

VALQUÍRIA JÚNIA CAMPOS

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE LEVEDURAS FERMENTADORAS  
DE XILOSE**

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

C198c  
2015 Campos, Valquíria Júnia, 1988-  
Caracterização fisiológica de leveduras fermentadoras de  
xilose / Valquíria Júnia Campos. – Viçosa, MG, 2015.  
viii, 38f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.34-38.

1. Biocombustíveis. 2. Leveduras (Fungos). 3. Fermentação.  
4. Pentoses. 5. Hemicelulose. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de  
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.562

VALQUÍRIA JÚNIA CAMPOS

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE LEVEDURAS FERMENTADORAS  
DE XILOSE**

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: 23 de Julho de 2015.

---

Marliane de Cássia Soares da Silva

---

Carlos Joulbert Alves de Souza

---

Luciano Gomes Fietto  
(Orientador)

Aos meus pais Antônio e Maria.

Aos meus irmãos e ao meu marido e companheiro Luciano.

DEDICO.

*“Ensinar não é transferir conhecimento,  
mas criar as possibilidades para a sua própria produção  
ou a sua construção.”*

Paulo Freire

## AGRADECIMENTOS

A CAPES, CNPq, FAPEMIG e FINEP pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À Deus, pela saúde, pela esperança e por sempre guiar meus passos ao longo desta trajetória.

À Universidade Federal de Viçosa e ao departamento de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade.

Ao programa de Pós Graduação em Bioquímica pelo acolhimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

À minha mãe Maria (minha flor) pela alegria e ao papai Antônio pela motivação imensurável.

Aos meus irmãos Edson, Lúcia, Shirley, pelo apoio, e de forma muito especial agradeço ao meu irmão Iander (nego) pelo incentivo incansável e a minha tão amada irmã Síria, simplesmente por tudo, pelo apoio, incentivo, amizade e por cuidar sempre de mim.

Ao meu marido Luciano, pelo apoio, motivação, por ser sempre um companheiro e pela compreensão.

Ao Professor Dr. Luciano Gomes Fietto, pela orientação, entusiasmo e compreensão.

À Lilian e ao Gabriel por estarem sempre dispostos a ajudar nos experimentos.

Ao Dr. Carlos Joubert por estar sempre disponível à ajudar, com críticas e sugestões para aprimoramento do trabalho e pela presença na banca.

Ao Professor Dr. Antônio Galvão, pelos ensinamentos nas disciplinas e por aceitar fazer parte da banca avaliadora.

Ao Professor Daniel Bonoto pela capacitação para manipular o HPLC, meu muito obrigada, seus ensinamentos foram cruciais para meu crescimento profissional.

Ao Hugo e Fernando do laboratório de Fisiologia de Microrganismo pela disponibilidade constante em ajudar.

Ao Professor Dr. Carlos Augusto Rosa por ceder as linhagens isoladas para realizarmos este trabalho.

À família do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM ♡): Sil, Líli, Vanessa, Murilo, Dani Mendes, Ananda, Amanda, Paty, Carlos, Gabriel, Raphael, Mary, Gilza, Mônica, Aninha, aos professores Luciano e Andreia e ao secretário da pós graduação em bioquímica agrícola Eduardo, por tornarem os dias em Viçosa mais alegres.

Aos amigos da Pós Graduação em Microbiologia Agrícola (BARRA PESADA), Jhonatan (Jony), Flávia (cozinha), Vanessa, Cleri, Laiane, Fer, Breno, Max e Conrado pela parceria incrível.

Aos amigos que estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis desta trajetória, Breno, Ronaldo, Sil e de forma muito especial ao Conrado (minha família de Viçosa).

Ao amigo de graduação, meu pelanca favorito, o Ronaldoooo, obrigada por tudo meu amigo, você é meu irmão de coração, estarei sempre ao seu lado para o que precisar.

Aos demais amigos que também sempre me apoiaram e incentivaram, Danuza, Erick, Dri, Paulo Victor, Maísa e Flávia.

## **BIOGRAFIA**

VALQUÍRIA JÚNIA CAMPOS é filha de Maria das Graças P. Campos e Antônio Pierandrei Campos, brasileira, nascida em Ubá, Minas Gerais. Formada em licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Minas Gerais. Em agosto de 2013 ingressou como discente de mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa com conclusão em 23 de julho de 2015.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Contexto energético.....	2
2.2 Biomassa lignocelulósica .....	4
2.3 Etapas de produção de etanol de segunda geração .....	5
2.4 Tolerância a inibidores e temperatura .....	7
2.5 Metabolismo de xilose.....	7
2.6 Leveduras fermentadoras de xilose .....	10
3. OBJETIVO GERAL .....	12
3.1 Objetivos específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
4.1 Microrganismos e meio de cultivo .....	13
4.2 Ensaios de fermentação e avaliação do crescimento.....	13
4.3 Matéria prima .....	14
4.4 Parâmetros fermentativos .....	14
4.5 Relação entre absorvância a 600 nm (A600) e massa celular seca (g/L) .....	15
4.6 Métodos Analíticos.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5.1 Fermentação em diferentes concentrações de xilose.....	17
5.2 Fermentação em diferentes temperaturas .....	22
5.3 Cofermentação de glicose e xilose .....	27
5.4 Avaliação do crescimento na presença de inibidores .....	31
6. CONCLUSÕES .....	33
7. REFERÊNCIAS.....	34

## RESUMO

CAMPOS, Valquíria Júnia. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Caracterização Fisiológica de Leveduras Fermentadoras de xilose.** Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Wendel Batista da Silveira.

