cadeia da celulose e a β -glicosidase quebra a celobiose em duas unidades de glicose (LIMA *et al.*, 2005).

De acordo com Sun e Cheng (2002), a conversão de compostos lignocelulósicos a etanol é dividida em dois principais processos, a hidrólise da celulose para produzir açúcares simples e a fermentação destes por via microbiológica. A hidrólise é usualmente catalisada pelas enzimas celulasas, e a fermentação realizada por leveduras e bactérias. Os fatores que afetam a hidrólise da celulose incluem a porosidade (área de superfície acessível) do material lignocelulósico, cristalinidade da fibra de celulose, e o conteúdo de hemicelulose. O conteúdo de hemicelulose e lignina dificulta o acesso da celulase à celulose, diminuindo a eficiência da hidrólise, efeito tal que pode ser minimizado pela

remoção destes componentes, pela redução da cristalinidade e pelo aumento da porosidade em processos de pré-tratamentos do material do qual se quer obter etanol (McMILLAN *et al.*, 1999).

8.1 Obtenção de açúcares a partir da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

A obtenção de açúcares a partir de materiais celulósicos pode ocorrer por meio dos processos de hidrólise ácida e enzimática. Ambos os processos precisam de um pré-tratamento para remoção da lignina e, em alguns casos, separação da hemicelulose. (MACEDO & NOGUEIRA, 2005).

Segundo Rodrigues (2007), a hidrólise ácida é eficiente, com até 90% de recuperação de açúcares fermentescíveis, podendo gerar alguns produtos inibidores da fermentação (compostos fenólicos, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural), assim como a degradação dos açúcares. A hidrólise enzimática, de acordo com Bastos (2007), é um processo que apresenta especificidade da reação, ausência de reações secundárias, ausência de formação de produtos secundários (inibidores da fermentação alcoólica) e reação em condições que não requerem altas pressões e temperaturas, ou ambientes corrosivos para os equipamentos. Entretanto, segundo Canetti (2004), a cristalinidade da celulose, a proteção da lignina e as configurações espaciais do complexo celulose-hemicelulose-lignina tornam esse tipo de hidrólise um processo lento, pouco econômico e menos eficiente.

Durante a hidrólise são gerados dois tipos de açúcares, as pentoses e as hexoses. As pentoses são provenientes da hidrólise da fração hemicelulose, e as hexoses são geradas na degradação de parte das hemiceluloses e celulose. O xarope obtido após a hidrólise da celulose é usado para a fermentação etanólica, utilizando-se a levedura *S. cerevisiae* que converte hexoses em etanol (RABELO, 2007). De acordo com Chandel e colaboradores (2007), *Scheffersomyces stipitis*, *Scheffersomyces shehatae*, *Pachysolen tannophilus* e *Spathaspora passalidarum* são os micro-organismos capazes de fermentar não só as hexoses (açúcares compostos por seis carbonos), mas também as pentoses (açúcares compostos por cinco carbonos).

8.2 Compostos inibidores da fermentação

No bagaço há várias substâncias químicas como terpenos/terpenóides, gorduras/ceras, vários tipos de compostos fenólicos, assim como proteínas e cinzas, os quais podem ser extraídos usando solventes polares e apolares. Estes componentes variam em cada espécie de material lignocelulósico,

representando aproximadamente 5-20%. A presença desses compostos pode levar à uma inibição do processo fermentativo, uma vez que esses podem ser tóxicos às leveduras (FENGEL & WEGENER, 1989).

Devido às condições empregadas nos pré-tratamentos térmicos e químicos é originada uma série de compostos que podem atuar como inibidores potenciais tanto da hidrólise enzimática, quanto da fermentação. Os tipos de compostos tóxicos e suas concentrações em hidrolisados lignocelulósicos dependem tanto da matéria-prima, quanto das condições operacionais empregadas no pré-tratamento. Os produtos de degradação, que são potenciais inibidores da fermentação se agrupam em três categorias: derivados furânicos (furfural e 5-hidroximetilfurfural - HMF), ácidos orgânicos fracos (como ácido acético) e derivados fenólicos (PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL, 2000).

