

BRENO BARCELLOS CAMPOS

**PRODUÇÃO DE ETANOL EM BIOMASSA DE CAPIM-ELEFANTE POR
Kluyveromyces marxianus CCT 7735**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C198p
2015

Campos, Breno Barcellos, 1987-

Produção de etanol em biomassa de capim-elefante por
Kluyveromyces marxianus CCCT 7735 / Breno Barcellos
Campos. – Viçosa, MG, 2015.
x, 34f : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wendel Batista da Silveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.29-34.

1. Biocombustíveis. 2. Etanol. 3. Capim-elefante. 4.
Kluyveromyces marxianus. 5. Processo SSF. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

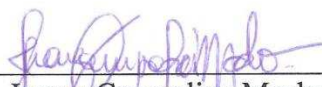
CDD 22. ed. 662.88

BRENO BARCELLOS CAMPOS

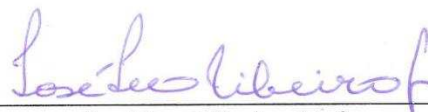
**PRODUÇÃO DE ETANOL EM BIOMASSA DE CAPIM-ELEFANTE POR
Kluyveromyces marxianus CCT 7735**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

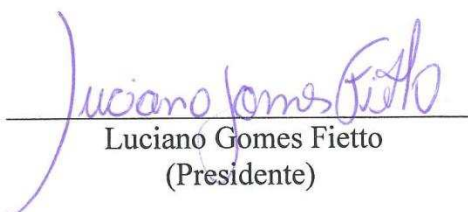
APROVADO: 27 de julho de 2015.



Juarez Campolina Machado



José Ivo Ribeiro Júnior
(Coorientador)



Luciano Gomes Fietto
(Presidente)

Ao Pai Celestial;
Aos meus pais Silvério Esteves e Elizabeth Barcellos;
Ao irmão, Silvano Barcellos;
Aos meus grandes amigos;

A eles, dedico!

“Quando duas pessoas trocam seus pães, cada uma volta com um pão. Quando trocam ideias, voltam com duas ideias”.

SIDDHARTHA GAUTAMA

AGRADECIMENTOS

Ao Pai eterno, que me guiou nesta jornada, deixando claro que não há coincidências.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade e apoio.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG, CNPq e EMBRAPA, pelo apoio à pesquisa.

Aos meus amados pais Silvério e Elizabeth, pelo amor e carinho concedidos em toda minha vida e pelo apoio e compreensão quanto aos meus planos e decisões.

Ao meu irmão Silvano, por ter cuidado da mãe durante esses dois anos.

Aos meus parentes, em especial às tias Olinda e Dorica e ao padrinho Vicente, que Deus os tenha.

Ao Professor Dr. Wendel Batista da Silveira, pela orientação, apoio e empolgação.

À Professora Dr^a. Flávia Maria Lopes Passos, pela orientação e por ter sido acolhedora.

Ao Professor Dr. José Ivo Ribeiro Jr., pela orientação e receptibilidade.

Ao Dr. Juarez Campolina, pelo apoio e interesse no projeto.

Aos amigos e colegas do LABFIS, pelas ideias compartilhadas, pela boa convivência e pelos deliciosos momentos de café com prosa.

Aos amigos que Viçosa me permitiu cultivar.

Às adoráveis amigas Cleriane e Laiane, pela sintonia, apoio, parceria, risos, choros, vinhos e por fazerem os dois anos em Viçosa passarem como um piscar de olhos.

Ao amigo André, por ter compartilhado e apoiado grande parte dessa jornada.

Aos amigos de república, Breno e Carlos, pela ótima convivência e votos de sucesso.

Aos amigos capixabas, que sempre se dispunham a me encontrar em minhas rápidas estadias na cidade.

Ao Leandro Araújo, pelos sorrisos e incentivo na reta final.

BIOGRAFIA

Breno Barcellos Campos, nascido em Vitória/ES, em maio de 1987. Licenciado e bacharel em Química, 2010, pela Faculdade Espírito Santense – FAESA. Ingressou em agosto de 2013 como discente de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, da Universidade Federal de Viçosa, com conclusão em 27 de julho de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Matéria-prima	10
3.1.1 Pré-tratamento	10
3.2 Micro-organismo.....	10
3.2.1 Manutenção da cultura	11
3.2.2 Avaliação do crescimento em meio de fermentação	11
3.2.3 Preparo do inóculo	11
3.3 Produção de etanol e produtividade volumétrica	12
3.4 Sacarificação e Fermentação Simultâneas.....	12
3.5 Análise do consumo de açúcares e produção de metabólitos.....	13
3.6 Delineamento experimental	13
3.6.1 Planejamento Fatorial.....	13
3.7 Repetição das condições propostas pelo modelo.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Caracterização da biomassa	17
4.2 Sacarificação e Fermentação Simultânea	17
4.3 Estabelecimento das condições ótimas de fermentação.....	22
4.3.1 Deslocamento	23
4.4 Repetição das condições propostas pelo modelo.....	27
5 CONCLUSÕES.....	28
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1:** Fluxograma temporal das etapas para produção de etanol a partir de capim-elefante submetido ao processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF). . 13
- Fig. 2.** Estimativa das concentrações de glicose nos tratamentos do delineamento Fatorial $2^5 + 1$ descrito na tabela 3, após 72 horas de pré-sacarificação (Tempo 0) e durante 120 horas de SSF de resíduo celulósico de capim-elefante por *K. marxianus* CCT 7735. 19
- Fig. 3.** Estimativas de produção de etanol por *K. marxianus* CCT 7735, a partir de resíduo celulósico de capim-elefante submetido a diferentes tratamentos de SSF, conforme delineamento Fatorial $2^5 + 1$ descrito na tabela 3..... 21
- Fig. 4.** Superfícies de resposta e contornos para a produção de etanol em função da temperatura e concentração de celulases para concentração de biomassa igual a 16% (A e B); Temperatura e concentração de biomassa para concentração de celulases igual a 22,5 FPU (C e D); concentração de celulases e concentração de biomassa para temperatura igual a 35 °C (E e F). 23
- Fig. 5.** Estimativas de produção de etanol (g/L) deslocando-se a concentração de celulases (- - -), e fixando a temperatura (35 °C) e a concentração de biomassa (16 %), e deslocando-se a temperatura e a concentração de biomassa (.....), com a concentração de celulase fixada (22,1 FPU). 26
- Fig. 6.** Estimativa da produção média de etanol (g/L) (—○—) e da concentração de glicose (g/L) (—●—) após 72 horas de pré-sacarificação (tempo 0) e durante 96 horas de SSF, realizada em frascos erlenmeyer com 16% de biomassa, 22,5 FPU, 50 rpm, valor de pH de 4,8 e 38 °C..... 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Produção de etanol pelos líderes de produção mundial, Estados Unidos da América (EUA) e Brasil, em bilhões de litros. (Fonte: RFA, 2015).....	4
Tabela 2 Níveis das variáveis independentes de acordo com o planejamento fatorial 2^5+1	14
Tabela 3 Tratamento do Delineamento Fatorial $2^5 +1$ conduzido para determinar variáveis significativas no processo de produção de etanol durante SSF de resíduo celulósico de capim-elefante por <i>K. marxianus</i> CCT 7735. Os fatores avaliados foram a Temperatura (Temp), o pH, a agitação (Ag), a concentração de celulases (CC) e a concentração de biomassa (CB)	14
Tabela 4 Composição do capim-elefante <i>in natura</i> e após pré-tratamento ácido diluído e alcalino, quanto aos teores de celulose, lignina e outros	17
Tabela 5 Deslocamento das concentrações de celulases (CC), sob temperatura (Temp) e concentração de biomassa (CB) fixadas	24
Tabela 6 Deslocamento da temperatura (Temp) e da concentração de biomassa (CB) sob concentração de celulase (CC) fixada.....	25

RESUMO

CAMPOS, Breno Barcellos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Produção de etanol em biomassa de capim-elefante por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735**. Orientador: Wendel Batista da Silveira. Coorientadores: José Ivo Ribeiro Júnior e Luciano Gomes Fietto.

O capim-elefante é uma gramínea de elevada produtividade, que apresenta grande potencial para ser utilizado como biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração. A levedura *Kluyveromyces marxianus* vem se destacando na produção de etanol celulósico em processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) por ser termotolerante, além de produzir outros metabólitos de interesse industrial. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer as condições ótimas de produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 por meio do processo SSF. O capim-elefante foi pré-tratado com ácido diluído e com solução alcalina e, em seguida, o resíduo celulósico obtido foi submetido a uma pré-sacarificação durante 72 horas, seguido por 120 horas de SSF. Foram avaliados o efeito de cinco variáveis: temperatura, pH, agitação, concentrações de enzimas e de resíduo celulósico de capim-elefante (biomassa) durante 120 horas de SSF. Os resultados mostraram que a levedura termotolerante *K. marxianus* CCT 7735 produziu etanol nos tratamentos realizados a 45 °C, temperatura próxima à ótima para a atividade das enzimas celulolíticas. A concentração de biomassa, temperatura e concentração do complexo enzimático tiveram efeito significativo (p valor $< 0,05$) no processo. A maior concentração de etanol, 45,3 g/L foi obtida com base nas condições sugeridas pelo modelo estatístico proposto. Essas condições foram temperatura de 38 °C, 16% (p/v) de resíduo celulósico de capim-elefante, 22,5 FPU do complexo enzimático Celluclast[®] 1.5L/g de resíduo celulósico, agitação de 50 rpm e valor de pH de 4,8.

ABSTRACT

CAMPOS, Breno Barcellos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Ethanol production in biomass of elephant grass by *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735**. Adviser: Wendel Batista da Silveira. Co-advisers: José Ivo Ribeiro Júnior and Luciano Gomes Fietto.

The elephant grass is a grass high productivity that has great potential to be used as lignocellulosic biomass for second generation ethanol. The yeast *Kluyveromyces marxianus* has been outstanding in the production of cellulosic ethanol in simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) to be thermotolerant, as well as producing other metabolites of industrial interest. In this context, the aim of this study was to establish the optimal conditions of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 through the SSF process. The elephant grass was pretreated with dilute acid and alkaline solution, then, the obtained cellulosic residue was subjected to a pre-saccharification for 72 hours, followed by 120 hours of SSF. We evaluated the effect of five variables: temperature, pH, agitation, concentrations of enzymes and cellulosic residue of elephant grass (biomass) for 120 hours of SSF. The results showed that the thermotolerant yeast *K. marxianus* CCT 7735 produced ethanol in the treatments performed at 45 °C, the optimum temperature for the activity of cellulolytic enzymes. The biomass concentration, temperature and concentration of enzyme complex had a significant effect (p -value < 0.05) in the process. The highest concentration of ethanol, 45.3 g/L was obtained based on the conditions suggested by the statistical model proposed. These conditions were temperature 38 °C, 16% (w/v) cellulose residue elephant grass, 22.5 FPU enzyme complex Celluclast[®] 1.5L/g cellulose residue, agitation of 50 rpm, and pH of 4.8.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a utilização do petróleo como principal matéria-prima para produção de combustíveis é motivo de preocupação, pois, além de suas reservas estarem sendo exauridas rapidamente, a combustão dos combustíveis gerados a partir desta matéria-prima libera gases que promovem o efeito estufa na atmosfera. Logo, é necessário diversificar as matrizes energéticas e alavancar a produção de combustíveis menos poluidores a partir de fontes renováveis como, por exemplo, os biocombustíveis.