A produção economicamente viável de etanol de segunda geração, depende principalmente de microrganismos capazes de fermentar a xilose, sendo o principal açúcar presente na fração hemicelulósica. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, não pode utilizar a xilose, uma vez que não possui transportador específico e os genes do metabolismo são expressos em baixos níveis. Neste sentido, as leveduras *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora passalidarum* e *Sheffersomyces stipitis*, tornam-se promissoras para a fermentação industrial de hidrolisados lignocelulósicos, por naturalmente converterem de maneira eficiente xilose em etanol. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar fisiologicamente essas linhagens e definir as melhores condições de fermentação. Foi realizado experimentos de fermentação em batelada com diferentes concentrações de xilose (4, 8 e 10%) e temperaturas (28, 32 e 35 °C). Posteriormente as melhores condições desta etapa para cada levedura, foram avaliadas em cofermentação com glicose (2 e 4%). O processo fermentativo foi realizado durante 70 horas, e amostras da cultura foram recolhidas para avaliação dos parâmetros cinéticos e fermentativos. Todas as leveduras crescem com velocidades similares em diferentes concentrações de açúcar, mostrando a tolerância a altas concentrações de xilose. Em relação às diferentes temperaturas avaliadas, *S. arborariae*, *S. passalidarum* e *S. stipitis* apresentam um bom crescimento em uma faixa de temperatura de 28 a 35°C. Ao avaliar o rendimento de etanol, *S. arborariae* apresentou o maior rendimento em 10% de xilose na temperatura de 28°C (27,6 g/L), *S. passalidarum* e *S. stipitis* apresentaram maior rendimento em 10% de xilose em 32°C (38,4 g/L e 37,8 g/L, respectivamente). Nos ensaios de cofermentação, estas leveduras consomem preferencialmente a glicose. A viabilidade celular não foi alterada durante as 70 horas de fermentação. A adição de HMF não representou efeito inibitório no crescimento destas leveduras, o furfural inibiu apenas o crescimento de *S. arborariae*, enquanto o ácido acético apresentou efeito inibitório para todas as leveduras. *S. passalidarum* cresceu em 6% de etanol, enquanto as demais não. *S. passalidarum* demonstrou ser promissora para a produção de etanol por produzir as maiores concentrações em um período curto de tempo e baixos rendimentos de xilitol e glicerol, em todas as condições avaliadas e por ser mais tolerante aos inibidores.

## ABSTRACT

CAMPOS, Valquíria Júnia. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Physiological characterization of xylose-fermenting yeasts.** Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co-advisers: Hilário Cuquetto Mantovani and Wendel Batista da Silveira.

The economically viable production of second generation ethanol depends mainly on the ability of microorganisms to ferment xylose, the main sugar present in the hemicellulose fraction. *Saccharomyces cerevisiae* cannot utilize xylose since it does not have any specific carrier, and the genes of xylose metabolism are expressed at low levels. In this regard, the yeasts *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora passalidarum* and *Sheffersomyces stipitis* have been considered promising for industrial fermentation of lignocellulosic hydrolysates because they naturally convert xylose to ethanol efficiently. This study aimed to physiologically characterize these lines and set the best conditions for fermentation. Fermentation was performed in batch experiments with different xylose concentrations (4, 8 and 10%) and temperatures (28, 32 and 35 ° C). Then, the best conditions for each one of the yeasts were evaluated in co-fermentation with glucose (2 and 4%). The fermentation process was carried out for 70 hours and culture samples were collected for further evaluation of kinetic and fermentation parameters. All yeast strains grown at similar rates in the different sugar concentrations tested, showing tolerance to high concentrations of xylose. *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora passalidarum* and *Sheffersomyces stipitis* had important development at 28 - 35 °C temperature range. To assess ethanol yield, *S. arborariae* showed the highest rate in 10% xylose concentration at 28 °C (27.6 g/L), while *S. passalidarum* and *S. stipitis* showed the highest yields in 10% xylose treatment, but at 32 °C (38.4 g/L and 37.8g/L, respectively). In the co-fermentation assays, these yeasts preferentially consume glucose. Cell viability was not affected during the 70 hour fermentations. The addition of 5-hydroxymethylfurfural did not present inhibitory effect on the yeasts development; furfural only inhibited *S. arborariae* growth, and acetic acid showed inhibitory effects in all yeasts. *S. passalidarum* grew in 6% ethanol, while the others did not. *S. passalidarum* showed to be promising for ethanol production because it had the highest ethanol concentration rates in a short period of time, showed low yields of xylitol and glycerol in all tested conditions, and proved to be more tolerant to inhibitors.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas ocorreu uma crescente preocupação em substituir o uso de combustíveis fósseis por fontes renováveis de energia, em especial a substituição da gasolina pelo etanol. No Brasil, o etanol é produzido principalmente a partir do caldo da cana de açúcar. Neste processo, uma elevada quantidade de bagaço é gerado e pode ser utilizado como uma fonte alternativa de energia (Soccol, et al., 2010).

Atualmente a indústria sucroalcoeira queima o bagaço para gerar energia elétrica, mas mesmo assim uma grande parte desta biomassa é acumulada nos pátios das usinas. O bagaço de cana é rico em celulose e hemicelulose, que podem ser convertidos em hexoses e pentoses, e conseqüentemente em etanol utilizando microrganismos fermentadores (Canilha, et al., 2012).

Segundo da Cunha-Pereira e colaboradores, (2011), um dos maiores desafios para a produção de etanol de segunda geração é a conversão microbiana de pentoses, que representam de 25-40% dos açúcares totais da biomassa lignocelulósica, sendo a xilose o principal monossacarídeo liberado a partir de hidrolisados. Linhagens do tipo selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* extensivamente utilizadas para a produção de etanol de sacarose não fermentam pentoses. *S. cerevisiae* não pode utilizar xilose, uma vez que, não possui um transportador específico para esse açúcar e os genes do metabolismo de xilose são expressos em baixos níveis.

Desta forma, para a produção de etanol a partir da biomassa ser uma alternativa viável, são necessários estudos sobre microrganismos que naturalmente fermentam xilose. As leveduras *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum*, demonstraram que podem converter xilose em etanol, sendo então consideradas promissoras para a fermentação industrial de hidrolisados lignocelulósicos (Agbogbo, et al., 2006; da Cunha-Pereira, et al., 2011; Hou, 2012). Neste sentido, espécies de leveduras fermentadoras de xilose foram caracterizadas fisiologicamente quanto a capacidade de fermentar em diferentes temperaturas, concentrações de xilose, presença e ausência de glicose, tolerância a inibidores e tolerância ao etanol.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Contexto energético

Desde o século XX, o setor petroquímico tem impulsionado o desenvolvimento industrial e social, até então tem assegurado a disponibilidade de matéria prima para a indústria, combustíveis para transporte e geração de energia (Souza, 2011). No entanto, combustíveis fósseis não são renováveis e o processo de formação deste recurso é lento, oposto a capacidade de exploração pela humanidade.

Além das reservas de combustíveis fósseis serem esgotáveis, nos últimos anos estão sendo exauridas. Além disso, o uso excessivo de produtos obtidos a partir do refino do petróleo tem causado problemas ambientais devido à emissão de gases que causam o agravamento do efeito estufa na atmosfera.

Os combustíveis fósseis representam uma grande fração do consumo de energia primária (88%), sendo o petróleo (35%), o carvão (29%) e o gás natural (24%), as principais fontes utilizadas (Brennan & Owende, 2010). Uma alternativa promissora para garantir a produção de combustíveis e insumos químicos de forma sustentável é o estabelecimento de biorrefinaria, a figura 1 demonstra o esquema de instalação de biorrefinaria (Taylor, 2008; Demirbas, Balat, & Balat, 2009; Menon & Rao, 2012).