Segundo Chandel e colaboradores (2007) ao analisar os custos do processo de hidrólise, devem ser levados em consideração os compostos que inibem o crescimento dos micro-organismos, formados pela hidrólise do material em questão. Durante o processo de hidrólise ácida, pode ocorrer a formação de alguns subprodutos que interferem negativamente no processo de fermentação, tais como ácido acético, que é formado pela hidrólise do grupo acetil presente na hemicelulose. Ácidos fórmicos e levulínicos, produtos da degradação de açúcares, compostos fenólicos formados principalmente pela degradação parcial da lignina e furaldeídos ou aldeídos furanos, principalmente furfural e 5-hidroximetilfurfural, são formados pela degradação de pentoses e hexoses, respectivamente (MARTÍN *et al.*, 2007).

De acordo com Martin e Jonsson (2003), a maioria das leveduras, inclusive as linhagens industriais é suscetível a vários compostos inibidores derivados da hidrólise ácida e especialmente suscetível à presença de múltiplos inibidores.

Conforme Narendranath e colaboradores (2001), a presença de ácidos orgânicos no meio fermentativo resulta 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. Os compostos fenólicos podem inibir a bioconversão, inibindo a atividade enzimática, destruindo a integridade da membrana e afetando as suas propriedades, como a barreira seletiva (HEIPIEPER *et al.*, 1994). Os furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) são compostos que afetam os micro-organismos, pois reduzem suas atividades enzimáticas e biológicas, desintegram o DNA e inibem a síntese de RNA e proteínas (MODING *et al.*, 2002).

Chandel e colaboradores (2007) ao realizar a hidrólise do bagaço a 140°C por 30 min com diferentes concentrações do ácido clorídrico (0,5; 1,5; 2,5 e 3,5%), verificaram que na concentração de

2,5% foi quantificada a maior produção de açúcares totais (30,2g/L), xilose (21,5g/L), arabinose (2,9g/L), e glicose (5,8g/L). No entanto, foi com esta concentração de ácido que ocorreu a maior produção de compostos inibidores da fermentação como furanos (1,8g/L), compostos fenólicos (2,7g/L) e ácido acético (5,4g/L).

9 Leveduras metabolizadoras de xilose

Para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, o micro-organismo ideal deve ser capaz de metabolizar pentoses e hexoses (CHENG *et al.*, 2008). A levedura *S. cerevisiae*, mais utilizada na fermentação alcoólica, é capaz de fermentar apenas hexoses em etanol. Sua inabilidade em fermentar xilose pode ser contornada por meio de artifícios tais como o uso de xilose isomerase exógena (WALKER, 1998).

Segundo Hahn-Hagerdal e colaboradores (1994), o conhecimento a respeito de espécies que fermentam pentoses ainda é limitado. Dentre as principais espécies que fermentam xilose, pode-se citar *Pachysolen tannophilus*, *Scheffersomyces stipitis* e *Scheffersomyces shehatae*. Segundo Chandel e colaboradores (2007), *Kluyveromyces marxianus*, segundo Margaritis e Bajpai (1982) *Candida guilliermondii*, segundo Felipe (1995) *Candida tenuis*, *Brettanomyces naardenensis* e *Scheffersomyces segobiensis*. De acordo com Walker (1998), existem alguns desafios na fermentação industrial de pentoses a etanol, tais como a baixa tolerância ao etanol por leveduras fermentadoras de pentose. Também, a presença de glicose nos hidrolisados hemicelulósicos pode atuar como repressora dos genes responsáveis pela utilização da xilose.

Leveduras do clado *Spathaspora* são encontradas no norte do Brasil. Estas espécies encontram-se descritas como *Spathaspora brasiliensis*, *Spathaspora suhii*, *Spathaspora roraimanensis*, *Spathaspora xylofermentans* e *Spathaspora arborariae*. Todas estas espécies são capazes de fermentar D-xilose durante o crescimento aeróbico, embora com diferentes eficiências (CADETE *et al.*, 2013).