O etanol é o biocombustível de maior destaque, sendo que no ano de 2014 os Estados Unidos e o Brasil foram responsáveis por mais de 80% da sua produção. No entanto, a produção deste biocombustível, que ocorre substancialmente a partir de matérias-primas que são fontes de alimento, não tem apresentado aumento significativo nos últimos anos. Assim, há a necessidade de se utilizar outras matérias-primas abundantes e que não competem com a agricultura alimentar para a produção de etanol, tais como as biomassas lignocelulósicas. O etanol produzido a partir dessas fontes é denominado etanol de segunda geração.

No Brasil há biorrefinarias que já atuam produzindo etanol de segunda geração comercial, misturando a glicose de biomassa lignocelulósica com a glicose da cana-de-açúcar. Também é de conhecimento a existência termoelétrica, que utiliza o capim-elefante como matéria-prima para a geração de bioenergia a partir de sua combustão.

O capim-elefante é uma matéria-prima lignocelulósica, que tem atraído o interesse de diversos setores, dentre eles, o de biocombustíveis. Gramínea de origem africana, o capim-elefante foi disseminado por todo o território brasileiro e em outros países de clima tropical por sua elevada produtividade e rápida colheita, que se dá em apenas seis meses de cultivo. Apesar de já haver biorrefinarias produzindo etanol de segunda geração, a escolha da matéria-prima adequada para cada região e ideal para o processo é primordial. Nesse contexto, o capim-elefante mostra potencial para ser utilizado como matéria-prima, levando em consideração uma produção em larga escala.

Além da escolha da matéria-prima lignocelulósica, um dos principais gargalos na produção é a etapa de sacarificação, na qual ocorre a liberação dos açúcares constituintes da celulose e hemicelulose para a etapa de fermentação. As enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas possuem atividade ótima à temperatura de 50 °C e têm a sua atividade inibida pelos produtos da reação de hidrólise da celulose e hemicelulose. Sendo assim, o processo de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) se mostra promissor, pois os

açúcares liberados já são consumidos pelas leveduras, aliviando o efeito inibitório que estes exercem sobre a atividade dessas enzimas.

Por ser uma levedura termotolerante e possuir a capacidade de fermentar glicose com bom rendimento de etanol, a *Kluyveromyces marxianus* tem sido estudada para a produção de etanol de segunda geração. A linhagem *K. marxianus* CCT 7735 demonstra potencial para ser utilizada na produção de etanol de biomassa lignocelulósica, visto que foi capaz de produzir etanol de bagaço de cana-de-açúcar pelo processo de SSF, com rendimento próximo aos obtidos por diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*; além de ser capaz de fermentar mesmo em temperaturas mais elevadas, exigidas para a atividade ótima das enzimas e para a redução de custos com destilação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O petróleo, gás natural e carvão são fontes não renováveis empregadas na produção de eletricidade e combustíveis. Tais fontes são amplamente utilizadas em todo o mundo, contribuindo substancialmente para a emissão de Gases do Efeito Estufa (GEE) e, conseqüentemente, para o aquecimento global e mudanças climáticas. Além disso, as reservas dessas fontes são finitas, sendo necessária a redução da dependência desses recursos, ou seja, a utilização de fontes alternativas que sejam renováveis, tais como: energia solar, eólica, hídrica, geotérmica e de biomassa vegetal (GUPTA & VERMA, 2015).

Os biocombustíveis são produzidos de diversas matérias-primas renováveis, sendo uma alternativa para diminuir o uso de combustíveis fósseis. Os biocombustíveis de maior destaque são o etanol, biodiesel, biogás, biometanol e biohidrogênio. Dentre esses, o etanol pode ser utilizado como substituto da gasolina. Também é comum a utilização desse biocombustível como aditivo, o que ocorre em países que determinam uma porcentagem obrigatória de etanol misturado à gasolina comercial (CHEN et al., 2007; GARCÍA-APARÍCIO et al., 2011; SANSONETTI et al., 2011; SILVA et al., 2012; GUPTA & VERMA, 2015).

A mistura do etanol com a gasolina é benéfica para a redução das emissões de GEE, diminuindo a emissão de CO₂, podendo reduzi-la em até 90% e entre 60 a 80% a de SO₂, em uma mistura de 95 % de etanol e 5 % de gasolina (GUPTA & VERMA, 2015). A produção de etanol é liderada pelos Estados Unidos da América (EUA) e pelo Brasil, mas nos últimos 5 anos não houve aumento significativo (Tabela 1), cuja produção foi de cerca de 70 bilhões de litros (RFA, 2015). Esses dois países utilizam o milho e a cana-de-açúcar, fontes de amido e sacarose, respectivamente, como matérias-primas para a produção de etanol, havendo assim uma competição da indústria de etanol com a indústria alimentícia, e limitando, portanto, o aumento da produção de etanol. A mesma área de cultivo necessária para a produção de alimentos é requerida para a produção desse biocombustível (BANERJEE et al., 2011; SILVA et al., 2012; HE et al., 2014; GUPTA & VERMA, 2015; RFA, 2015). Portanto, a utilização dessas culturas como matérias-primas para a produção de biocombustíveis é alvo de críticas no cenário internacional. Nesse contexto, o etanol de segunda geração, isto é, o etanol produzido a partir de biomassa lignocelulósica, é considerado promissor por proceder de uma fonte abundante e renovável, que não compete com a produção de alimentos, trazendo benefícios ao meio ambiente e à segurança energética e alimentar. Além disso, pode

contribuir positivamente na economia e no desenvolvimento rural (SATHITSUKSANOH et al., 2012; RFS, 2012; WEO, 2013; FONTOURA et al., 2015).

Tabela 1

Produção de etanol pelos líderes de produção mundial, Estados Unidos da América (EUA) e Brasil, em bilhões de litros.

País	2014	2013	2012	2011	2010
EUA	54,20	50,40	50,10	52,80	50,40
Brasil	23,35	23,76	21,15	21,10	26,22
Total	77,60	74,16	71,25	73,90	76,62

Fonte: RFA, 2015.

Atualmente, vários estudos vêm sendo realizados em diferentes países para se determinar que tipo de biomassa lignocelulósica se enquadra à realidade de cada região no mundo. Esses estudos consideram a disponibilidade da biomassa para a agricultura local e as condições climáticas e territoriais que favorecem cultivo de forma economicamente viável. Resíduos agrícolas como palhas, folhas e talos, gerados no cultivo do milho e trigo nos EUA, e do bagaço da cana-de-açúcar no Brasil e na China, são matérias-primas promissoras para a produção de etanol de segunda geração. É estimado que o Brasil possa expandir a produção de etanol em até 40% com a utilização de biomassa lignocelulósica como matéria-prima (CHEN et al., 2007; FONTOURA, et. al., 2015). Recentemente, foi inaugurada uma segunda biorrefinaria no Brasil com uma planta para produção de etanol celulósico com capacidade de produzir mais de 40 milhões de litros de etanol por ano, e com planos para ampliação para mais 7 unidades, já prevendo metas para redução nos custos de produção (BIOFUELSDIGEST, 2014; RAIZEN, 2014).

Além desses resíduos, o uso de culturas de biomassa lignocelulósica energéticas, tais como eucalipto (*Eucalyptus*), bambu, sorgo sacarino, “switchgrass” (*Panicum virgatum*), e capim-elefante, é promissor para produção de etanol. Uma vantagem da utilização dessas culturas como matéria-prima é a maior produção de etanol comparada à produção obtida de resíduos agrícolas. Algumas dessas culturas, como o sorgo sacarino e o capim-elefante, também se destacam em termos de produtividade e sustentabilidade por possuírem alta taxa

de fixação de carbono, poderem ser cultivadas em solos poluídos e exigirem menor aporte de nutrientes, diminuindo o custo do processo produtivo (GUPTA & VERMA, 2015).

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é uma das culturas de maior destaque no cenário atual. Também conhecido como Napier, é uma Poaceae (gramínea) perene nativa das savanas tropicais da África, que foi introduzido na maioria dos países tropicais e subtropicais para ser utilizado como capineira sob a forma de silagem, feno e pastagem para gado leiteiro (PASSOS et al., 1999). Conhecido por ter alta eficiência fotossintética, o capim-elefante pode atingir até três metros de altura em 180 dias, apresentando a maior produtividade de biomassa entre as plantas herbáceas. A sua produção pode chegar a até 45 toneladas de massa seca por hectare por ano, enquanto as culturas de cana-de-açúcar e milho produzem cerca de 21 e 13 toneladas, respectivamente (LIN et al., 2010; YANG et al., 2013; BASSO et al., 2014). Além disso, o capim-elefante não precisa de replantio após colheita, cresce nas condições encontradas no Brasil, isto é, em ambientes com temperatura entre 18 e 30 °C e de índice pluviométrico de 800 a 4 mil milímetros (BYRT et al., 2011; MORAES et al., 2013).

A elevada produção de biomassa não é o único parâmetro necessário para determinar a aplicabilidade em programas bioenergéticos, uma vez que a relação entre o total de energia contida no produto e o total de energia gasta no processo de produção de etanol devem ser avaliados. Em tal relação, denominada balanço energético, o aumento de unidades de energia renovável em função de cada unidade de energia fóssil contribui diretamente com a minimização das emissões de GEEs (BYRT et al., 2011; MORAES et al., 2013). Segundo Zanetti et al. (2010), o balanço energético do capim-elefante varia de 21-25, ou seja, 21-25 unidades de energia renovável produzida em função de uma unidade de energia fóssil consumida no processo. Esse balanço energético, que é superior ao do milho (1,4 – 2,3) e da cana-de-açúcar (8,1-21), demonstra o potencial do capim-elefante como matéria-prima para a produção de biometanol (SAMSON et al., 2005; BODDEY et al., 2008; SOMERVILLE et al., 2010). Outro fator que também deve ser levado em consideração é a composição química da biomassa, uma vez que os teores de celulose, hemicelulose e lignina influenciam diretamente no processo de produção de etanol (BASSO et al., 2014). O capim-elefante já vem sendo utilizado no Brasil por uma termoelétrica na geração de bioenergia, com uma área plantada de 4 mil hectares dessa gramínea (SYKUE, 2015). Segundo Fontoura et al. (2015), a conversão de uma usina de biomassa de capim-elefante em uma biorrefinaria agregaria valor ao projeto, tornando-o economicamente viável no Brasil. Além disso, esses autores afirmam que a

comercialização do etanol celulósico de capim-elefante, representará uma oportunidade viável e interessante para a diversificação da matriz energética sustentável.