Atualmente há ímpeto global para o desenvolvimento de biorrefinarias para a produção de bioenergia e compostos de base biológica comercializáveis, tendo como matéria prima resíduos industriais, rurais e urbanos. O conceito de biorrefinaria tem sido identificada como uma oportunidade significativa para o desenvolvimento econômico (Leistriz, et al., 2008; Charlton, et al., 2009; Sharma, et al., 2011).

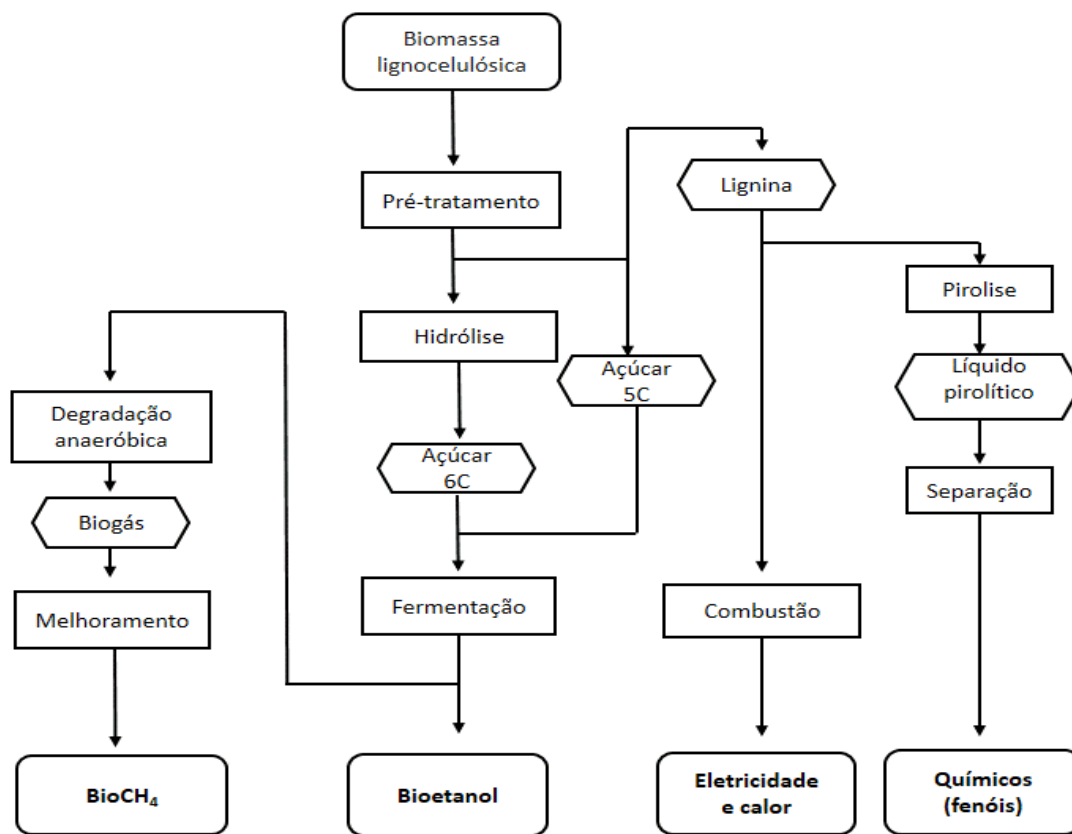


Figura 1: Esquema simplificado do processo de funcionamento de biorrefinaria, adaptado de: (Cherubini & Ulgiati, 2010).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014), a cana-de-açúcar é uma das principais culturas produzidas no Brasil, estima-se que a safra 2014-2015 seja de 659,10 milhões de toneladas. Aproximadamente 270/280 Kg de bagaço e 140 Kg de palha de cana de açúcar são gerados a cada tonelada de cana de açúcar processada na indústria sucroalcoeira (Rodrigues, et al., 2003; CENBIO, 2003), desta forma, pode-se estimar que a safra 2014/2015 irá gerar aproximadamente 181 milhões de toneladas de bagaço e aproximadamente 92 milhões de toneladas de palha.

Segundo Soccol, et al., (2010), 6.000 litros de etanol são produzidos por hectare de cana de açúcar. A indústria sucroalcoeira utiliza 92% do bagaço gerado para produção de energia, se a fração de 8% restante for convertido em etanol, haveria um acréscimo de aproximadamente 2.000 litros de etanol por hectare, conseqüentemente, podendo reduzir o uso da área cultivada em 29%. Para a indústria é necessário gerar energia, no entanto, se utilizar a palha da cana para esta finalidade e converter 50% do bagaço em etanol de segunda geração haveria um acréscimo de aproximadamente 4.000 litros por hectare, totalizando assim 10.000 litros de etanol por hectare de cana plantada.

Para que hoje o aumento na produção de etanol seja significativo, sem aumentar a área de plantio, tecnologias devem ser desenvolvidas para converter os polissacarídeos presente nas folhas, palhas e no bagaço em etanol (Soccol, et al., 2010).

## **2.2 Biomassa lignocelulósica**

As principais biomassas utilizadas para a produção de etanol são monoculturas cultivadas sem solos férteis (como cana de açúcar, milho, soja, colza, gramíneas e álamo híbrido), resíduos de biomassa (como a palha de milho, bagaço de cana de açúcar e resíduos de madeira) e resíduos sólidos urbanos (tais como papel processado e jornal) (Chandel & Singh, 2011).

A biomassa lignocelulósica tem como principal constituinte a celulose, aproximadamente 45%, um polímero linear composto de subunidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$ . Este polímero é associado a lignina, hemicelulose, amido, proteínas e minerais (Rocha, et al., 2012).

A hemicelulose, é o segundo constituinte mais abundante, aproximadamente 27%, sendo um polímeros heterogêneo constituído de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos de açúcares. Ao contrário de celulose, a hemicelulose não é quimicamente homogênea, podendo variar de acordo com tipo biomassa. No entanto, o principal constituinte é a xilana, e em muitos materiais vegetais são heteropolissacarídeos com cadeias homopoliméricas de unidades de  $\beta$ -D-xilopirranose por ligação 1,4 (Figura 2). Além xilose, xilanas podem conter, arabinose, ácido glucurônico ou éter 4-O-metil, ácido acético, e ácidos p-comércio (Lachke, 2002; Saha, 2003). A lignina, que constitui aproximadamente 21% em peso da biomassa seca, é um polímero aromático contendo resíduos fenólicos, a fração lignina, não contribui como fonte de carbono fermentável, e é uma fonte potencial de inibidores da fermentação microbiana (Souza, 2011).

