



Produção de etanol de 2ª geração por sacarificação e fermentação simultânea de tortas de caroço de algodão e girassol com uso de extrato enzimático concentrado produzido por *Aspergillus tubingensis* AN1257

Ricardo S. Santos^{1,2}, Jéssica L. Pimenta³, Alice L. Macedo², Lílian Pantoja^{2,3}, Alexandre S. Santos^{2,4}

¹Departamento de Farmácia - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM (ricardo.santos@ufvjm.edu.br); ²Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis – UFVJM/UFU; ³Instituto de Ciência e Tecnologia - UFVJM; ⁴Departamento de Ciências Básicas – UFVJM

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial de extrato enzimático produzido por *Aspergillus tubingensis* AN1257 e concentrado por precipitação com sulfato de amônia na sacarificação e fermentação simultânea (SFS) de tortas de algodão e girassol, *in natura* e pré-tratadas. O extrato enzimático concentrado obtido permitiu conduzir o processo de sacarificação e fermentação simultânea com títulos de 100 U de FPase/g de torta, 50 U de endoglucanase/g de torta, 650 U de β -glucosidase/g de torta e 6400 U de xilanase/g de torta. Com base nos resultados obtidos neste trabalho foi possível projetar produções de 174 e 203 litros de etanol por tonelada de torta de girassol *in natura* e pré-tratada, respectivamente. Já nos processos de SFS das tortas de algodão *in natura* e pré-tratada projetou-se, respectivamente, a produção de 104 e 120 litros de etanol por tonelada destas biomassas.

Palavras-chave: Celulases, Xilanases, Coprodutos, Bioetanol.

Área Temática: Biocombustíveis

Production of 2nd generation ethanol by simultaneous saccharification and fermentation of cottonseed and sunflower cakes with concentrated enzymatic extract produced by *Aspergillus tubingensis* AN1257

Abstract

The objective of this study was to evaluate the enzymatic extract produced by Aspergillus tubingensis AN1257 and concentrated by precipitation with ammonium sulfate in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of in natura and pretreated cottonseed and sunflower cakes. The concentrated enzymatic extract allowed to conduct the process of simultaneous saccharification and fermentation with titers of 100 U FPase / g cake, 50U endoglucanase / g cake, 650 U of β -glucosidase / g cake and 6400 U xylanase / g cake. Based on the results obtained in this study it was possible to design productions of 174 and 203 liters of ethanol per ton of in natura and pretreated sunflower cake, respectively. Since the processes of SSF applied to in natura and pretreated cottonseed cake protrudes, respectively, 104 and 120 liters of ethanol per ton of these biomasses.

Key words: Cellulases, Xylanases, Co-products, Bioethanol.

Theme Area: Biofuels



1 Introdução

A valoração econômica e uso diversificado de resíduos agroindustriais fazem parte da lógica de mercado e do esforço de sustentabilidade de cadeias produtivas baseadas em biomassas. O emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos, além de economicamente interessante, contribui para minimizar os problemas ambientais decorrentes do seu descarte na natureza (VISSER et al., 2011). Neste panorama, coprodutos sólidos provenientes da agroindústria de óleos vegetais podem ser utilizados como substratos para produção de celulases e xilanases e também na produção de bioetanol de segunda geração (VIKARI et al., 2012; VISSER, et al., 2011). A hidrólise de materiais lignocelulósicos é uma etapa fundamental no processo de produção do etanol de 2ª geração, cujo princípio é possibilitar a conversão da celulose e hemicelulose a açúcares fermentáveis que, por sua vez, poderão ser convertidos a etanol por micro-organismos específicos (CASTRO; PEREIRA Jr, 2010).

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de um extrato enzimático holocelulolítico produzido por *Aspergillus tubingensis* AN1257 em processos de sacarificação de tortas de algodão e girassol *in natura* e pré-tratadas.

2 Metodologia

2.1 Obtenção e preparo da tortas de caroço de algodão e girassol

A torta de algodão utilizada neste estudo foi doada pela Indústria de Óleo, Rações e Plásticos Montes Claros LTDA – localizada no município de Montes Claros, MG. A torta de girassol foi doada pela indústria de biodiesel BIOSEP, localizada no município de Três Pontas, MG. Antes de serem avaliadas quanto à composição química e em processos de sacarificação, as referidas tortas foram inicialmente trituradas em moinho manual, posteriormente, secas em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 60 °C, por período de 48 horas. Em seguida os materiais obtidos foram cominuídos em moinhos de facas e peneirados em malhas de 0,5 e 0,2 mm.