O capim-elefante é constituído principalmente por celulose (38-46%), polissacarídeo formado por moléculas de glicose interligadas por ligações β -1,4-glicosídicas, unidas entre si por ligações de hidrogênio. Por hemicelulose (26-32%), polissacarídeo ramificado, formado principalmente por D-xilose com pequenas quantidades de L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose, ácido glucurônico e ácido manurônico. Outro constituinte do capim-elefante é a lignina (7-12%), unidade formada por moléculas de fenilpropano interligadas, e que age como uma liga, conferindo maior resistência para as fibras de celulose e hemicelulose. O capim-elefante possui elevada concentração de celulose e baixo teor de lignina, mas ainda se faz necessário desconstruir as complexas interações entre hemicelulose e celulose, bem como remover a barreira física formada pela lignina ao redor das fibras celulósicas para facilitar o acesso das enzimas celulolíticas ao substrato (PASSOS et al., 1999; OGEDA e PRETI, 2010; GARCÍA-APARÍCIO et al., 2011; BASSO et al., 2014).

Sendo assim, a biomassa é submetida a um processo de pré-tratamento, cujos objetivos são retirar a lignina, reduzir a cristalinidade da celulose, bem como solubilizar a hemicelulose, separando-a da celulose. Logo, a celulose é mais acessível às enzimas empregadas na hidrólise enzimática ou sacarificação (YANG et al., 2007; OGEDA e PRETI, 2010; SENTURK-OZER et al., 2011). O pré-tratamento do tipo físico reduz o tamanho das partículas para aumentar a área de superfície por meio de moagem, e/ou aumentando a digestibilidade da forma cristalina da celulose por radiação de alta frequência. Já o pré-tratamento químico, visa solubilizar a hemicelulose de gramíneas, uma vez que este processo promove a hidrólise da hemicelulose, liberando os açúcares monoméricos e oligoméricos solúveis da matriz da parede celular. Dentre os pré-tratamentos químicos, o que utiliza ácido sulfúrico diluído se destaca como o mais eficaz. No tocante à remoção de lignina, os pré-tratamentos que utilizam soluções com pH alcalino promovem eficientemente a deslignificação da biomassa vegetal ao quebrar as ligações éster entre a lignina e xilose, e a desprotonação dos grupos fenólicos, aumentando, assim, a porosidade da biomassa (CHEN et al., 2007; PÉREZ-BOADA et al., 2014; ORTIZ e OLIVEIRA, 2014). Os pré-tratamentos ácido e alcalino podem ser utilizados em uma mesma biomassa, dependendo do objetivo almejado, mas vale ressaltar que a composição da biomassa após o pré-tratamento varia de acordo com as condições do método empregado. Pequenos compostos como furfural, ácido acético e ácido tânico são produzidos durante o pré-tratamento. Visto que esses compostos

inibem o crescimento microbiano, eles costumam ser removidos (OGEDA e PRETI, 2010; SATHITSUKSANOH et al., 2012).

Os maiores obstáculos para a produção de etanol de segunda geração são os custos associados à sacarificação da celulose e hemicelulose e a conversão da xilose em etanol (WINGREN et al., 2003; SENTURK-OZER et al., 2011; SATHITSUKSANOH et al., 2012). O processo de sacarificação é realizado com o auxílio de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, promovendo a hidrólise desses polímeros. Os complexos enzimáticos celulolíticos são constituídos de endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases. A endoglucanase (endo-1,4- β -D-glucanase, EC 3.2.1.4) ataca as regiões de baixa cristalinidade da fibra de celulose, agindo aleatoriamente e gerando oligossacarídeos de diferentes comprimentos ao clivar a ligação β -1,4, da celulose. Em seguida, as exoglucanases, também conhecidas como celobiohidrolases (exo-1,4- β -D-glucanase, EC 3.2.1.91), catalisam a hidrólise sucessiva de resíduos da celulose nas extremidades redutoras e não-redutoras nas extremidades, liberando moléculas de celobiose, dímeros de glicose, como produto principal. Finalmente, a celobiose é então hidrolisada pelas β -glucosidases (1,4- β -D-glicosidase, EC 3.2.1.21), liberando monômeros de glicose. No entanto, os coquetéis enzimáticos comerciais são deficientes em β -glucosidases, sendo comum o enriquecimento desses coquetéis com estas enzimas durante a sacarificação. Os complexos hemicelulósicos contêm pelo menos oito enzimas que catalisam a liberação de pentoses e hexoses. As condições ideais para atividade dessas enzimas são temperaturas que variam de 45 a 50 °C e pH entre 4 e 5. (KOVACS et al., 2009; DASHTBAN et al., 2010; GUPTA e VERMA, 2015).

Quando o processo de sacarificação ocorre antes da etapa de fermentação, é denominado sacarificação e fermentação separadas (SHF). O principal inconveniente desse processo é a inibição das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pelos produtos da hidrólise. Embora os rendimentos possam ser melhorados adicionando-se grandes quantidades de enzimas, o custo do processo se torna inviável. Além disso, há um limite máximo para a adição de enzimas, uma vez que não ocorre aumento significativo na quantidade de glicose liberada. Uma alternativa ao processo SHF é o processo denominado de sacarificação e fermentação simultânea (SSF), no qual as etapas de sacarificação e fermentação ocorrem simultaneamente no mesmo reator, evitando assim o acúmulo dos produtos de hidrólise liberados durante a sacarificação. Contudo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada na produção de etanol de primeira geração, não é termotolerante e tem a fermentação fortemente inibida em temperaturas acima de 42 °C - temperatura que favorece a

atividade das enzimas celulolíticas (DOWE e MCWILLAN, 2001; SELIG et al., 2008; ODEGA et al., 2010; LAN et al., 2012; GUPTA e VERMA, 2015).

Nesse sentido, a produção de etanol em um processo SSF pode ser melhorada com o uso de leveduras termotolerantes, que são capazes de fermentar em temperaturas empregadas na etapa de sacarificação. Além disso, a condução do processo em temperaturas mais elevadas leva à redução de custos com o resfriamento dos biorreatores e reduz os riscos de contaminação. A levedura *Kluyveromyces marxianus* vem se destacando na produção de etanol de segunda geração por ser uma levedura termotolerante, e com rendimento próximo aos obtidos por diferentes linhagens de *S. cerevisiae* (GROENEVELD et al., 2009; FAGA et al., 2010; SOUZA et al., 2012; LE et al., 2013; GUPTA e VERMA, 2015). Além do etanol, essa levedura produz outros metabólitos de interesse, tais como cetonas e ésteres, destacando-se o acetato de etila, um solvente amplamente empregado em indústrias (FONSECA et al., 2008). A *K. marxianus* é capaz de assimilar açúcares que não são utilizados por *S. cerevisiae*, como, por exemplo, xilose e arabinose, constituintes da hemicelulose. Essa característica é desejável, uma vez que o melhor aproveitamento da matéria-prima está relacionado à utilização de todos os açúcares (FAGA et al., 2010; HUGHES et al., 2013; CHEON et al., 2014; GUPTA e VERMA, 2015). A linhagem de *K. marxianus* CCT 7735, anteriormente chamada *K. marxianus* UFV-3, foi selecionada em função do seu potencial para converter a lactose do soro de queijo em etanol (SILVEIRA et al., 2005). Recentemente, as condições ótimas de produção de etanol por essa levedura em permeado de soro de queijo foram estabelecidas (DINIZ et al., 2014). Além disso, esta levedura mostra potencial para produzir etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar, isto é, etanol de segunda geração (SOUZA et al., 2012; COSTA et al., 2014;

Para a produção de etanol a partir de soluções diluídas de glicose ser considerada economicamente viável quanto aos custos do processo de destilação, é necessário produzir pelo menos 4 % (p/v) de etanol (ZACCHI e AXELSSON, 1989). Estudos mostram que o aumento da concentração de biomassa resulta em maior liberação de glicose e produção de etanol. Porém, assim como acontece com a carga enzimática, há um nível de saturação (TOMÁS-PEJÓ et al., 2009).

Diante das variáveis inerentes ao processo SSF, o uso de ferramentas matemáticas e estatísticas em estudos que visam obter conhecimento prévio de uma relação entre as variáveis e a resposta é fundamental para se encontrar as condições ótimas de produção de etanol. Com essas ferramentas, avaliam-se quais variáveis possuem efeito significativo sobre

o processo, bem como se determina a faixa em que há efeito, encontrando, assim, as condições ótimas para a resposta desejada, diminuindo o número de experimentos necessários (MYERS e MONTGOMERY, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima

Foi utilizado como matéria-prima o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), cultivar BRS Capiaçú, produzido no campo experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, MG, Brasil (21°33'18''S, 43°15'51''W, a 417m de altitude), em dezembro de 2012, em sulcos de 0,20 m de profundidade e com adubação de plantio realizada de acordo com a análise de solo e recomendações para a cultura de capim-elefante. Esse capim-elefante foi colhido com 365 dias após plantio na EMBRAPA Gado de Leite (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil). O material foi secado, moído e separado, de acordo com sua granulometria, em peneira de metal de 70 MESH. Foram separadas partículas menores que 0,210 mm. O teor de umidade foi determinado por análise gravimétrica após secagem a 105 °C até peso constante. Essa determinação foi realizada em triplicata (GOSPODAREK e NADGÓRSKA-SOCHA, 2010). A biomassa foi caracterizada pelo Laboratório de Análises de Alimentos LAA da EMBRAPA Gado de Leite, quanto aos teores (% de peso seco) de celulose lignina e outros, pelo método descrito por Goering e Van Soest (1970), e adaptado por Ankom (2006) e Silva (2006), respectivamente.

3.1.1 Pré-tratamento

10 % (p/v) de capim-elefante foi submetido ao pré-tratamento com ácido sulfúrico (H₂SO₄) diluído na concentração de 0,5% (v/v), a 121 °C por 30 minutos em autoclave. Após o pré-tratamento, as frações líquidas e sólidas foram separadas por filtração; em seguida, a fração sólida foi lavada com água destilada e seca em estufa a 53 °C até peso constante. Depois de seca, 5,7% (p/v) da biomassa foi submetida ao segundo pré-tratamento, com hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de 1,5% (p/v), a 100 °C por 2 horas. A biomassa pré-tratada foi lavada, secada em estufa e caracterizada.

3.2 Micro-organismo

Foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735, previamente

denominada *K. marxianus* UFV-3, pertencente ao acervo do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (SILVEIRA et al., 2005).

3.2.1 Manutenção da cultura

A Levedura *K. marxianus* CCT 7735, mantida a 4 °C em placa com meio de cultura YPD (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L e glicose 20 g/L), foi ativada em frasco erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio YPD. O frasco foi incubado em incubador rotatório modelo 25D, New Brunswick Scientific, a 37 °C por 12 horas, com agitação de 180 rotações por minuto (rpm). Após esse período, 1,0 mL dessa cultura foi inoculado em 50 mL meio de YPD nas condições descritas anteriormente, porém por um período de 12 horas. Após esse período, a levedura foi mantida em YPD ágar 2% (p/v) a 4 °C.