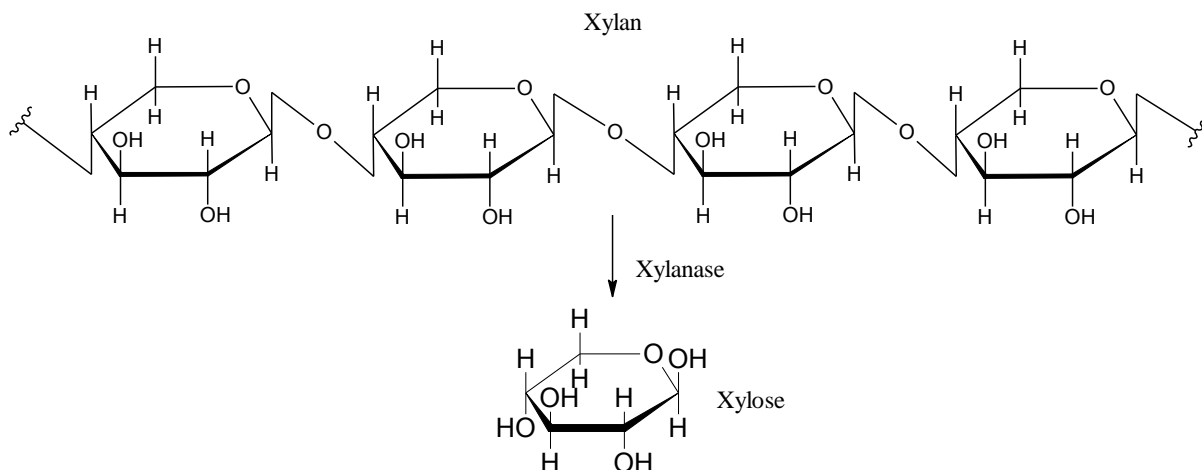


Figura 2: Estrutura de xilana. Realizada no programa ChemSketch, o símbolo nas extremidades da cadeia chamam-se Broken Bond (ligação partida ou quebrada).

### 2.3 Etapas de produção de etanol de segunda geração

Segundo Himmel, et al., (2007), a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica não é economicamente viável, pois, é um material recalcitrante que requer um trabalho intensivo e alto custo de capital para processamento. No entanto, avanços tecnológicos tem sido obtidos viabilizando a produção de biocombustíveis. A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica exigem quatro etapas: pré-tratamento, a hidrólise, fermentação e recuperação do produto.

O pré-tratamento modifica a estrutura da biomassa lignocelulósica de forma que a celulose se torne acessível à ação enzimática, (Figura 3) que convertem os polímeros de carboidratos em açúcares fermentáveis. Os tipos de pré-tratamentos podem ser classificados em físicos, químicos, biológicos e físico-químicos. Os processos de pré-tratamento podem gerar substâncias tóxicas, como ácido acético, furfural, hidroximetil furfural e componentes fenólicos. Estes inibidores podem afetar tanto a etapa de hidrólise quanto a fermentação do processo (Kim, et al., 2013).

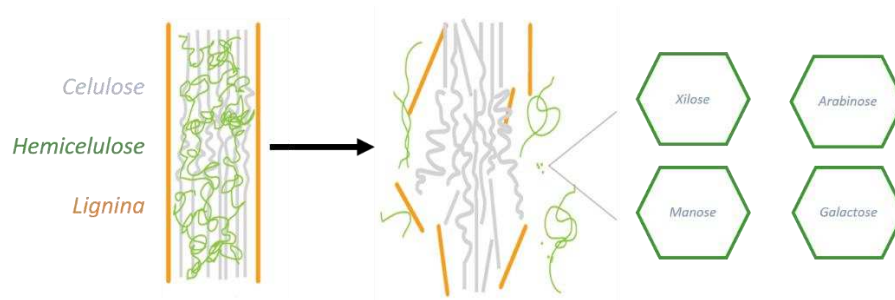


Figura 3. Pré-tratamento da cana-de-açúcar e a liberação dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina. Fonte: BIOFUELS, BIOFUELS. "biofuels" (2012).

Atualmente o pré-tratamento com tendências a ser mais utilizado é o hidrotérmico, uma vez que apresenta vantagens ambientais e econômicas, pelo fato de não haver necessidade de utilizar produtos químicos. Outra vantagem deste método é o fato de grande parte da fração hemicelulósica ser hidrolisada, ou seja, convertida em açúcares fermentáveis (Garrote, et al., 1999). A hidrólise da celulose ocorre por tratamento enzimático, liberando unidades de glicose a ser assimilada pela levedura na etapa de fermentação.

Para simplificar e reduzir custos no processo de produção de etanol de segunda geração, a integração de etapas como a sacarificação e fermentação simultânea (SSF) da matéria-prima lignocelulósica pré-tratada tem sido considerada uma boa alternativa. Oferecendo vantagens sobre a hidrólise e fermentação separada (SHF), este fato inclui melhor rendimento do etanol, uma vez que, diminui a inibição de hidrólise da celulose pelo produto final, uma vez que o microrganismo pode utilizar os açúcares para o crescimento e para produção de etanol à medida que são formadas (Saha, et al., 2011).

No processo de produção de etanol a partir do caldo da cana de açúcar, a levedura *S. cerevisiae* é a mais utilizada, uma vez que é capaz de fermentar sacarose de forma rápida e eficiente. No entanto, quando se trata de produção de etanol de segunda geração, sobre hidrolisados que contém hexoses e não é eficiente em fermentar pentoses (Cunha-Pereira, 2010).

Entre as leveduras que convertem xilose e glicose à etanol as linhagens *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum*, são consideradas promissoras para a fermentação industrial de hidrolisados lignocelulósicos (Agbogbo, et al., 2006; Cadete, et al., 2009, 2012, 2013; Hickert, et al., 2013; Hou & Yao, 2012).

## **2.4 Tolerância a inibidores e temperatura**

Os compostos, 2-furaldeído (furfural) e o 5-hidroxiometil-2-furaldeído (5-hidroxiometilfurfural, HMF) são produzidos durante o pré-tratamento da biomassa pela desidratação de pentoses e hexoses açúcares, respectivamente. Podem apresentar efeito inibitório no crescimento dos microrganismos fermentativos, danificando as paredes e membranas celulares, inibem o crescimento celular, reduzem atividades enzimáticas, causam danos ao DNA, inibem a síntese de proteínas e RNA, e reduzem a produção de etanol (Liu et al., 2004; Van Maris et al., 2006; Liu et al., 2009; Jönsson et al., 2013).