Neste estudo foi avaliado o processo de sacarificação e fermentação simultânea das tortas de caroço de algodão e girassol, *in natura* e pré-tratadas com ácido diluído. Para obtenção das tortas pré-tratadas empregou-se uma solução de ácido sulfúrico na concentração de 7% (p/p), a uma razão S/L de 30% em relação à torta de algodão e 20% para torta de girassol, sob temperatura de 120°C (1 atm) em autoclave por 60 minutos. Os materiais obtidos foram filtrados sob vácuo e os resíduos sólidos lavados com água destilada sob vácuo até atingir pH neutro. Os resíduos pré-tratados foram submetidos a secagem em estufa com circulação de ar forçada a 60 °C por 24 horas.

2.2 Produção do extrato enzimático

O crescimento da linhagem *Aspergillus tubingensis* AN1257 para obtenção do inóculo destinado à produção de enzimas holocelulolíticas foi realizado por repicagem de cultura estoque em meio sólido PDA mantido a 30°C durante 7 dias. Os conídios produzidos foram recuperados assepticamente por adição de meio líquido segundo Mandels & Sternberg (1976) modificado, composto por (m/v): 0,7% de (NH₄)₂SO₄, 0,20% de KH₂PO₄, 0,03% de CaCl₂, 0,02% de MgSO₄.7H₂O, e 0,10% de solução de sais (5 mg/L FeSO₄.7H₂O, 1,6 mg/L, MnSO₄.H₂O, 1,4 mg/L ZnSO₄.7H₂O, e 2,0 mg/L CoCl₂), seguido de coleta com auxílio de pipeta Pasteur, filtração em gaze estéril e contagem de esporos em câmara de Neubauer. A suspensão foi devidamente diluída de modo que a concentração final do inóculo fosse 1x10⁷ conídios/grama de torta utilizada no processo fermentativo.



A produção do extrato enzimático neste trabalho foi realizada por fermentação em estado sólido (FES) em condição otimizada conforme descrito Santos (2015). Para tanto, o processo de FES foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 30,0 gramas de torta de caroço de algodão, acrescidos de 56,0 ml de inóculo (razão sólido/líquido de 35%). Estes sistemas foram incubados a 30°C em estufa B.O.D. durante 8 dias. A obtenção dos extratos enzimáticos foi realizada por adição de 200 ml de tampão acetato pH 4,5, 50 milimolar, em cada frasco, seguido de agitação vigorosa em vórtex e filtração em sistema a vácuo. Posteriormente, o volume total do extrato enzimático bruto obtido foi concentrado por *salting out* com sulfato de amônia até 90% de saturação, em banho de gelo e sob agitação magnética. Após solubilização completa do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a suspensão obtida foi centrifugada a 4000 rpm, 4 °C, por 10 minutos. Posteriormente, os sobrenadantes foram separados e os pellets recolhidos em um único recipiente. O precipitado protéico obtido foi completamente solubilizado com o menor volume possível de tampão acetato 100 mM, pH 4,5. O extrato enzimático concentrado, denominado EC AN1257, foi armazenado em gelo até determinação das atividades de endoglucanase, FPase, β -glucosidase (GHOSE, 1987) e xilanase (BAILEY et al., 1992) e utilização nos processos de sacarificação.

2.3 Processo de sacarificação e fermentação simultânea

Os ensaios de sacarificação e fermentação simultânea foram realizados em frascos Erlenmeyers de 50 mL contendo 2,00 g de torta de girassol ou algodão (*in natura* ou pré-tratada), os quais foram inicialmente esterilizados em autoclave. Aos frascos contendo tortas de algodão *in natura* e pré-tratada foram adicionados 8 mL de extrato enzimático concentrado EC AN1257 perfazendo uma razão sólido/líquido de 20%. Já os processos com uso das tortas de girassol *in natura* e pré-tratada foram conduzidos em razão sólido/líquido de 15%. Para atingir esta razão S/L foram utilizados o mesmo volume de extrato enzimático concentrado empregado na sacarificação da torta de algodão (8 mL), acrescidos de 3,33 mL de tampão acetato, pH 4,5, 100 mM. Inicialmente, em um período de 24 horas, foi realizado a sacarificação das biomassas avaliadas neste estudo, a qual ocorreu em estufa incubadora sob agitação de 120rpm, a temperatura de 50°C. Antes e após 24 horas de sacarificação foram retiradas alíquotas para determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959) e glicose (LLOYD; WHELAN, 1969). A eficiência hidrolítica no período de 24 horas de sacarificação foi calculada considerando a quantidade de celulose e hemicelulose presentes nos mostos e a diferença entre as concentrações de açúcares redutores inicial e após os tempos de sacarificação avaliados, conforme equação 1.