3.2.2 Avaliação do crescimento em meio de fermentação

A cultura estocada a 4 °C foi inoculada em frasco erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio de fermentação composto por tampão citrato 5 mM, pH 4,8; extrato de levedura (2,5 g/L); peptona (2,5 g/L); NH₄Cl (2,0 g/L); KH₂PO₄ (1,0 g/L); MgSO₄.7H₂O (0,3 g/L), acrescido de 5% (p/v) de glicose (SOUZA et al., 2012). Esse frasco foi incubado a 37 °C por 12 horas a 180 rpm. Uma alíquota dessa cultura foi inoculada em 50 mL de meio de fermentação acrescido de glicose 10% (p/v) para iniciar o cultivo com uma densidade ótica (D.O.)_{600nm} de 0,2. O crescimento foi acompanhado em intervalos de uma hora em Espectrofotômetro multiskan GO, Thermo Scientific. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.3 Preparo do inóculo

O meio de fermentação com 5% (p/v) de glicose foi utilizado para preparo do inóculo de *K. marxianus* CCT 7735. As células, previamente crescidas em meio YPD, foram inoculadas no meio de fermentação para uma D.O._{600nm} inicial de, aproximadamente, 0,2, e incubadas por 8 horas a 37 °C. As células foram recuperadas por centrifugação a 3000 g por 5 minutos, a 4 °C. O *pellet* de células foi ressuscitado em 30 mL de água peptonada 0,01 g/L,

e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 5 mL de meio de fermentação sem glicose, pH 4,8. Os meios de fermentação contendo a biomassa pré-tratada e pré-sacarificada a 50 °C por 72 horas foram inoculados com alíquotas do pré-inóculo para uma D.O._{600nm} de, aproximadamente, 2,0.

3.3 Produção de etanol e produtividade volumétrica

A produção de etanol foi determinada em gramas de etanol por litro de solução e a produtividade volumétrica de etanol (Q_p etanol) foi calculada pela equação 1, que relaciona o valor máximo de produção de etanol (g/L) nas amostras em função do tempo de fermentação (h).

$$Q_p = \frac{(P_f - P_i)}{h} \quad (1)$$

3.4 Sacarificação e Fermentação Simultâneas

Em um frasco erlenmeyer de 125 mL foram adicionados o meio de fermentação, a biomassa, e o complexo enzimático Celluclast[®] 1.5 L, e 60 Unidades de Papel de Filtro (FPU)/mL para um volume total de 50 mL (LAN et al., 2012). Os frascos foram incubados em incubador rotatório modelo 25D, New Brunswick Scientific, com temperatura de 50 °C e agitação de acordo com delineamento experimental, por 72 horas, período aqui chamado de pré-sacarificação (SOUZA et al., 2012). Após esse período, o gás nitrogênio (N₂) foi borbulhado por 15 minutos a fim de se obter uma condição de hipóxia (DINIZ et al., 2014). Posteriormente, uma alíquota do pré-inóculo foi transferida para esse meio para se obter uma D.O._{600nm} de aproximadamente 2,0 (Fig. 1). A temperatura de incubação foi ajustada como definido no delineamento experimental.

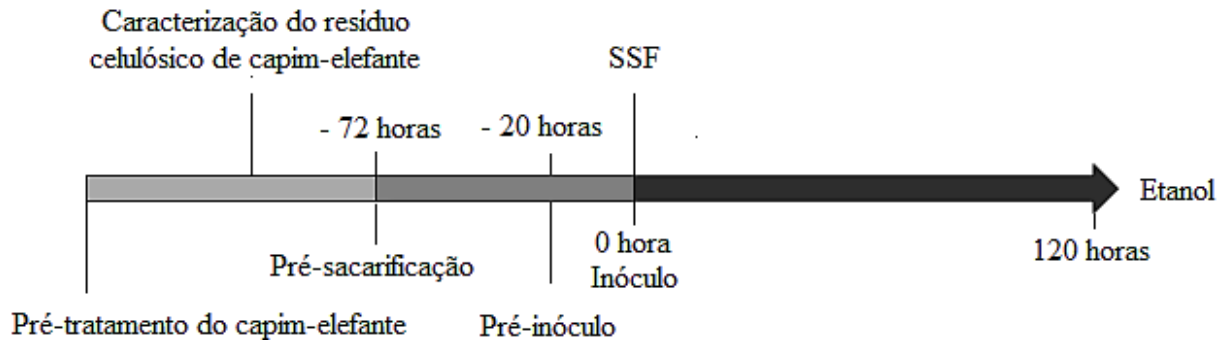


Figura 1: Fluxograma temporal das etapas de produção de etanol de capim-elefante por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 submetido ao processo de Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF).

3.5 Análise do consumo de açúcares e produção de metabólitos

Amostras de 2 mL foram coletadas nos tempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação, centrifugadas em microcentrífuga a 13000 g por 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados, filtrados por membrana de filtração com poros de 0,22 µm, e em seguida armazenados em vials de 1,5 mL. As concentrações de glicose, xilose, celobiose e etanol foram determinadas após 72 horas de sacarificação, e monitoradas durante 120 horas por HPLC, modelo LC-20AT da SHIMADZU com Detector de Índice de Refração RID-20A. Para a separação dos compostos, foi utilizada a coluna cromatográfica Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (PHENOMENEX), eluente H₂SO₄ 0,005 M, fluxo 0,6 mL por minuto e temperatura da coluna a 45 °C.

3.6 Delineamento experimental

3.6.1 Planejamento Fatorial

Em estudos realizados anteriormente (KANG et al., 2012; LAN et al., 2012; SOUZA et al., 2012; FERREIRA et al., 2015) foi determinado que o pH, a temperatura, a agitação, e as concentrações de enzima e de biomassa influenciam o processo de SSF. Foi aplicado o planejamento fatorial 2^5+1 para determinar o “efeito” das variáveis independentes listadas na Tabela 2 sobre a variável dependente, a produção de etanol. O experimento foi composto por 32 unidades experimentais e média de mais seis repetições no ponto central.

Tabela 2

Níveis das variáveis independentes de acordo com o planejamento fatorial 2^5+1 .

Variáveis Independentes	Símbolos	Níveis		
		-1	0	+1
Temperatura (°C)	Temp	35	40	45
pH	pH	4,5	5,15	5,8
Agitação (rpm)	Ag	50	100	150
Concentração de Celulase (FPU/g de biomassa)	CC	7,5	15,0	22,5
Concentração de Biomassa (%)	CB	8	12	16

Na Tabela 3 encontram-se os tratamentos gerados a partir do planejamento fatorial para se estimar o efeito das cinco variáveis testadas, temperatura da fermentação (Temp), pH do meio de cultura (pH), agitação dos frascos (Ag), concentração de biomassa (CB) e de celulases (CC) sobre a produção de etanol.

Tabela 3

Tratamento do Delineamento Fatorial $2^5 + 1$ conduzido para determinar variáveis significativas no processo de produção de etanol durante SSF de resíduo celulósico de capim-elefante por *K. marxianus* CCT 7735. Os fatores avaliados foram a Temperatura (Temp), o pH, a agitação (Ag), a concentração de celulases (CC) e a concentração de biomassa (CB).

Tratamento	Temp (°C)	pH	Ag (rpm)	CC (FPU)	CB (%)
1	35	4,5	50	7,5	8
2	35	5,8	50	7,5	8
3	45	4,5	50	7,5	8
4	45	5,8	50	7,5	8
5	35	4,5	150	7,5	8
6	35	5,8	150	7,5	8
7	45	4,5	150	7,5	8
8	45	5,8	150	7,5	8
9	35	4,5	50	22,5	8
10	35	5,8	50	22,5	8
11	45	4,5	50	22,5	8
12	45	5,8	50	22,5	8
13	35	4,5	150	22,5	8

14	35	5,8	150	22,5	8
15	45	4,5	150	22,5	8
16	45	5,8	150	22,5	8
17	35	4,5	50	7,5	16
18	35	5,8	50	7,5	16
19	45	4,5	50	7,5	16
20	45	5,8	50	7,5	16
21	35	4,5	150	7,5	16
22	35	5,8	150	7,5	16
23	45	4,5	150	7,5	16
24	45	5,8	150	7,5	16
25	35	4,5	50	22,5	16
26	35	5,8	50	22,5	16
27	45	4,5	50	22,5	16
28	45	5,8	50	22,5	16
29	35	4,5	150	22,5	16
30	35	5,8	150	22,5	16
31	45	4,5	150	22,5	16
32	45	5,8	150	22,5	16
33	40	5,15	100	15,0	12

A partir da metodologia de superfície de resposta (RSM), foi obtido um modelo estatístico de primeira ordem com interações duplas, considerado como o maior modelo proposto:

$$\gamma_i = \beta_0 + \beta_1 \text{Temp}_{c_i} + \beta_2 \text{pH}_{c_i} + \beta_3 \text{Ag}_{c_i} + \beta_4 \text{CC}_{c_i} + \beta_5 \text{CB}_{c_i} + \beta_6 \text{Temp}_{c_i} \cdot \text{pH}_{c_i} + \beta_7 \text{Temp}_{c_i} \cdot \text{Ag}_{c_i} + \beta_8 \text{Temp}_{c_i} \cdot \text{CC}_{c_i} + \beta_9 \text{Temp}_{c_i} \cdot \text{CB}_{c_i} + \beta_{10} \text{pH}_{c_i} \cdot \text{Ag}_{c_i} + \beta_{11} \text{pH}_{c_i} \cdot \text{CC}_{c_i} + \beta_{12} \text{pH}_{c_i} \cdot \text{CB}_{c_i} + \beta_{13} \text{Ag}_{c_i} \cdot \text{CC}_{c_i} + \beta_{14} \text{Ag}_{c_i} \cdot \text{CB}_{c_i} + \beta_{15} \text{CC}_{c_i} \cdot \text{CB}_{c_i} + \epsilon_i \quad (2)$$

γ_i representa o valor observado da variável de resposta, β_0 é o coeficiente de intercepção, e os termos β_1 a β_{15} são os coeficientes de regressão. As variáveis independentes e as de interação foram representadas pelos símbolos já descritos na Tabela 3, utilizando-se os níveis codificados (-1, 0 e 1). O erro é representado por ϵ_i . Esse modelo descreve a relação entre a produção de etanol e as variáveis independentes. A estimativa da melhor equação e significância de cada coeficiente foi determinada usando o teste t de Student ($d = 0,05$) e empregando o software Minitab[®]16. O grau de melhor ajuste da equação foi expresso quantitativamente pelo coeficiente de determinação R^2 . Após o conhecimento da relação entre as variáveis independentes e a resposta, foi realizado o deslocamento de acordo com a

importância significativa de cada variável independente, bem como a interação entre as variáveis, a fim de possibilitar a otimização sobre a produção de etanol (RIBEIRO JÚNIOR, 2012).