Segundo Liu (2004), ambos os compostos atuam inibindo o crescimento de leveduras, incluindo linhagens de aplicação industrial, tornando necessário tratamentos adicionais, como a detoxificação, adicionando complexidade e custo ao processo. Portanto, avaliar a tolerância a estes inibidores por leveduras que naturalmente fermentam xilose e analisar a expressão de genes relacionados a tolerância, é uma alternativa ao processo de detoxificação (Wahlbom & Hahn-Hagerdal, 2001).

O ácido acético é formado principalmente por hidrólise de grupos acetil de hemicelulose, apresentando efeito tóxico sobre *S. cerevisiae* devido à forma não dissociada e aumentos na ordem de ácidos (ácido acético < ácido levulínico < ácido fórmico) (Jönsson et al., 2013).

Segundo Birch & Walker (2000), mesmo em concentrações baixas o etanol é um inibidor do crescimento de leveduras, impedindo a divisão celular e conseqüentemente a velocidade específica de crescimento, em altas concentrações atua reduzindo a viabilidade celular. O principal alvo do etanol é a membrana celular e algumas proteínas (Walker, 1998), aumenta a fluidez da membrana e conseqüente diminuição da sua integridade (Mishra e Prasad, 1989). A diminuição da disponibilidade de água, devido à presença do etanol causa a inibição de enzimas chaves na via glicolítica e essas proteínas podem ser desnaturadas (Hallsworth, 1998).

## **2.5 Metabolismo de xilose**

Para a produção de etanol de segunda geração, a partir de materiais lignocelulósicos, a hidrólise da hemicelulose gera quantidades substanciais de pentoses, principalmente xilose, que não podem ser fermentados pelo tipo selvagem *S. cerevisiae* (Van Maris et al., 2006).

Portanto, a geração de bioetanol a partir de biomassa, por microrganismos fermentadores depende da eficiente metabolização de xilose. Dessa forma, para aplicação biotecnológica é importante o estudo de leveduras capazes de assimilar esta pentose, e converter este açúcar em etanol e a outros produtos de interesse industrial.

O transporte da xilose para o citoplasma celular é a primeira etapa do metabolismo deste monossacarídeo. De acordo com estudos realizados com leveduras que naturalmente assimilam e fermentam xilose, foi possível verificar que existem dois sistemas de transporte deste açúcar: um sistema de difusão facilitada de baixa afinidade, que é compartilhado por glicose e impulsionado apenas pelo gradiente de açúcar, e um sistema de simporte de prótons de alta afinidade (Hahn-Hägerdal, et al., 2007; Kilian & Uden, 1988; Hamacher, et al., 2002; Chu & Lee, 2007; Young et al., 2010). Após ser transportada pelos sistemas de transporte, a xilose pode ser metabolizada pelas vias de assimilação (Hahn-Hägerdal, et al., 1994).

A primeira reação da via de metabolismo de xilose é catalisada pela enzima xilose redutase (XR), a qual reduz xilose em xilitol. A oxidação do xilitol à xilulose é catalisada pela enzima xilitol desidrogenase (XDH). Em leveduras e bactérias, o próximo passo é a fosforilação da xilulose pela enzima xilulocinase (XK) para formar xilulose-5-fosfato, que pode ser convertida, através da via das pentoses-fosfato, em gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato, os quais podem ser metabolizados na via glicolítica. A glicólise se conecta a outras vias, como o ciclo de Krebs e as reações de fermentação alcoólica (Hahn-Hägerdal, et al., 2007; Hou, 2012).

Uma via alternativa de conversão da xilose à xilulose em uma única reação pode ocorrer em bactérias e fungos anaeróbicos. Essa reação é catalisada pela enzima xilose isomerase (XI), sem que haja formação de xilitol. (Hahn-Hägerdal, et al., 2007; Madhava, et al., 2009; Hou, 2012). A figura 4 mostra as vias de assimilação das pentoses (via oxidorrredutiva e isomerase), D-xilose e L-arabinose, encontradas em fungos e bactérias (Chandel, et al., 2011).

Na via oxidorrredutiva, as duas primeiras enzimas possuem diferentes preferências de cofatores, provocando um desequilíbrio redox. A maioria das enzimas XR possuem dupla especificidade pelos cofatores, usando tanto NADPH e NADH, mas normalmente com preferência para NADPH. A maioria das enzimas XDHs utilizam  $\text{NAD}^+$  como co-fator (Hahn-Hägerdal, et al., 2007; Hou, 2012).

Dessa forma, a disponibilidade de oxigênio determina a mudança do fluxo de carbono da xilose dentro da célula. Em condições anaeróbicas, o cofator NADH não pode ser reoxidado de forma eficiente a  $\text{NAD}^+$  por meio da cadeia transportadora de elétrons, provocando um desequilíbrio dos cofatores NADH/ $\text{NAD}^+$ . Como consequência deste desequilíbrio ocorre o acúmulo e excreção do xilitol. Em baixa concentração de oxigênio durante a fermentação da xilose, o  $\text{NAD}^+$  é regenerado, através da cadeia transportadora de elétrons, evitando o acúmulo de xilitol e consequentemente o bloqueio do metabolismo de xilose (Hahn-Hägerdal, et al., 2007; Hou, 2012). Assim, em leveduras fermentadoras de xilose a produção de xilitol aumenta em condição de anaerobiose e a produção de etanol aumenta em condições de limitação de oxigênio.

Em aerobiose, não ocorre o desequilíbrio dos cofatores NADH/ $\text{NAD}^+$ , pois o oxigênio funciona como acceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons dessas leveduras, regenerando o  $\text{NAD}^+$ . Neste caso, o fluxo de carbono da xilose é direcionado para produção de energia e conversão em biomassa celular.