9.1 Metabolismo de xilose em leveduras

A utilização de xilose por leveduras é possível graças à capacidade que alguns destes micro-organismos apresentam de metabolizar esta pentose (McMILAN, 1993). A xilose passa por duas reações de oxi-redução: na primeira, é convertida a xilitol e em seguida a xilulose na segunda reação, a qual

sofre uma fosforilação à xilulose 5-fosfato. A conversão da xilose a xilitol é feita pela enzima xilose redutase (XR), que é a primeira enzima desta via metabólica, sendo esta reação dependente da coenzima NADH ou NADPH (JEFFRIES, 1983). O xilitol formado pode então ser excretado ao meio ou ser oxidado à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase, com a participação de NAD^+ como coenzima (SLININGER *et al.*, 1987).

A xilulose produzida é fosforilada pela enzima xilulose quinase, formando xilulose 5-fosfato, que é metabolizada na via das fosfopentoses (WEEB & LEE, 1990). Os metabólitos resultantes da via das fosfopentoses, frutose-6P e gliceraldeído-3P, são metabolizados na glicólise (via Embden Meyerhof Parnas – EMP) sendo levados à piruvato, o qual pode ser oxidado pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos, recuperando as coenzimas por meio da cadeia respiratória, ou ser fermentado a etanol, pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e etanol desidrogenase, sendo, neste processo, reoxidado o NADH resultante da oxidação de gliceraldeído-3P. O número reduzido de leveduras que conseguem converter xilose a etanol é devido ao elevado requerimento de oxigênio por estes micro-organismos para que isso ocorra, o que é inviável em um processo fermentativo industrial. (ALVES, 1994).

10 Desafios para a implementação da tecnologia do etanol de 2ª geração

Para a utilização de celulose, para a produção de etanol em larga escala, em um nível economicamente competitivo, importantes gargalos precisam ser sanados e esforços de pesquisa são necessários, para que se alcance: 1) desenvolvimento de tecnologias mais eficientes para a biomassa lignocelulósica no que diz respeito ao pré-tratamento, por exemplo, a aplicação de novos sistemas de engenharia de enzimas para a hidrólise da celulose; 2) desenvolvimento e produção de micro-organismos capazes de metabolizar os açúcares pentoses e hexoses, de forma simultânea, de maneira que resistam ao estresse imposto pelo processo de inibidores; 3) encontrar e possibilitar que micro-organismos geneticamente modificados se mantenham estáveis, em operações de fermentação em escala comercial; 4) proporcionar condições de viabilidade econômica (MARGEOT *et al.*, 2009).

Os desafios atuais estão focados em promover a recuperação eficaz de açúcares, através da hidrólise de frações de celulose e hemicelulose da biomassa, assim como uma melhor fermentação do açúcar (MACEDO, 2005). Na tecnologia de produção do etanol de 2ª geração, que consiste no aproveitamento da biomassa lignocelulósica, ocorrem as seguintes etapas: pré-tratamento prévio da biomassa, hidrólise, fermentação de celulose e hexoses, a separação e tratamento de efluentes e,

dependendo da matéria-prima, recolhimento, que pode ter um custo adicional (OJEDA; KAFAROV, 2009). Dentre as etapas de produção citadas acima, o pré-tratamento é considerado o principal desafio dos pesquisadores. Segundo McMillan (1994), o pré-tratamento consiste em remover a lignina e hemicelulose, reduzindo a cristalinidade da celulose e aumentando a porosidade dos materiais que constitui a parede celular. O pré-tratamento deve alcançar aos seguintes requisitos: 1) proporcionar uma melhoria na formação de açúcares; 2) evitar a degradação ou perda de carboidratos; 3) evitar a formação de subprodutos que inibam a ação da hidrólise subsequente e a fermentação; 4) obter custo efetivo satisfatório. O conjunto de processos de ordem física, físico-químicas, químicas e processos biológicos têm sido utilizados para viabilizar o pré-tratamento de matérias lignocelulósicos. Vários grupos de pesquisa de instituições brasileiras estão empenhados em desenvolver métodos de pré-tratamento que são: organosol, auto-hidrólise, a explosão a vapor, a hidrólise ácida e a extração alcalina com peróxido de hidrogênio. A lavagem alcalina de bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, está possibilitando a extração da maior parte da lignina matriz, fazendo com que a celulose e hemiceluloses estejam mais disponíveis para hidrólise enzimática (PANDEY *et al.*, 2000).