3.7 Repetição das condições propostas pelo modelo

A repetição das condições ideais propostas pelo modelo estatístico foi realizada em erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio de fermentação. O modelo foi validado de acordo com as recomendações propostas pelo modelo matemático obtido com base nos resultados do planejamento fatorial.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da biomassa

Após o pré-tratamento com ácido diluído e alcalino, a celulose prevaleceu como maior constituinte da biomassa pré-tratada, 76,28% (Tabela 4). Além disso, observou-se a redução de 71,41% na fração outros. Isso ocorreu em grande parte devido à remoção da hemicelulose pelo pré-tratamento ácido diluído. A fração de lignina por grama de celulose foi reduzida em 46,5% após o pré-tratamento, mostrando que o tratamento alcalino foi eficiente. A remoção de lignina ocorre melhor nos tratamentos com soluções alcalinas, e é desejável para a etapa de sacarificação, isto é, hidrólise enzimática da celulose, pois o acesso das enzimas celulolíticas ao substrato é facilitado. Assim, a liberação de glicose é mais eficiente, o que é primordial para aumentar a produção de etanol celulósico (KIM et al., 2013; GUPTA e VERMA, 2015).

Tabela 4

Composição do capim-elefante *in natura* e após pré-tratamento ácido diluído e alcalino, quanto aos teores de celulose, lignina e outros.

Biomassa	Celulose (%)	Lignina (%)	Lignina/g celulose (%)	Outros (%)
In natura	38,00	7,60	0,20	54,39
Pré-tratada	76,30	8,20	0,11	15,55

4.2 Sacarificação e Fermentação Simultânea

Inicialmente, o resíduo celulósico de capim-elefante foi pré-sacarificado por 72 horas, de modo que é possível observar na Figura 2 que a concentração de glicose após esse período (tempo zero hora) se difere dentre os tratamentos. Naqueles realizados com carga de 16% (p/v) de resíduo celulósico, a menor concentração de glicose foi de aproximadamente 29 g/L. Por outro lado, as concentrações mais baixas de glicose, cerca de 22 g/L, foram observadas nos tratamentos conduzidos com concentração de resíduo celulósico de capim-elefante mais baixa, isto é, 8% (p/v). Já as concentrações de glicose mais elevadas foram observadas nos tratamentos realizados com 16% desse resíduo (p/v). Dentre esses tratamentos, destacaram-se aqueles realizados com 22,5 FPU de celulasas, valor de pH de 4,5, com aproximadamente 65

g/L de glicose. É de conhecimento que quanto maior a carga de biomassa no processo de sacarificação, maior será a quantidade de celulose susceptível à hidrólise enzimática, o que está diretamente relacionado à concentração de glicose disponível, justificando os valores observados nos tratamentos (GARCÍA-APARÍCIO et al., 2011).

Após o período de pré-sacarificação, iniciou-se o processo de sacarificação e fermentação simultâneas (Figuras 2 e 3). No período de 24 horas, a concentração de glicose diminuiu em todos os ensaios, no entanto, nas horas seguintes houve um aumento da concentração de glicose nos tratamentos realizados a 45 °C, cuja temperatura se aproximou da temperatura ótima de atividade das celulasas, que varia entre 45 e 50 °C. O acúmulo de glicose pode estar relacionado com a diminuição da viabilidade da levedura, devido ao estresse pela temperatura, uma vez que a produção de etanol não aumentou (TOMÁS-PEJÓ et al., 2009; FAGA et al., 2010).

A presença de celobiose (dados não mostrados) foi observada somente na etapa de pré-sacarificação, possivelmente devido à inibição da enzima β -glicosidase pela glicose acumulada nesta etapa (GARCÍA-APARÍCIO et al., 2011). No entanto, com o início do consumo da glicose na etapa de sacarificação e fermentação simultâneas, a inibição dessa enzima foi aliviada, o que favoreceu a hidrólise da celobiose, uma vez que as concentrações de glicose mantiveram-se constantes, com valores próximos a zero, mesmo com o aumento das concentrações de etanol (Figura 3) (SANTOS et al., 2010; SOUZA et al., 2012; CASTRO e ROBERTO, 2014; GUPTA e VERMA, 2015).

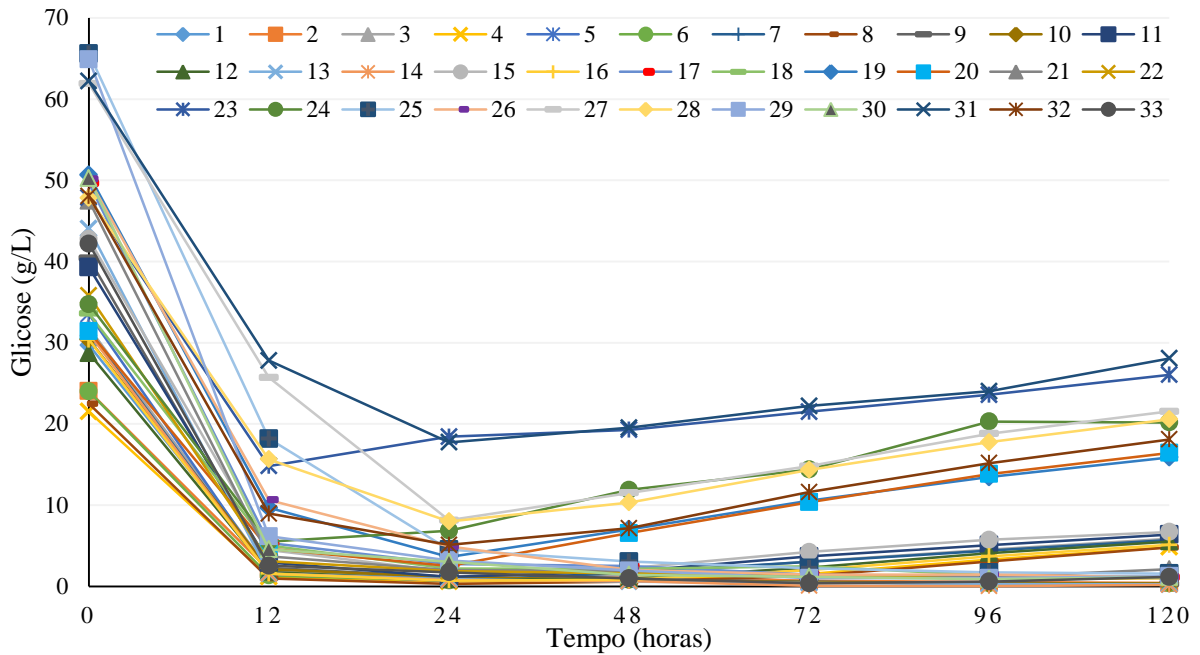


Figura 2: Estimativa das concentrações de glicose nos tratamentos do delineamento Fatorial $2^5 + 1$ descrito na tabela 3, após 72 horas de pré-sacarificação (Tempo 0) e durante 120 horas de SSF de resíduo celulósico de capim-elefante por *K. marxianus* CCT 7735.

Com a inoculação da levedura após a pré-sacarificação, foi possível observar, já nas primeiras 12 horas de SSF, que em todos os tratamentos avaliados ocorreu produção de etanol (Fig. 3). As concentrações de etanol mais altas, cerca de 44 g/L, foram obtidas nos tratamentos conduzidos com 16% de resíduo celulósico de capim-elefante a 35 °C, 22,5 FPU de celulase comercial (Celluclast[®] 1.5 L). Cardona et al. (2014) também utilizaram o capim-elefante como matéria-prima para a produção de etanol, contudo, a produção máxima obtida por esses autores foi de 26,1 g/L, inferior às concentrações máximas obtidas no presente trabalho. A maior produção de etanol aqui obtida pode estar relacionada ao diferente pré-tratamento empregado, tornando o acesso à fração celulolíticas do resíduo obtido, mais fácil para as enzimas celulolíticas, bem como pela influência dos intervalos das variáveis estudadas no processo de SSF, cujas combinações favoreceram a produção de etanol. Os resultados aqui obtidos se destacam pelos valores acima de 4% (p/v) de etanol, que é a concentração mínima desejada para viabilizar os custos com o processo de destilação (ZACCHI e AXELSSON, 1989).

Em trabalho realizado por Tomás-Pejó et al. (2009), utilizando celulose cristalina 15% em SSF, a produção máxima foi de 43,5 g/L, contudo, o substrato utilizado por esses autores,

diferente do utilizado no presente trabalho, possui alto grau de pureza e é mais acessível às enzimas na etapa de sacarificação, o que favorece o processo (SOUZA et al., 2012). Desse modo, os resultados alcançados no presente trabalho (cerca de 44 g/L de etanol) confirmam que o capim-elefante pode ser utilizado na produção de etanol de segunda geração, além da viabilidade de aplicação do processo de SSF utilizado a *K. marxianus* CCT 7735, como já relatado por Souza et al. (2012), utilizando bagaço de cana-de-açúcar. Segundo García-Aparício et al. (2011) e Kang et al. (2012), *K. marxianus* CECT 10875 e CHY 1612 produziram 29,4 e 40,2 g/L de etanol em 15 e 18% (p/v) de palha de cevada, respectivamente - valores também inferiores aos obtidos no presente estudo. Nos tratamentos realizados a 45 °C, a produção máxima de etanol por *K. marxianus* CCT 7735 foi de aproximadamente 30 g/L, 44% maior do que a obtida por *K. marxianus* CHY 1612 a partir de palha de cevada (KANG et al., 2012). Nesse ínterim, *K. marxianus* CCT 7735 também foi capaz de fermentar a glicose liberada da hidrólise de celulose de bagaço de cana-de-açúcar a 45 °C em SSF (SOUZA et al., 2012).

As concentrações mais altas de etanol por grama de biomassa (dados não mostrados) foram obtidas nos tratamentos conduzidos a 35 °C, 8% de biomassa e 22,5 FPU, com aproximadamente 287 mg etanol/g biomassa. Essa produção foi maior do que a observada por Cardona et al. (2014), 149,3 mg etanol/g de capim-elefante pré-tratado apenas com solução alcalina. Isso pode ter ocorrido pela maior acessibilidade das enzimas às cadeias de celulose pelo pré-tratamento aqui empregado, e pela combinação entre a carga enzimática, concentração de biomassa e outras variáveis, que diferem daquelas utilizadas por esses autores.