$$Ef_{24h} = \frac{AR_{sac} (g100g) - AR_{in} (g100g)}{Polissacarídeos (g100g)} \quad (1)$$

Ef_{24h}: Eficiência hidrolítica após 24 horas de sacarificação

AR_{sac}: Açúcares redutores (g) liberados na sacarificação de 100 g de torta.

AR_{in}: Açúcares redutores (g) antes do processo de sacarificação de 100 g de torta

Polissacarídeos: Celulose e hemicelulose (g) presentes em 100 g de torta.

Os hidrolisados obtidos foram submetidos à fermentação, por 144 horas, com uso do inóculo fermentativo *Saccharomyces cerevisiae* a 3% (fermento biológico desidratado marca Fleishmann®). O processo de sacarificação e fermentação simultânea foi conduzido nos mesmos sistemas descrito anteriormente, acrescidos do inóculo e acoplados a fermentômetros, que permitem a saída do CO₂ sem permitir a entrada de ar.

O desprendimento de CO₂ foi acompanhado por meio de sucessivas pesagens do



sistema fermentativo no intervalo de 120 horas. As pesagens foram realizadas em intervalos de 30 minutos nas primeiras 6 horas, posteriormente, intervalos de 1 hora até 12 horas de fermentação, 2 horas até 24 horas de e 4 horas até o final do processo. Os valores de CO₂ obtidos ao longo do tempo foram utilizados para estimar o perfil de produção do etanol segundo a estequiometria metabólica do processo fermentativo, na qual para cada 0,499g de CO₂ liberados é produzido 0,511g de etanol.

Ao final do processo alíquotas foram coletadas e analisadas quanto aos teores de etanol, açúcares redutores (MILLER, 1959) e glicose (LLOYD; WHELAN, 1969). Para determinação do teor de etanol, as amostras foram pré-destiladas e posteriormente quantificadas segundo método descrito por Pilone (1985). Os valores de eficiência hidrolítica final (Eff) foram calculados conforme equação 15.

$$Eff = \frac{((Etanol \text{ g}/100g) \times 2) + ARfin \text{ (g}/100g)}{Polissacarídeos \text{ (g}/100g)}$$

1

Ef 2: Eficiência hidrolítica final;

Etanol (g/100g): Etanol (g) no final do processo de SSF referente a 100 g de torta.

AR fin: Açúcares redutores (g) no final do processo de SSF referente a 100 g de torta.

Polissacarídeos: Celulose e hemicelulose (g) presentes em 100 g de torta.

Os valores percentuais de celulose presentes nas tortas de algodão *in natura*, torta de algodão pré-tratada, torta de girassol *in natura* e torta de girassol pré-tratada e utilizados para as determinações da *Ef-24h* e *Eff* foram 33,29% ± 1,13%, 46,33% ± 1,18%, 23,22% ± 0,30% e 48,69 ± 2,68, respectivamente (Trabalho submetido ao evento). Já os percentuais de hemicelulose para torta de algodão *in natura*, torta de algodão pré-tratada, torta de girassol *in natura* e torta de girassol pré-tratada foram, respectivamente, 8,76% ± 0,92%, 1,85% ± 0,27%, 20,55% ± 1,22% e 1,89% ± 0,15% (Trabalho submetido ao evento).

3 Resultados e discussão

Os valores de atividade das enzimas do extrato enzimático EC-AN1257 utilizados nos processos de SFS foram de 100 U de FPase/g de torta, 50 U de endoglucanase/g de torta, 650 U de β-glucosidase/g de torta e 6400 U de xilanase/g de torta.