Desde a estruturação do programa de etanol no Brasil, os estudos vêm sendo direcionado principalmente em técnicas de pré-tratamento. A explosão a vapor é considerada um dos métodos mais utilizados na quebra dos três principais componentes da biomassa (KLINKE, 2004). A explosão a vapor consiste em uma técnica a qual materiais lignocelulósicos são submetidos a vapor de alta pressão em um reator para que ocorra uma expansão adiabática (LEE, 1997).

Dessa forma, a hidrólise enzimática pode ser realizada em conjunto com os processos de sacarificação e fermentação de forma simultânea, podendo diminuir os custos de produção em virtude da eliminação de uma etapa no processo de obtenção do etanol. A partir do momento que a cana-de-açúcar com seus açúcares e fibras passarem a ser uma fonte de materiais de interesse, passível de serem utilizadas em uma ampla gama de produtos, em processos integrados e interdependentes, as usinas de açúcar e etanol decididamente irão se configurar, cada vez mais, no contexto das chamadas biorrefinarias, que mimetizam as atuais refinarias da indústria do petróleo, mas em novas bases e ambientalmente mais sustentáveis e renováveis (BNDES, 2008).

O futuro da produção de energia, a partir de biomassa, está baseado na produção de biocombustíveis de segunda geração, a partir da próxima década, quando o etanol será produzido de bagaço, celulose e outras matérias orgânicas, terão um incremento de produtividade aumentada de 40-

50%. Essa produção de segunda geração será sustentável, em harmonia com o meio ambiente e iniciará “uma civilização moderna de biomassa” (SACHS, 2005).

10.1 Estratégias de fermentação de novos genes para *S. cerevisiae*

A produção fermentativa de etanol a partir de substratos chamados de "primeira geração", como cana-de-açúcar, já atingiu níveis muito elevados de eficiência. As linhagens industriais utilizadas nestes processos já são adaptadas ao ambiente industrial e possuem características que dificultam o melhoramento por engenharia genética tradicional. Duas abordagens inovadoras foram utilizadas para buscar processos fermentativos mais eficientes: o uso de reatores bioelétricos para alterar os produtos da fermentação e um ensaio de engenharia evolutiva. As fermentações bioelétricas com *Saccharomyces cerevisiae*, obtêm aumentos de produtividade de etanol, sem alterar o rendimento final, e também mudanças nas proporções dos subprodutos glicerol e acetato. Uma resposta distinta foi observada para uma linhagem industrial cultivada nas mesmas condições, mas não foram observadas alterações na via fermentativa, havendo apenas variações grandes na expressão de genes relacionados a outros aspectos da fisiologia da levedura, como genes para síntese de lipídios de membrana e genes desconhecidos ou com funções aparentemente não relacionadas ao processo fermentativo. O método automatizado para ensaios de engenharia evolutiva, permitiu a seleção de linhagens a um crescimento em celobiose. A variabilidade presente no genoma de uma linhagem industrial diplóide, foi possível obter linhagens haplóides com desempenho superior à linhagem parental. Portanto, esta estratégia pode ser viável para se obter fenótipos superiores utilizando linhagens distantes de *S. cerevisiae* (TIZEI, 2013).