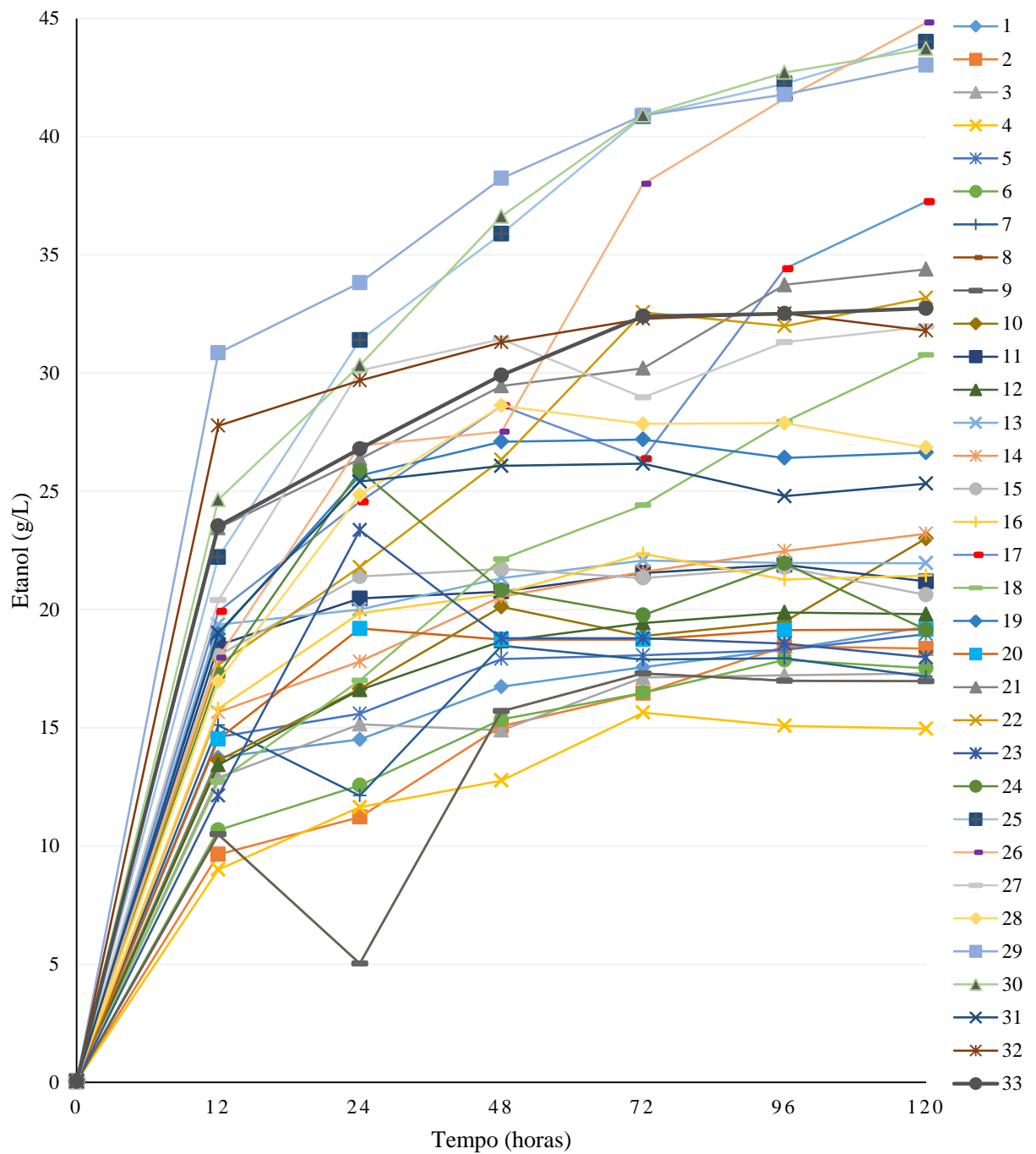


Figura 3: Estimativas de produção de etanol por *K. marxianus* CCT 7735, a partir de resíduo celulósico de capim-elefante submetido a diferentes tratamentos de SSF, conforme delineamento Fatorial $2^5 + 1$ descrito na Tabela 3.

4.3 Estabelecimento das condições ótimas de fermentação

De acordo com os experimentos realizados, o aumento da produção de etanol foi alcançado com a diminuição da temperatura (Temp) e aumentos das concentrações de celulases (CC) e de biomassa (CB). Além disso, a temperatura e concentração de biomassa apresentaram interação antagônica, o que sugere aumentar a concentração de biomassa somente na presença de temperaturas mais baixas. A agitação e o pH não demonstraram efeito significativo, possivelmente porque a agitação adotada não promoveu uma eficiente difusão das enzimas, o que poderia inibir a fermentação. Já a faixa de pH estudada possivelmente não promoveu aumento na atividade das enzimas, sendo estas mais susceptíveis ao efeito da faixa de temperatura aqui estudada. Desse modo, a superfície de resposta ajustada foi dada por:

$$\hat{Y}_i = 27,577 - 3,357*Temp_{ci} + 3,048*CC_{ci} + 6,427*CB_{ci} - 2,656*Temp_{ci}.CB_{ci}$$

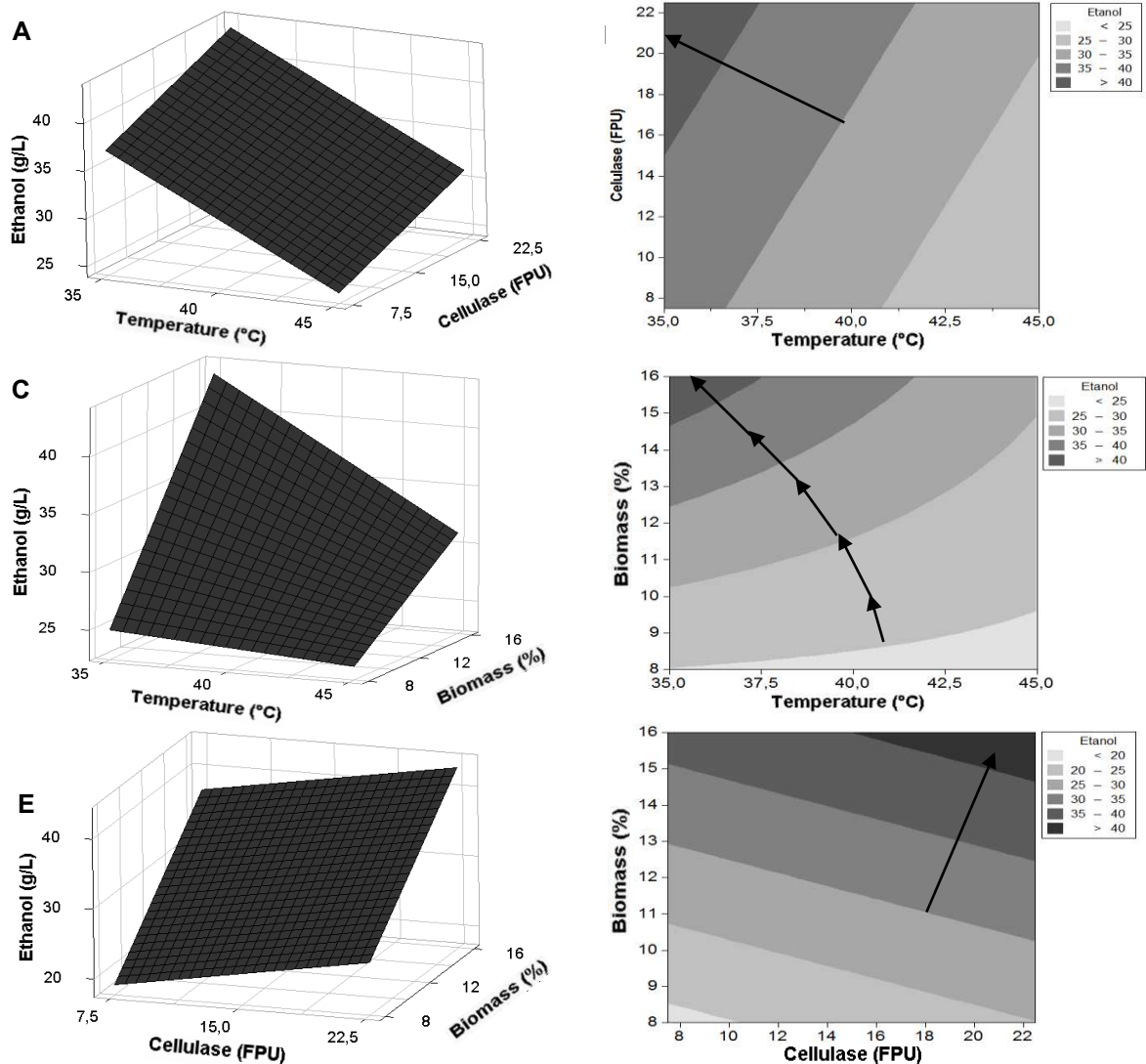
*: significativo pelo teste *t* de student (p-valor < 0,05);

$$R^2 = 0,85;$$

Temp_{ci}, CC_{ci} e CB_{ci} para -1 a 1.

A indicativa de que a temperatura deve ser diminuída para que a produção de etanol aumente está coerente, pois a temperatura mais elevada pode ter reduzido a viabilidade celular, visto que ocorreu acúmulo de glicose nos ensaios realizados a 45 °C, sem que ocorresse aumento nas concentrações de etanol. Tanto o aumento da concentração de enzimas celulolíticas, quanto o aumento de biomassa, associados à diminuição da temperatura, levam a uma maior produção de etanol (Figura 3). Na Figura 4B, o contorno mostra que a temperatura teve maior efeito do que a concentração de celulases, uma vez que há mais isolinhas incidindo no eixo x (temperatura). Isso pode ser explicado pela forte influência da temperatura sobre o metabolismo da levedura, bem como sobre a atividade das enzimas celulolíticas, estas que, como observado, respondem melhor à mudança de temperatura do que ao aumento de sua concentração. Já a concentração de biomassa e a faixa de temperatura em função da maior concentração de celulases (Figuras 4C e D) interagem de tal forma que a concentração de biomassa surte maior efeito no aumento da produção de etanol do que a temperatura, o que é claramente indicado pelas isolinhas que atravessam o eixo y (concentração de biomassa) na Figura 4D. Isso está de acordo com os dados observados nas Figuras 2 e 3, onde as maiores concentrações de glicose e etanol foram obtidas nos tratamentos com maior concentração de resíduo celulósico de capim-elefante. Do mesmo modo, a concentração de biomassa também

apresentou maior efeito quando comparada à concentração de celulases em função da menor temperatura estudada, como é possível observar nas Figuras 4E e F.



Figuras 4: Superfícies de resposta e contornos para a produção de etanol em função da temperatura e concentração de celulases para concentração de biomassa igual a 16% (A e B); Temperatura e concentração de biomassa para concentração de celulases igual a 22,5 FPU (C e D); concentração de celulases e concentração de biomassa para temperatura igual a 35 °C (E e F).

4.3.1 Deslocamento

Com base nos resultados obtidos, foram realizadas duas tentativas de deslocamento (Tabelas 5 e 6), a fim de se determinar quando as variáveis significativas começam a perder efeito sobre a produção de etanol. Todavia, a temperatura interagiu com a biomassa

(Temp.CB), e o sinal negativo indicou que foi de maneira antagônica, ou seja, para aumentar a temperatura deve-se diminuir a concentração de biomassa, ou então, diminui-se a temperatura com o aumento da concentração de biomassa. Essa interação pode estar relacionada à escolha da faixa de valores estudados para uma das duas variáveis, e/ou com o efeito da temperatura sobre a atividade enzimática, que não foi avaliada no presente trabalho. Uma vez que o aumento da concentração de celulasas indica maior produção de etanol, a temperatura e a concentração de biomassa foram fixadas a 35 °C e 16% (p/v), respectivamente, aumentando-se a concentração de celulasas no primeiro deslocamento (Tabela 5).