Os valores relativos aos teores de açúcares redutores e glicose encontrados antes e após 24 horas de sacarificação das tortas de algodão e girassol, *in natura* e pré-tratadas, e valores de eficiência hidrolítica no referido período foram expressas na Tabela 1. Os dados gerados referentes aos teores de açúcares redutores e glicose no final da fermentação, a concentração de etanol no mosto fermentativo e rendimento final da sacarificação (Ef 2) também estão apresentados na Tabela 1. O perfil do processo fermentativo, expresso graficamente em função da quantidade de etanol produzido equivalente ao CO₂ desprendido, pode ser observado na Figura 1. Neste gráfico percebe-se a habilidade da levedura em utilizar os carboidratos presentes no meio de fermentação, a qual refletiu em uma produção de etanol com maior intensidade nas seis primeiras horas. Este fato está atrelado principalmente à presença de glicose, um açúcar facilmente fermentável.

Tabela 1 - Concentrações de açúcares redutores no início, após 24 horas de sacarificação e após o

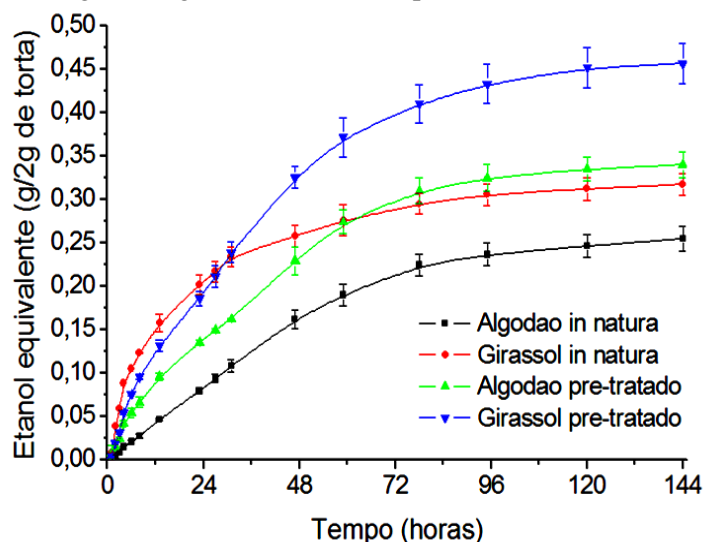


processo de SFS das tortas de algodão e girassol *in natura* e pré-tratadas, quantidade de etanol produzido e rendimentos de cada processo.

	AR in (g/L)	Gli in (g/L)	AR 24h (g/L)	Gli 24h (g/L)	AR fin (g/L)	Gli fin (g/L)	Etanol (g/L)	Ef 24h (%)	Ef ff (%)
A	4,38±0,39	0,95±0,10	46,44±0,76	12,10±1,06	20,85±0,39	1,21±0,23	20,45±1,76 ^c	38,00 ^{bB}	50,54 ^{cA}
G	6,53±0,44	0,83±0,09	41,04±2,09	10,43±0,36	23,47±0,44	0,48±0,12	24,13±1,64 ^b	42,43 ^{aB}	74,15 ^{aA}
AP	1,61±0,26	0,19±0,07	18,45±2,99	16,22±1,64	3,25±0,26	0,92±0,14	23,52±2,90 ^{bc}	16,86 ^{dB}	49,60 ^{cA}
GP	1,08±0,33	0,20±0,03	24,75±1,92	22,05±1,08	1,16±0,33	0,22±0,07	28,27±1,32 ^a	27,72 ^{cB}	64,61 ^{bA}

A, G, AP e GP: torta de algodão *in natura* (A), girassol *in natura* (G), algodão pré-tratada (AP) e girassol pré-tratada (GP); ARfin e Glic fin: teores de açúcares redutores e glicose encontrados após o processo fermentativo; AR in e Gli in: teores iniciais de açúcares redutores e glicose; AR 24h e Gli 24h: teores de açúcares redutores e glicose encontrados após 24 horas de sacarificação; Ef 24h: Eficiência da hidrólise de polissacarídeos após 24 horas de sacarificação Ef ff: Eficiência global da hidrólise de polissacarídeos após a SSF. Teste Tukey: As médias expostas em uma mesma coluna seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si. Já as médias expostas em uma mesma linha seguidas pela mesma letra maiúscula minúscula não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 1 - Curvas do progresso de produção de etanol obtidos com base no desprendimento de gás carbônico (CO₂) durante o processo fermentativo de meios provenientes do hidrolisado de tortas de algodão e girassol *in natura* e pré-tratados.