11 Conclusões

- O investimento em novas pesquisas buscando-se elevar o rendimento da conversão de bagaço em açúcares visando-se a produção de etanol deve ser realizado.
- Novos estudos devem ser conduzidos para alcançar esse objetivo, tais como o emprego de novas enzimas ou micro-organismos com maior eficiência na conversão de materiais lignocelulósicos a açúcares simples e etanol, respectivamente.
- A utilização de resíduos lignocelulósicos, principalmente os agroindustriais, deve ser a nova rota para obtenção de uma maior quantidade de etanol necessário para suprir a demanda internacional por esse biocombustível, visto que muitos países devem adotar o etanol como uma opção de substituição aos combustíveis fósseis, principalmente pelos problemas ambientais, incluindo o aquecimento global, causado pela queima dos derivados do petróleo e carvão.
- A biomassa residual derivada de materiais lignocelulósicos pode ser utilizada como fonte de matéria-prima para a obtenção de etanol, evitando a utilização de áreas agriculturáveis para produção do etanol de primeira geração.
- Considerando-se a abundância e disponibilidade do bagaço e da palha da cana-de-açúcar, é possível inferir que, uma vez consolidada a tecnologia de hidrólise, o Brasil consiga aumentar ainda mais a produtividade do etanol produzido no país.
- Finalmente, é conveniente observar que, mesmo que o bioetanol de segunda geração seja viável técnica e economicamente, será muito difícil a substituição total dos combustíveis fósseis de forma sustentável e com a preservação de um mínimo de biodiversidade.

12 Referências Bibliográficas

ALVES, D.M.G. *Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica*. 1994.

ALVES, L.A.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; SILVA, S.S.; PRATA, A.M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70-72, p.89-98, 1998.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.G. *Processos de produção de álcool – controle e monitoramento*. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996, 93p.

AMORIM, H.V.; LEÃO, R.M. *Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia*, 1ª. ed. Piracicaba: Fermentec Publicações Editora e Comercio de Livros Ltda., 2005.

ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. Study of flocculent yeast performance in tower reactors for bioethanol production in a continuous fermentation process with no cell recycling. *Bioresource Technology*, Essex, v. 99, p. 3002 – 3008, 2008.

ARANTES, V. SADDLER, J.N. *Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. Biotechnology for Biofuels*. v. 3, n. 4. Disponível em www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/4. Acesso em fevereiro de 2010.

ARRUDA P.V.; FELIPE M. G. A. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. *Current Microbiology*, v. 58, p.274-278, 2009.

BASTOS, V.D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. *Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial*, Rio de Janeiro, n. 25, p.5-38, 2007.

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro, p. 316, 2008.

CADETE, R.M.; SANTOS, R.O.; MELO, M.A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D.L.; STAMBUK, B.U.; GOMES, F.C.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil, 2013.

CAMARGO, P.D. Força verde: um novo campo para a indústria química. *Revista Brasileira de Engenharia Química*, p. 18-21, 2005.

CAMARGO, P.D. Força verde: um novo campo para a indústria química. *Revista Brasileira de Engenharia Química*, p. 18-21, 2007.

CANETTI, E.V. *Obtenção dos parâmetros e estudo cinético da hidrólise ácida dos resíduos florestais de eucalipto*. Guaratinguetá, p. 46, 2004.

CARRASCO, F. Thermo-mechano-chemical pretreatment of wood in a process development unit. *Wood Science and Technology*, v. 26, p. 413-428, 1992.

CHANDEL, A.K.; RAJEEV, K.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*, v. 98, n.10, p. 1947-1950, 2007.

CHENG, K.K.; CAI, B.Y.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; ZHOU, Y.J.; GE, J.P.; XU, J.M. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal*, v.38, p.105-109, 2008.

CONAB – *Compania Nacional de Abastecimento*. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 15.jun. 2011.

D'ALMEIDA, M.L.O. *Composição química dos materiais lignocelulósicos*. In: Celulose e Papel, Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica, Brasil, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT-, 2ª Edição, v. 1, Capítulo III, p. 45-106, 1988.

DEMIRBAS, A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, v. 27, n.4, p.327-337, 2005.

DEN HANN, R.; ROSE, S.H.; LYND, L.R.; VAN ZYL, W.H. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.*, n. 9, p. 87-94, 2007.

FELIPE, M.G.A., VIEIRA, D.C., VITOLO, M., SILVA, S.S., ROBERTO, I.C., MANCILHA, I.M. Effect of acetic acid on xylose cultivation by *Candida guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 35, n.3, p. 171–177, 1995.

FERRAZ, A.; MENDONÇA, R.; COTRIM, A.R.; SILVA, F.T. The use of white-rot decaying as a pretreatment for organosolv delignification of *Eucalyptus grandis* wood. Workshop on Applications of Biotechnology in Bioenergy Systems, *Anais*, 1994.