Tabela 5

Deslocamento das concentrações de celulasas (CC), sob temperatura (Temp) e concentração de biomassa (CB) fixadas.

Deslocamento	Temp (°C)	CC (FPU)	CB (%)	Etanol g/L
1	35	15.0	16	43.4
2	35	18.6	16	43.2
3	35	22.1	16	44.1
4	35	25.7	16	44.4
5	35	29.2	16	44.1
6	35	32.8	16	44.3
7	35	36.3	16	44.7
8	35	39.9	16	45.1

O deslocamento 3 foi selecionado, pois a produção de etanol não apresentou aumento satisfatório em relação aos ensaios que usaram uma maior quantidade de enzimas. Desse modo, a carga de 22,1 FPU de enzimas/g biomassa foi proposta como ponto de partida para o segundo deslocamento (Tabela 6), variando-se a temperatura e a concentração de biomassa.

Tabela 6

Deslocamento da temperatura (Temp) e da concentração de biomassa (CB) sob concentração de celulase (CC) fixada.

Deslocamento	Temp (°C)	CC (FPU)	CB (%)	Etanol g/L
1	35	22.1	16	44.1
2	33	22.1	18	43.7
3	32	22.1	20	41.8
4	30	22.1	22	40.4
5	28	22.1	24	38.8

Conforme observado nas Figuras 4, a diminuição da temperatura indicou aumento na produção de etanol, mas isto não foi observado no segundo deslocamento, no qual a diminuição da temperatura levou à redução na sua produção. Ao comparar o efeito de cada deslocamento (Figura 5), observou-se que no primeiro deslocamento, mesmo com o aumento da concentração de enzimas, a produção de etanol tendeu a manter-se constante. Isso pode estar relacionado com a heterogeneidade da celulose com frações amorfas e cristalinas (ZHANG et al., 2009). Já no segundo deslocamento, a diminuição da temperatura e o aumento da biomassa levaram à diminuição da produção de etanol, possivelmente relacionado com a temperatura ótima de atividade das enzimas, que deve ser entre 45 e 50 °C. O aumento da concentração de biomassa também pode acarretar o aumento da viscosidade do meio e limitações na transferência de massas, o que pode ter dificultado a difusão das enzimas, uma vez que não variou-se a agitação (GARCÍA-APARÍCIO et al., 2011). Nesse sentido, o aumento da concentração de biomassa no segundo deslocamento pode ter sido relativamente exagerado, de modo que um aumento menos pronunciado, ou talvez a redução da temperatura sob concentração de biomassa em 16 (ou no máximo 18%), pudessem acarretar aumento na produção de etanol.

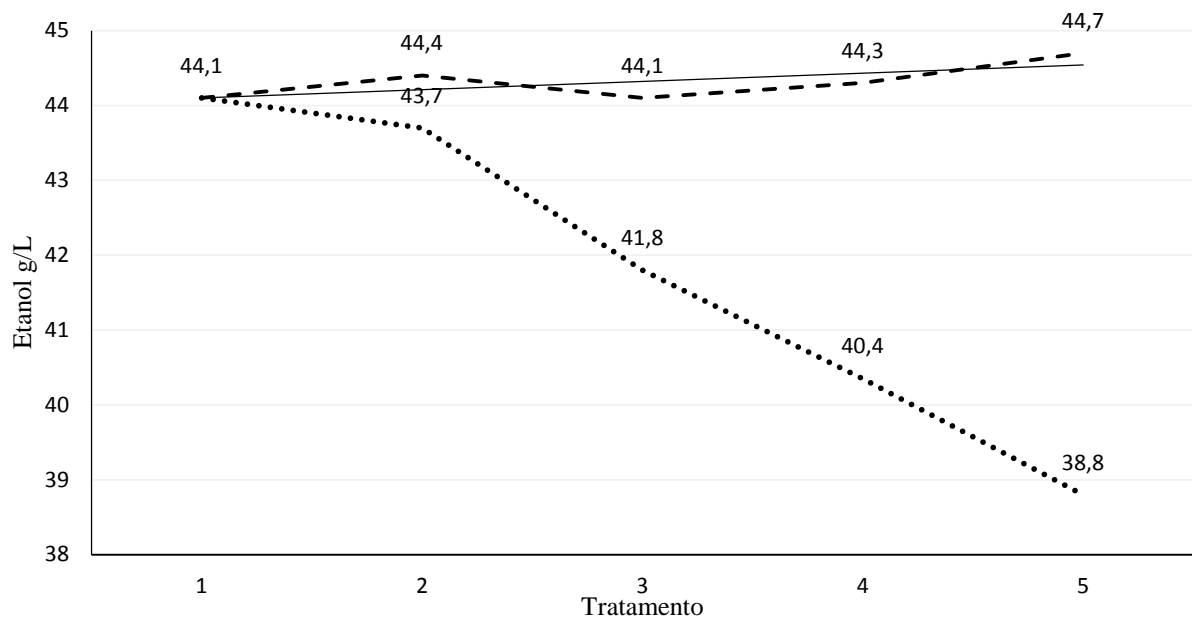


Figura 5: Estimativas de produção de etanol (g/L) deslocando-se a concentração de celulases (- - -), e fixando a temperatura (35 °C) e a concentração de biomassa (16 %), e deslocando-se a temperatura e a concentração de biomassa (.....), com a concentração de celulase fixada (22,1 FPU).

É sugerido que as condições ótimas para elevar a produção de etanol estavam dentro dos intervalos escolhidos para a realização do delineamento fatorial 2^5+1 . É proposta uma recomendação para as condições de cada variável do processo de SSF, ajustando-se a concentração de biomassa em 16%, uma vez que concentrações superiores a essa aumentam a viscosidade, dificultam a análise (KANG et al., 2012) e diminuem o rendimento por grama de biomassa (dados não mostrados), a concentração de celulases de 22,5 FPU/g de biomassa e agitação de 50 rpm. O valor de pH de 4,8 foi selecionado sendo o indicado pela Novozymes para a melhor atividade das do coquetel enzimático Celluclast 1.5L, (LAN et al., 2012) e também levando em consideração que o mesmo não teve efeito significativo para o aumento na produção de etanol no presente estudo. A temperatura foi ajustada para 38 °C, por ser ótima para o crescimento de *K. marxianus* CCT 7735, com base em estudo realizado por Diniz et al. (2007), onde foi possível observar as maiores velocidades de crescimento (μ), 0,5764 e 0,6094, em meios contendo 15% de permeado de soro de queijo e em meio mínimo Yeast Nitrogen Base (YNB) acrescido de lactose 2% (p/v), respectivamente.

4.4 Repetição das condições propostas pelo modelo

Adotando-se as recomendações propostas com base nos resultados obtidos após o deslocamento, a produção média de 45,28 gramas de etanol por litro (Figura 6) foi alcançada após 96 horas de SSF, em tratamentos realizados em duplicata, com 16 % de biomassa, 22,5 FPU, agitação de 50 rpm, valor de pH de 4,8 e temperatura de 38 °C. O ajuste da temperatura para 38 °C teve efeito positivo em comparação com o melhor resultado obtido no planejamento fatorial, de 44,8 g/L, utilizando-se as mesmas concentrações de celulases e biomassa, mesma agitação, mas com pH inicial do meio de 5,8 e temperatura de SSF de 35 °C. Nessas condições, o melhor valor de produtividade volumétrica foi alcançado após 24 horas de SSF, com 1,89 g/L.h⁻¹.

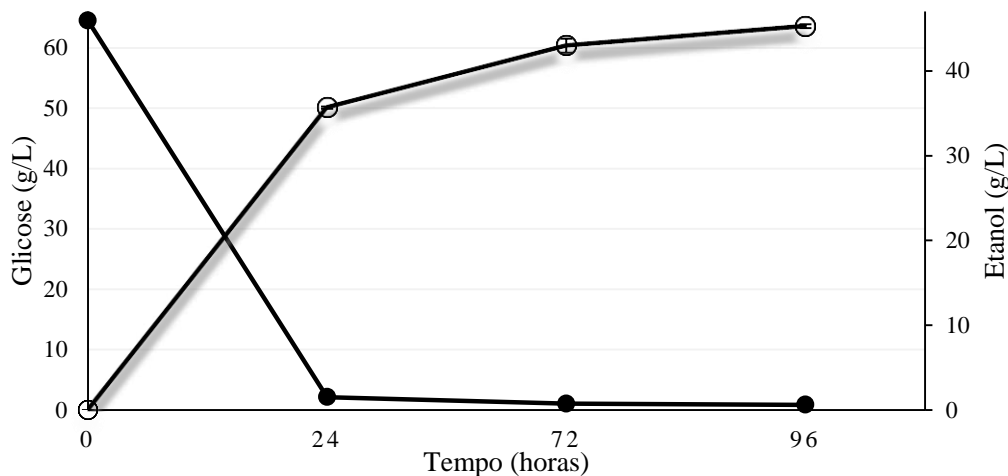


Figura 6: Estimativa da produção média de etanol (g/L) (—○—) e da concentração de glicose (g/L) (—●—) após 72 horas de pré-sacarificação (tempo 0) e durante 96 horas de SSF, realizada em frascos erlenmeyer com 16% de biomassa, 22,5 FPU, 50 rpm, valor de pH de 4,8 e 38 °C.

5 CONCLUSÕES

Com o pré-tratamento ácido e alcalino do capim-elefante obteve-se um resíduo com alta concentração de celulose e baixos teores de lignina, demonstrando o potencial desta matéria-prima para a produção de etanol celulósico, uma vez que maiores concentrações de glicose podem ser obtidas. A *K. marxianus* CCT 7735 produziu etanol em todos os tratamentos avaliados, incluindo aqueles conduzidos a 45 °C, temperatura interessante no ponto de vista econômico para processos de SSF. Dentre as variáveis estudadas no processo SSF, apenas a temperatura e as concentrações de biomassa e de enzimas celulolíticas tiveram efeito significativo nos intervalos avaliados, havendo um destaque para a interação antagônica entre as duas primeiras, na qual a indicativa de aumento da concentração de biomassa e diminuição da temperatura não surtiram o efeito esperado. Portanto, com base no modelo estatístico obtido, considerando as variáveis avaliadas neste estudo e o ajuste da temperatura para 38 °C, as condições ideais para a produção de etanol celulósico de capim-elefante por *K. marxianus* CCT 7735 estavam dentro dos intervalos estudados, aconselhando-se os seguintes valores: temperatura de 38 °C, 16% de resíduo celulósico de capim-elefante, 22,5 FPU do complexo enzimático Celluclast[®] 1.5 L/g de resíduo, agitação de 50 rpm e valor de pH de 4,8. Portanto, a utilização de capim-elefante como matéria-prima para produção de etanol de por *K. marxianus* CCT 7735 é promissora.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANKOM Thechnology. Method 5: acid detergent fiber in feeds filter bag technique. Macedon, 2006. Disponível em: https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_5_ADF_Method_A200_RevE_11_04_14.pdf. Acesso em: 14 jul. 2015.
2. Banerjee G, Car S, Scott-Craig JS, Hodge DB, Walton JD. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. *Biotechnology for Biofuels* 2011; 4:16.
3. Basso V, Machado JC, Lédo FJS, Carneiro JC, Fontana RC, Dillon AJP, Camassola M. Different elephant grass (*Pennisetum purpureum*) accessions as substrates for enzyme production for the hydrolysis of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy* 2014; 71:155-161.
4. Biofuelsdigest. Disponível em: <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/12/17/raizen-iogen-commence-cellulosic-ethanol-production-in-brazil/?print=print>>. Acesso em 20/07/2015.
5. Boddey RM, Soares LHB, Alves BJR, Urquiaga S. Bio-ethanol production in Brazil. *Biofuels, solar and Wind as Renewable Energy Systems* 2008; 321-356.
6. Byrt CS, Grof CPL, Furbank RT. C4 plants as biofuel feedstocks: optimising biomass production and feedstock quality from a lignocellulosic perspective. *Journal of Integrative Plant Biology* 2011; 53:120-135.
7. Cardona E, Rios J, Peña J, Rios L. Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. *Fuel* 2014; 118:41-47.
8. Castro RCA, Roberto IC. Selection of a thermotolerant *kluveromyces marxianus* strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; 172:1553-1564.
9. Chen Y, Sharma-Shivappa RR, Keshwani DR, Chen C. Potential of Agricultural Residues and Hay for Bioethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology A* 2007; 142:276-290.
10. Cheon Y, Kim J, Park J, Heo P, Lim JH, Jung GY, et al. A biosynthetic pathway for hexanoic acid production in *Kluveromyces marxianus*. *Journal of Biotechnology* 2014; 182–183:30-36.