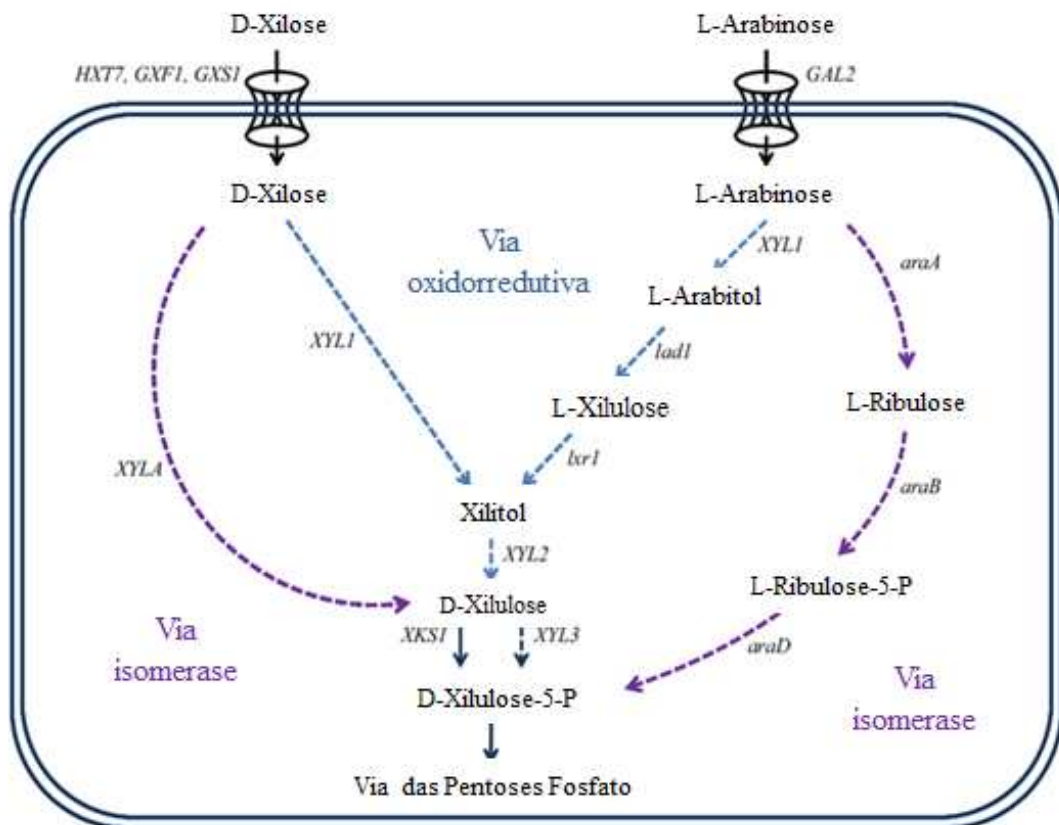


Figura 4: Representação esquemática do metabolismo das pentoses D-xilose e L-arabinose em leveduras e bactérias. Duas vias distintas de assimilação de xilose são apresentadas: a via Oxidorredutiva, comum em leveduras, e via isomerase, encontrada em bactérias. Fonte: Chandell, et al., 2011.

## 2.6 Leveduras fermentadoras de xilose

A levedura *Spathaspora arborariae* (Figura 5), foi isolada a partir da madeira em decomposição coletada no Parque Nacional da Serra do Cipó e no Parque Estadual do Rio Doce, em Minas Gerais. Fermenta D-xilose de forma eficiente e está relacionada com *Cândida jeffriesii* e *Spathaspora passalidarum*. Semelhante a *S. passalidarum*, a *S. arborariae* produz asco não conjugado com um único ascósporo alongado. Em ensaios sob agitação (28°C e 160 rpm) verificou-se o crescimento celular e fermentação utilizando xilose e/ou glicose como substrato, observando que esta levedura assimila e fermenta D-xilose de forma eficiente. A estirpe apresentou uma curva de crescimento típica, em que o açúcar é eficientemente fermentado, e após seu esgotamento do meio que o etanol produzido começa a ser consumido e usado como uma fonte de carbono (Cadete et al., 2009).

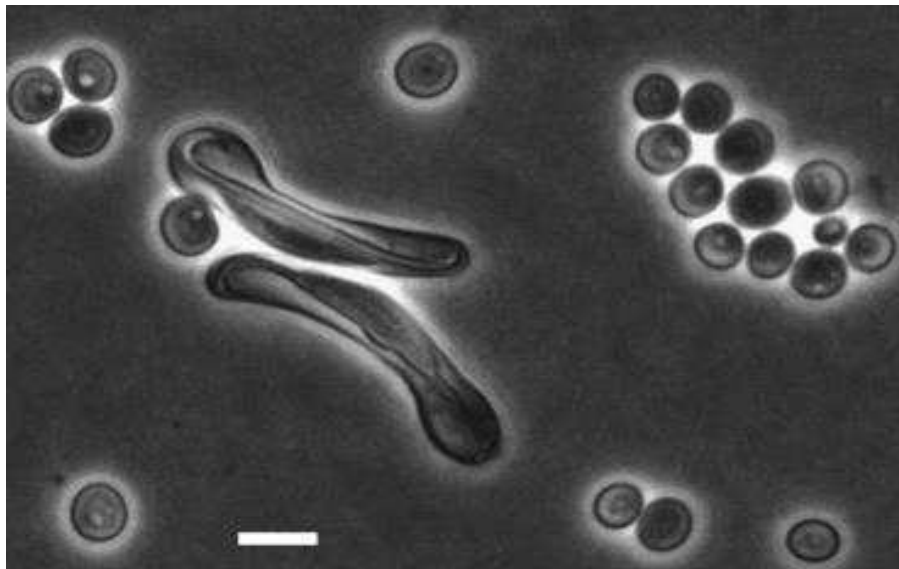


Figura 5: *Spathaspora arborariae*, ascos com único ascósporos. Fonte: Cadete, et al., 2009.

Estudos realizados demonstram que *S. arborariae* possui boas perspectivas para sua utilização na produção de etanol, uma vez que esta levedura é uma fermentadora de hexoses e pentoses, e também tolerante a inibidores gerados a partir da hidrólise da biomassa lignocelulósica (Cunha-Pereira, 2012; Cadete, et al., 2012; Hickert, et al., 2013).

Durante pesquisas realizadas por Nguyen, et al., (2006), com o objetivo de isolar leveduras do intestino de besouros que se alimentam de madeira, foram descobertas duas leveduras fermentadoras de xilose, entre elas a *Spathaspora passalidarum*, demonstrada na figura 6. Esta levedura também é considerada promissora para a fermentação industrial

de hidrolizados lignocelulósicos, devido sua capacidade de converter xilose em etanol com maior eficiência sob condições anaeróbicas. Isso ocorre devido a preferência do cofator NADH pela enzima xilose redutase e  $\text{NAD}^+$  pela xilitol desidrogenase, havendo, portanto, um equilíbrio entre a oferta e procura dos cofatores (Hou, 2012).