FENGEL, D., WEGENER, G. *Wood chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, p.61, 1989.

FUJITA, Y.; ITO, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 2, p. 1207-1212, 2004.

GUTIERREZ, L.E.; AMORIM, H.V.; BASSO, L.C. Inibidores da fermentação alcoólica. *STAB, Açúcar, álcool e subprodutos*. Piracicaba, v. 9, n. 6, p.24-30, 1991.

HAHN-HAGERDAL B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol – the fuel of tomorrow with the residues of today. *Trends Biotechnol.*, 24: 549-56, 2006.

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, p. 933-943, 1994.

HAMELINCK, C.N.; HOOIJDONK, G.V.; FAAIJ, A.P.C. *Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term*. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 384–410, 2005.

HEIPIEPER, H.J.; WEBER, F.J.; SIKKEMA, J.; KEWELO, H.; DE BONT, J.A.M. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology*, v. 12, p. 409-615, 1994.

JEFFRIES, T.W. Utilization of xilose by bacteria, yeast, and fungi. *Advances in Biochemical Engineering*, v. 27, p. 1-32, 1983.

KELLER, F.A., HAMLTON, J.E., NGUYEN, Q.A. Microbial pretreatment of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.105/108, p.27-41, 2003.

KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B.; AHRING, B.K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* n. 66, p. 10-26, 2004.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, K. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. *International Sugar Journal*, v. 106, n.1263, p. 147-150, 2004.

KOOTSTRA, A.M.J.; BEEFTINK, H.H.; SCOTT, E.L.; SANDERS, J.P.M. *Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 2, n. 31. Disponível em www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1. Acesso em janeiro de 2009.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. Yeast systematics and phylogeny – implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: ROSA, C.A; PÉTER, G. (orgs.). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, The Yeast Handbook*. Heidelberg: Springer-Verlag, p. 11-30, 2006.

LAWFORD, H.G. ROUSSEAU, J.D. *Improving fermentation performance of recombinant Zymomonas in acetic acid-containing media*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70-72, n. 1, p. 161-172, 1998.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, v.56, p.1-24, 1997.

LEE, W.G. HUANG, C.T. *Modeling of ethanol fermentation using Zymomonas mobilis ATTC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. Biochemical Engineering Journal*, v. 4, n. 3, p. 217-227, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 839 p. 2000.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V., Produção de etanol. In: Lima, U.A.; Aquarone, E.; Orzani, W.; Schmidell, W.(Ed.) *Biotecnologia Industrial*, São Paulo:Edgard Blücher LTDA, cap. 1, p. 11-20, 2005.

LYND, L.R. Tomorrow's biomass refineries. *Apresentado no "XXVII Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals"*, Golden Colorado, 2005. Disponível em: <<http://www.bioetanoldecana.org/>>. Acesso em: 4 mar. 2002.

LYND, L.R.; ZYL, W.H.V.; McBRIDE, J.E.; LASER, M. *Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update*. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16. n. 5, p. 577-583, 2005.

MACEDO, I.C., NOGUEIRA, L.A.H. *Cadernos do Núcleo de Assuntos Estratégicos. Seção 2: Avaliação da Expansão da Produção de Etanol no Brasil*, p.141, 2005.

MARGARITIS, A.; BAJPAI, P. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces fragilis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v.44, n.5, p.1039-1041, 1982.

MARGEOT, A. B. *et al.* New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, n. 3, p. 372-380, Jun. 2009.

MARTÍN,C.; ALMAZÁN, O.; MARCET, M.; JONSSON, L.J. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. *International Sugar Journal*, v. 109, p. 1267, 2007.

MARTÍN, C.; JONSSON, L.J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p.386–395, 2003.

McMILLAN, J.D.; HIMMEL, M.E.; BAKER,J. O.; OVEREND, R.P. *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*. Washington: American Chemical Society, DC, 1994. p.292 – 324, 1999.

McMILLAN, J.D. *Xylose fermentation to ethanol: a review*. NREL, Golden, CO, p. 53, 1993.