11. Costa DA, Souza CJA, Costa PS, Rodrigues MQRB, Santos AF, Lopes MR. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98:3829-3840.
12. Dashtban M, Maki M, Leung KL, Mao C, Qin W. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology* 2010; 1-8.
13. Dias MOS, Cunha MP, Jesus CDF, Rocha GJM, Pradella JGC, Rossell CEV, et al. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? *Bioresource Technology* 2011; 102: 8964-8971.
14. Diniz RHS, Rodrigues MQRB, Fietto LG, Passos FML, Silveira WB. Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2014; 3:111-117.
15. Diniz RHS, Silveira WB, Passos FMLP. Produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 em permeado de soro de queijo sob diferentes temperaturas. In: XVI Simpósio de Iniciação Científica, VI Mostra Científica da Pós Graduação e IV Simpósio de Extensão Universitária, 2007, Viçosa. XVI Simpósio de Iniciação Científica, VI Mostra Científica da Pós Graduação e IV Simpósio de Extensão Universitária. Viçosa: UFV, 2007.
16. Dowe N, McMillan J. SSF experimental protocols — lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation. Laboratory Analytical Procedure (LAP), NREL/TP-510-42630. 2001.
17. Faga BA, Wilkins MR, Banat IM. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D5A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. *Bioresource Technology* 2010; 101(7):2273-2279.
18. Ferreira PG, Silveira FA, Santos RCV, Genier HLA, Diniz RHS, Júnior JIR, et al. Optimizing ethanol production by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 in mixture of sugarcane bagasse and ricota whey. *Food Sci. Biotechnol* 2015; *in press*.
19. Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiol Biotechnol* 2008; 79:339-354.

20. Fontoura CF, Brandão LE, Gomes LL. Elephant grass biorefineries: towards a cleaner Brazilian energy matrix? *Journal of Cleaner Production* 2015; 96:85-93.
21. García-Aparicio MP, Oliva JM, Manzanares P, Ballesteros M, Ballesteros I, González A, Negro JM. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel* 2011; 90:1624-1630.
22. Goering HK, Van Soest PJ. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *Agricultural Handbook* 1970; 379:387-598.
23. Gospodarek J, Nadgórska-Socha A. Comparison of the effect of liming and magnesium treatment of heavy metal contaminated soil on the content of magnesium, calcium and iron in broad beans (vicia faba l. Ssp. Maior). *J. Elementol* 2010; 15:81-88.
24. Groeneveld P, Stouthamer AH, Westerhoff HV. Super life - how and why 'cell selection' leads to the fastest-growing eukaryote. *FEBS Journal* 2009; 276:254-270.
25. Gupta A, Verma JP. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2015; 41:550-567.
26. He M, Wang J, Qin H, Shui Z, Zhu Q, Wu B, et al. Bamboo: a new source of carbohydrate for biorefinery. *Carbohydrate Polymers* 2014; 111:645-654.
27. Hughes SR, Bang SS, Cox EJ, Schoepke A, Ochwat K, Pinkelman K, et al. Automated UV-C mutagenesis of *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-1109 and selection for microaerophilic growth and ethanol production at elevated temperature on biomass sugars. *Journal of Laboratory Automation* 2013; 18:276-290.
28. Kang H, Kim Y, Kim S, Choi G. Cellulosic ethanol production on temperature-shift simultaneous saccharification and fermentation using the thermostable yeast *Kluyveromyces marxianus* CHY1612. *Bioprocess Biosyst Eng* 2012; 35:115–122.
29. Kim S, Park JM, Kim CH. Ethanol Production Using Whole Plant Biomass of Jerusalem Artichoke by *Kluyveromyces marxianus* CBS1555. *Appl Biochem Biotechnol* 2013; 169:1531–1545.
30. Kovacs K, Macrelli S, Szakacs G, Zacchi G. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnology for Biofuels* 2009; 2:1-14.
31. Lan TQ, Lou H, Zhue JY. Enzymatic saccharification of lignocelluloses should be conducted at elevated pH 5.2–6.2. *Bioenergy Reserch Journal* 2012; 6:476-485.

32. Le HD, Thanonkeo P, Le VVM. Impact of High Temperature on Ethanol Fermentation by *Kluyveromyces marxianus* Immobilized on Banana Leaf Sheath Pieces. *Appl Biochem Biotechnol* 2013; 171:806-816.
33. Lin C, Tran D, Lai C, I Y, Wu C. Response surface optimization for ethanol production from *Pennisetum Alopecoider* by *Klebsiella oxytoca* THLC0409. *Biomass and bioenergy* 2010; 34:1922-1929.
34. Morais RF, Boddey RM, Urquiaga S, Jantalia CP, Alve BJR. Ammonia volatilization and nitrous oxide emissions during soil preparation and N fertilization of elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). *Soil Biology & Biochemistry* 2013; 64:80-88.
35. Myers RH, Montgomery DC. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. New York: Wiley; 1995.
36. Ogeda TL, Preti DFS. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova* 2010; 33:1549-1558.
37. Ortiz OS, Oliveira Jr S. Exergy analysis of pretreatment processes of bioethanol production based on sugarcane bagasse. *Energy* 2014; 76:130-138.
38. Passos LP, et al. Capim elefante. ed. *Biologia e manejo do capim-elefante*. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 1999.
39. Pérez-Boada M, Prieto A, Prinsen P, Forquin-Gomez MP, Río JC, Gutiérrez A, et al. Enzymatic degradation of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) stems: Influence of the pith and bark in the total hydrolysis. *Bioresource Technology* 2014; 167:469-475.
40. Raizen. Disponível em: < <http://www.raizen.com.br/raizen-inaugura-primeira-unidade-de-etanol-de-segunda-geracao>>. Acesso em 20/07/2015.
41. RFA, Renewable Fuels Association. Mundial Production 2014. Disponível em: <<http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>>. Acesso em: 16/07/2015.
42. RFS, Renewable Fuels Standard, 2012; Disponível em: <http://libcloud.s3.amazonaws.com/93/72/c/2270/Issue_Brief_RFS_101.pdf>. Acesso em: 10/07/2015.
43. Ribeiro Júnior JI. Métodos estatísticos aplicados à melhoria da qualidade. 1^{ft} ed. Viçosa: Editora UFV; 2012.
44. Samson R, Legendre JB, Christen R, Saux MF, Achouak W, Gardan L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb.

- nov. and *Dickeyaparadisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicolas* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology 2005; 55:1415-1427.
45. Sansonetti S, Hobley TJ, Calabrò V, Villadsen J, Sin G. A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: A batch fermentation and kinetic study. Bioresource Technology 2011; 102:7513-7520.
 46. Santos JRA, Souto-Maior AM, Gouveia ER, Martin C. Comparação entre processos em shf e em ssf de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. Química Nova 2010; 33:904-908.
 47. Sathitsuksanoh N, Zhu Z, Zhang YHP. Cellulose solvent- and organic solvent-based lignocellulose fractionation enabled efficient sugar release from a variety of lignocellulosic feedstocks. Bioresource Technology 2012; 117:228-233.
 48. Selig M, Weiss N; Ji Y. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP), NREL/TP-510-42629. 2008.
 49. Senturk-ozler S, Gevgilili H, Kalyon DM. Biomass pretreatment strategies via control of rheological behavior of biomass suspensions and reactive twin screw extrusion processing. Bioresource Technology 2011; 102:9068-9075.
 50. Silva DJ, Queiroz AC. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006; 235.
 51. Silva TL, Roseiro JC, Reis A. Applications and perspectives of multi-parameter flow cytometry to microbial biofuels production processes. Trends in Biotechnology 2012; 30:225-232.
 52. Silveira WB, Passos FJV, Mantovani HC, Passos FML. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: A flux analysis of oxidoreductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. Enzyme and Microbial Technology 2005; 36:930-936.
 53. Somerville C, Youngs H, Taylor C, Davis SC, Long SP. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. Science 2010; 329:790-790-2.
 54. Souza CJA, Costa DA, Rodrigues MQRB, Santos AF, Lopes MR, Abrantes ABP, et al. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. Bioresource Technology 2012; 109:63-69.

55. Sykue. Disponível em: <<http://www.sykue.com.br>>
56. Tomás-Pejó E, García-Aparicio M, Negro MJ, Oliva JM, Ballesteros M. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresource Technology* 2009; 100:890-895.
57. WEO, 2013. World energy outlook 2013. Disponível em: <http://www.worldenergyoutlook.org/media/weowebiste/2013/WEO2013_Ch06_Renewables.pdf>. Acesso em 10/07/2015.
58. Wingren A, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol. Prog.* 2003; 19:1109-1117.
59. Yang H, Yan R, Chen H, Lee DH, Zheng C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis Haiping. *Fuel* 2007; 86:1781-1788.
60. Yang XY, Huang C, Guo HJ, Xiong L, Li YY, Zhang HR, Chen XD. Bioconversion of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) acid hydrolysate to bacterial cellulose by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Applied Microbiology* 2013; 115:995–1002.
61. Zacchi G, Axelsson A. Economic evaluation of preconcentraron in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnology and Bioengineering* 1989; 34:223-233.
62. Zanetti JB, Morais RF, Alves BJR, Boddey RM, Urquiaga S, Soares LHB. Balanço de energia na produção de capim-elefante em condições experimentais. *EMBRAPA Seropédica: Embrapa Agrobiologia* 2010; 71:1-18.
63. Zhang YH, Hong J, Ye Z. Cellulase Assays. *Methods Mol. Biol* 2009; 581:213-231.