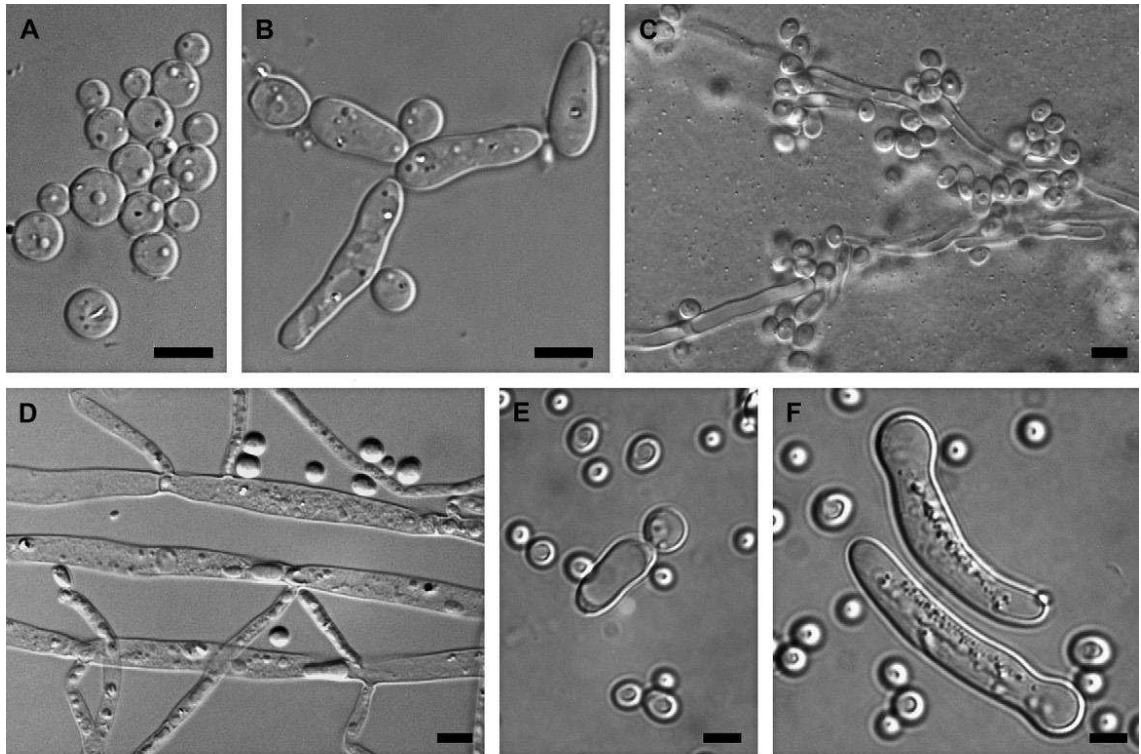


Figura 6: *S. passalidarum* NRRL Y-27907, isoladas de besouros que realizam perfuração de madeira. A) Brotamento das células; B) Células vegetativas e alongadas; C) Pseudo hifas; D) Hifas septadas com células vegetativas; E) Célula se diferenciando em um asco; F) Asco sem ascósporos. Fonte adaptada: Nguyen, et al., 2006.

Estudos feitos por Long, et al., (2012) relevou a capacidade de cofermentação de açúcares presentes nas frações celulósicas e hemicelulósicas de hidrolizados lignocelulósico pela levedura *S. passalidarum*, confirmando seu potencial para bioconversão de materiais lignocelulósicos para a produção de bioetanol. Cadete (2012) também demonstrou o potencial de produção de etanol em materiais lignocelulósicos, bagaço de cana de açúcar.

A levedura *Sheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*), predominante haploide, pertencente ao filo ascomycota relaciona-se de forma endossimbiótica com o besouro *Odontotaenius disjunctus* que habita madeira em decomposição (Pignal, 1967; Suh, et al., 2003). É uma das poucas espécies de leveduras capazes de fermentar xilose à etanol sob condições anaeróbicas (Agbogbo & Coward-Kelly, 2008). Segundo Garcia (2012), esta

capacidade fermentativa é pelo fato da enzima xilose redutase utilizar ambos cofatores (NADH e NADPH). Outro fator que favorece a fermentação sobre condição anaeróbia, é a presença de um sistema respiratório oxidativo complexo na mitocôndria, que contém cadeias transportadoras de elétrons via citocromo e não-citocromo. A cadeia transportadora de elétrons não-citocromo é denominada SHAM (salicyl hydroxynamicacid) e gera um fator redox para superar o desequilíbrio dos cofatores. Desse modo, o uso de cofatores específicos juntamente com o equilíbrio redox resulta em baixa ou nenhuma produção de xilitol.

Devido a capacidade de fermentar xilose esta levedura tem recebido atenção em estudos e tem sido considerada promissora para a aplicação industrial, com rendimentos elevados de etanol (Agbogbo, et al., 2006).

Embora a literatura relate eficiência na produção de etanol por estas leveduras, estudos comparativos ou de avaliação das melhores condições de fermentação levando em consideração as características fisiológicas destas leveduras ainda não foram realizadas.

### **3. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar fisiologicamente linhagens de leveduras fermentadoras de xilose (*Scheffersomyces stipitis* NRRL 7124, *Spathaspora arborariae* HM 19.1A e *Spathaspora passalidarum* NRRLY 27907).

#### **3.1 Objetivos específicos**

Verificar a influência de concentrações de xilose (4, 8 e 10%) na biomassa celular, velocidade de crescimento, rendimento em etanol e viabilidade;

Verificar a influência da temperatura (28, 32 e 35 °C) na biomassa celular, velocidade de crescimento, rendimento em etanol e viabilidade;

Avaliar os parâmetros cinéticos de crescimento e fermentação em um processo de cofermentação de xilose e glicose;

Avaliar a influência de inibidores do crescimento microbiano: Furfural, 5-Hidroximetilfurfural, ácido acético e etanol.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos e meio de cultivo

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram *Scheffersomyces stipitis* NRRL 7124, *Spathaspora arborariae* HM 19.1A e *Spathaspora passalidarum* NRRLY 27907, disponibilizadas pelo professor Carlos Augusto Rosa do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras da UFMG. As mesmas foram mantidas em meio completo YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) com glicerol 30% (v/v) a -80 °C ou quando utilizadas com frequência, em placas de YPD sólido (2 % Agar) a 4 °C.

### 4.2 Ensaios de fermentação e avaliação do crescimento

Os ensaios de fermentação foram realizados em erlenmeyers de 125 ml em meio de cultivo contendo extrato levedura (5 g/L); peptona (5 g/L); NH<sub>4</sub>Cl (2 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/L); MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,3 g/L) e glicose e/ou xilose sob agitação a 120 rpm por 70 horas.