A sacarificação e fermentação simultânea (SFS) das biomassas avaliadas neste estudo levou a produção de mostos com concentrações significativas de etanol, sobretudo no processo que utilizou a torta de girassol pré-tratada. Os valores de concentração de etanol obtidos nos processos SSF com uso de torta de algodão foram semelhantes aos reportados por Fockink e colaboradores (2015). No referido estudo foi relatado a produção de etanol com concentrações próximas a 20g/L utilizando resíduos de descaroçamento de algodão (CGT) pré-tratados. McIntosh (2014) estudou o processo de SSF de CGT e obteve 13 g/L de etanol. Kumari e Pramanik (2012) produziu uma série de cepas de leveduras híbridas por fusão de protoplastos de *S. cerevisiae* e leveduras fermentadoras de pentoses e a fermentação de hidrolisados de CGT e o melhor *fusant* resultou numa concentração de etanol de 7 g/L. Telli-Okur e Eken-Saraçoglu (2008) relataram a produção de 11g/L de etanol a partir de torta de girassol utilizando *Pichia stipitis*. Estas performances fermentativas foram menores que as observadas neste estudo.

É importante salientar que em todos os processos fermentativos utilizando as tortas de algodão e girassol, *in natura* e pré-tratadas, os valores de concentração de etanol (g/L) foram estequiometricamente superiores em relação à diferença da concentração de açúcares



redutores no início (após 24 horas de sacarificação) e após o processo fermentativo. Deste modo, pode-se afirmar que o processo de sacarificação prosseguiu além do período de 24 horas, ocorrendo simultaneamente ao processo fermentativo. Este fato também pode ser confirmado ao observar o aumento significativo da eficiência hidrolítica ocorrida no final do processo (*Eff*) quando comparada à eficiência hidrolítica após 24 horas de sacarificação (*Eff* 24h) (Tabela 1).

Considerando ainda os valores de eficiência hidrolítica no final da SSF (*Eff*) nota-se que os melhores resultados foram observados no processo com uso da torta de girassol *in natura*. Tendo em vista que esta biomassa é constituída por teores similares de celulose ($23,22\% \pm 0,30\%$) e hemicelulose ($20,55\% \pm 1,22\%$), pode-se inferir que a utilização do extrato enzimático EC-AN1257 mostrou-se adequada para sacarificação de ambos polissacarídeos.

Vale a pena destacar que nos processos de SSF das tortas de algodão e girassol pré-tratadas houve praticamente a conversão total dos açúcares redutores disponíveis a etanol. Tendo em vista que tais açúcares redutores eram constituídos majoritariamente de glicose, a linhagem de *S. cerevisiae* utilizada foi adequada para fermentar os açúcares presentes no hidrolisado. Já no final dos processos de SSF das tortas de algodão e girassol *in natura* restaram quantidades significativas de açúcares redutores, os quais provavelmente são constituídos por açúcares liberados da hidrólise da hemicelulose. A linhagem de *S. cerevisiae* utilizada foi adequada para fermentar parcialmente os açúcares presentes nestes hidrolisados, no entanto, o uso de micro-organismos fermentadores de pentoses e hexoses ou o emprego de co-cultura poderia melhorar significativamente a eficiência do sistema.

Relacionando as concentrações de etanol provenientes das SSF, os valores das razões S/L e as massas de torta utilizadas foi possível observar que o maior valor de produção de etanol, 16 g por 100 g de torta, foi no processo com uso da torta de girassol pré-tratada. No processo com uso da torta de girassol *in natura* houve a produção de 13,7 g de etanol por 100 g de torta. Já nas SSF das tortas de algodão *in natura* e pré-tratada foram observados valores de 8,2 g e 9,4 g de etanol por 100 g de torta de algodão e girassol, respectivamente. Tais valores não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$), portanto, pode-se afirmar que na SSF da torta de algodão o processo de pré-tratamento ácido não se mostrou necessário. Considerando que etapas de pré-tratamentos podem apresentar custos elevados, a utilização de tortas não tratadas constitui-se em uma atraente estratégia para diminuição de custos do processo de sacarificação.