MODING, T., LIDEN, G.; TAHERZADEH, M.J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemistry Journal*,v.363, p.769–776, 2002.

MORAES, E. J. C. *Estudo de Viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada*. Lorena, p. 157, 2008. Dissertação (Mestrado) – Faculdade Salesiana.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of acetic acid ad lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p.71-177, 2001.

OJEDA, K.; KAFAROV, V. Energy analysis of enzymatic hydrolysis reactor for the processing of lignocellulosic biomass into bioethanol. *Chemical Engineering Journal*, v. 154, n.1-3, p. 390-395, Nov. 2009.

OLSSON, L.; SOERENDEN, H.R.; DAM, B.P.; CHRISTENSEN, H.; KROGH, K.M.; MEYER, A.S. *Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicellulose with*

recombinant xylose utilizing Saccharomyces cerevisiae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 129-132, p. 117-129, 2006.

PACHECO, T. F. Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

PALMQVIST,E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74, p.17-24, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. *Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse*. *Biosource Technology*, v. 74, p. 69-80, 2000.

PATURAU, J.M. *By-Products of Sugar Cane Industry*, 3rd Edition, Elsevier, Amsterdam, p.27-33, 1989.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. *Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery*. In *Series on Biotechnology*, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, p. 45, 2008.

RABELO, S. C. *Avaliação de Desempenho do Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino para a Hidrólise Enzimática de Bagaço de cana-de-açúcar*. Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

RATNAM, B.V.V.; RAO, S.S.; RAO, M. D.; RAO, M. N.; AYYANNA, C. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of ethanol from palmyra jaggery using response surface methodology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, p. 399- 404, 2005.

RODRIGUES, F.A. *Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana*. Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

SACHS, I. Da civilização do petróleo a uma nova civilização verde. *Estudos Avançados*, São Paulo, v.19, n.55, p.197-214, 2005.

SÁNCHEZ, O.J. & CARDONA, C.A. *Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks*. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SLININGER, P.J.; BOLEN, P. L.; KURTZMAN, C. P. *Pachysolen tannophilus*: properties and process consideration for ethanol production from D-xylose. *Enzyme and Microbial Technology*, v.9, p. 5-15, 1987.

SUN, Y. CHENG, J.J. *Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production*. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1599-1606, 2005.

SUN, Y.; CHENG, J.J; *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*, *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, v.10, n. 5/6, p.367-375, 1996.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. *Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review*. *Bioresources*, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

TEIXEIRA, L.C.; LINDEN, J.C.; SCHROEDER, H.A. *Simultaneous Saccharification and Cofermentation of peracetic acid-pretreated biomass*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, n. 1-9, p. 111-127, 2000.

TIZEI, P.A.G.; *Avaliação de novas estratégias para fermentação de etanol por Saccharomyces cerevisiae : análise de expressão gênica durante estímulo bioelétrico e seleção de linhagens por ensaios em larga escala*. Campinas, 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 8 ed. Ed. Artmed, Porto Alegre, p. 894, 2005.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Brasil poderá quase dobrar exportações de etanol para o Japão. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticias/show.asp>? Acesso em: 29 mar. 2011.

VAN MARIS, A.J.A.; ABBOTT, D.A.; BELLISSIMI, E.; Van DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, A.H.; WISSELINK, H.W.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Alcholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, n. 90, p. 391-418, 2006.

VÁSQUEZ, M.P.; DA SILVA, J. N. C.; DE SOUZA Jr., M.B.; PEREIRA Jr., N. *Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by Simultaneous Saccharification and Fermentation*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137-140, issues 12. 2007.

WALKER, G.M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. England: John Wiley, p.157-158 e p.350,1998.

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

WINGREN, A.; GALBE, M.; ROSLANDER, C.; RUDOLF, A.; ZACCHI, G. *Effect of reduction in yeast and enzyme concentrations in a SSF based bioethanol process*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, p. 485-499, 2005.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.56, p. 17-34, 2001.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *Journal of Fermentation and Biotechnology*, v.86, n.1, p. 1-14, 1998.