Sob o ponto de vista dos resultados supracitados é possível projetar produções de 174 e 203 litros de etanol por tonelada de torta de girassol *in natura* e pré-tratada, respectivamente. Já nos processos de SSF das tortas de algodão *in natura* e pré-tratada projeta-se, respectivamente, a produção de 104 e 120 litros de etanol por tonelada de biomassa. Com relação as tortas *in natura*, ao considerar a possibilidade de uso de fermentadores de pentoses e hexoses ou co-cultura, o que possibilitaria uma conversão adicional dos açúcares redutores disponíveis no final da SSF, seria possível aumentar a projeção de 104 litros para 160 litros de etanol por tonelada de torta de algodão *in natura* e de 174 para 233 litros por tonelada de torta de girassol *in natura*. É válido ressaltar que os valores de produção de etanol a partir das biomassas avaliadas neste estudo foram superiores aos obtidos na utilização de cana de açúcar (70 L.ton^{-1}) (GOLDEMBERG; GUARDABASSI, 2010).

Deve-se salientar que uma das potenciais aplicações do algodão e girassol tem sido na produção de óleo destinado à produção de biodiesel. Ao considerar que a extração de uma tonelada de óleo de girassol gera cerca de duas toneladas de torta (BERGMANN et al., 2013), pode-se inferir que a produção de etanol utilizando essa quantidade de torta seria de 344 litros. Já a produção de etanol de torta de caroço de algodão seria de 416 litros para cada



tonelada de óleo produzido, tendo em vista que para a extração de uma tonelada de óleo é gerado 4 toneladas de torta (BERGMANN et al., 2013). Com base nestas projeções e considerando que a demanda estequiométrica de etanol para produção de biodiesel por transesterificação é de aproximadamente 200 litros por tonelada de óleo (VISSER et al., 2011) pode-se afirmar que os processos de SSF das tortas de girassol e algodão empregados neste trabalho teriam a capacidade de suprir a totalidade da demanda de álcool utilizado na rota de produção de biodiesel etílico.

4 Conclusão

O extrato enzimático produzido neste trabalho, EC-AN1257, demonstrou ser eficaz nos processos de sacarificação e fermentação simultânea das tortas de algodão e girassol *in natura* e pré-tratadas. O uso destas biomassas levou a produção de quantidades expressivas de etanol de 2ª geração, possibilitando uma alternativa atraente para agregar valores a coprodutos de baixo custo. Além do mais, os valores de etanol obtidos a partir de tortas de girassol e algodão demonstraram ser capazes de atender a demanda de álcool nas próprias usinas de biodiesel, podendo ser incorporada à cadeia produtiva como forma de agregar valor a um coproduto abundante.

5 Referências

- BAILEY, M.J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol**, v. 23, p. 257–270, 1992.
- BERGMANN, J.C.; TUPINAMBA, D.D.; COSTA, O.Y.A.; ALMEIDA, J.R.M.; BARRETO, C.C.; QUIRINO, B.F. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 411–420, 2013.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- FOCKINK, D.H.; MACENO, M.A.C.; RAMOS, L.P. Production of cellulosic ethanol from cotton processing residues after pretreatment with dilute sodium hydroxide and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 91–96, 2015.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987.
- GOLDEMBERG, J.; GUARDABASSI, P., The potential for first-generation ethanol production from sugarcane. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, p. 17-24, 2010.
- KUMARI, R., PRAMANIK, K. Improved bioethanol production using fusants of *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeasts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 873–884, 2012.
- LLOYD, J. B.; WHELAN, W. J. An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. **Analytical Biochemistry**, v.30, p.467-470, 1969.
- MANDELS, M.; STERNBERG D. Recent advances in cellulase technology. **J Ferment Technol**, v. 54, p. 267-286, 1976.



McINTOSH, S.; VANCOR, T.; PALMER, J.; MORRIS, S. Ethanol production from cotton gin trash using optimised dilute acid pretreatment and whole slurry fermentation processes. **Bioresource Technology**, v.173, 42–51, 2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, p.426-428, 1959.

PILONE, G. J. Determination of ethanol in wine by titrimetric and spectrophotometric dichromate methods: collaborative study. **J Assoc Off Anal Chem.**, vol. 68, p. 188-190, 1985.

SANTOS, R.S. **Produção de hidrolases holocelulolíticas por fermentação em estado sólido com uso de fungos filamentosos coprodutos da agroindústria de óleos vegetais como fonte de carbono.** Tese (doutorado) do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, 2015.

TELLI-OKUR, M.; EKEN-SARAÇOĞLU, N. Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2162–2169, 2008.

VIKARI, L.; VEHMAANPERA, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry, **Biomass and Bioenergy**, p. 1-12, 2012.

VISSER, E. M.; OLIVEIRA FILHO, D.; MARTINS, M. A.; STEWARD, B. L. Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 489-494, 2011.