As cepas foram previamente crescidas em meio YP com 2% xilose, sob agitação de 120 rpm a 28 °C. A partir do pré-inóculo diluições foram realizadas de modo que a D.O<sub>(600nm)</sub> inicial de todas as cepas fosse 2. Cada linhagem foi inoculada em meio líquido de fermentação (4, 8 ou 10% xilose), obtendo um volume final de 50ml e cada ensaio foi realizado em triplicata. Os erlenmeyers foram incubados em agitador horizontal à 28 °C por 70 horas. Nos intervalos de 0, 3, 6, 9, 12, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 horas, alíquotas de 200 µl foram retiradas para avaliar a densidade óptica em espectrofotômetro à 600 nm, avaliar viabilidade celular por meio de diluição seriada e uma alíquota de 800 µl foi centrifugada à 10.000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi filtrado por membrana de 0,2 µm e posteriormente congelados para análise de xilose, xilitol, glicerol e etanol por high-performance liquid chromatography (HPLC).

A melhor condição de crescimento dos microrganismos (concentração de xilose) foi aplicado as temperaturas 28 °C, 32 °C e 35 °C a fim de verificar tolerância a estas temperaturas.

Uma vez estabelecida a melhor condição para fermentação (concentração de xilose e temperatura), ensaios de cofermentação foram realizados, adicionando-se glicose (2 ou 4%).

Os ensaios de tolerância a furfural, 5-hidroximetilfurfural (HMF) e ácido acético foram realizados na temperatura e concentração de xilose que as leveduras obtiveram melhor crescimento (*S. arborariae* 28 °C, *S. passalidarum* e *S. stipitis* a 32 °C, com 10%

de xilose em meio líquido). As concentrações de inibidores utilizados foram de acordo com as concentrações presentes no hidrolisado rico em xilose, nas concentrações de 2,5 g/L de furfural, 0,5 g/L de HMF e 3 g/L de ácido acético.

Para o teste de tolerância à etanol, as leveduras foram previamente crescidas em YP (2% de xilose), quando em fase log, a densidade óptica foi ajustada para 1, posteriormente foram realizadas diluições seriada na proporção, 1:1; 1:10; 1:100 e 10 µl da diluição foi inoculado em meio YP (2% de xilose e 2% de ágar) adicionado etanol nas concentrações 2, 4 e 6%.

### 4.3 Matéria prima

A matéria prima utilizada foi o bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), variedade RB86-7515. O pré-tratamento empregado foi o hidrotérmico, realizado em um reator à 190 °C por 18 minutos e 44 segundos. Após o pré tratamento a fração líquida foi coletada e caracterizada quanto a presença de açúcares e inibidores como furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético.

### 4.4 Parâmetros fermentativos

O rendimento em gramas de etanol por gramas de açúcar (xilose e/ou glicose) utilizada ( $Y_{P/S}$ ) foi calculado dividindo-se a diferença da massa final e inicial de etanol (g) pela massa inicial de açúcar (g) (Equação 1).

$$Y_{E/S} = \frac{\text{Massa final} - \text{massa inicial de etanol}}{\text{massa final de açúcar}} \quad (1)$$

O rendimento do produto por tempo ( $Q_P$  (g/L.h<sup>-1</sup>)) foi calculado dividindo-se a diferença da massa final e inicial de etanol pelo tempo em que houve a maior produção de massa de etanol (Equação 2).

$$Q_p = \frac{\text{Massa final} - \text{massa inicial de etanol}}{\text{tempo}} \quad (2)$$

A porcentagem do rendimento em gramas de etanol por gramas de substrato utilizado (Y%) foi calculado pela diferença entre o valor de  $Y_{P/S}$  encontrado nos

experimentos e o valor de  $Y_{P/S}$  teórico, multiplicado por 100 ( $Y\% = Y_{P/S} \text{ (real)} / Y_{P/S} \text{ (teórico)} \times 100$ ) (Equação 3).

$$Y\% = \frac{Y_P(\text{real})}{Y_P(\text{teórico})} \times 100 \quad (3)$$

Valores da velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) para cada espécie, foram calculados a partir da inclinação da reta do gráfico  $\ln_{DO\ 600\text{nm}}$  versus tempo durante a fase exponencial (log) de crescimento.

#### 4.5 Relação entre absorvância a 600 nm (A600) e massa celular seca (g/L)

As cepas de *S.stipitis* NRRL 7124, *S. arborariae* HM 19.1A e *S. passalidarum* NRRLY 27907 foram previamente crescidas em 40 mL de meio YP (2% xilose), sob agitação de 120 rpm a 28 °C por 16 horas. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (600nm) e diluições em solução salina NaCl 0,85% (p/v) para obtenção de  $DO_{600\text{nm}}$  0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0. As diluições foram centrifugadas a 5000 rpm por cinco minutos e lavadas novamente em solução salina. O procedimento de secagem foi realizado a 105 °C por 24 horas. Os cadinhos foram pesados em balança analítica até atingirem peso constante. Este experimento foi realizado em triplicata biológica e os dados obtidos foram a média entre as triplicatas. O resultado da análise foi expresso em massa celular seca (g/L). A regressão linear (equações 4, 5 e 6) entre peso celular seca (g/L) e  $D.O._{(600\text{nm})}$  permitiu a determinação da massa celular seca das leveduras *S. arborariae*, *S. passalidarum* e *S. stipitis*, respectivamente. Sendo  $Y = D.O._{(600\text{nm})}$  e  $X =$  massa seca (g/L).

$$Y = 4,5318 X - 0,0072$$
$$R2 = 0,9947 \quad (4)$$

$$Y = 2,8002 X + 0,054$$
$$R2 = 0,9932 \quad (5)$$

$$Y = 2,34 X + 0,0552$$
$$R2 = 0,9983 \quad (6)$$

#### **4.6 Métodos Analíticos**

A quantificação do consumo de açúcares (xilose e glicose) e a produção de metabólitos (etanol, xilitol e glicerol) foi determinado por high-performance liquid chromatography (HPLC), utilizando uma coluna de troca iônica Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8%) (Phenomenex), mantido a 45 °C. O eluente para separação foi solução de ácido sulfúrico 5 mM, aplicado a uma taxa de eluição 0.7 mL/min, a coluna foi acoplada ao detector de índice de refração SPD-20A.

Na montagem dos métodos foram preparados padrões de 3, 5, 10, 15, 25, 35, 45, 60, 75 e 100 mM para glicose, xilose, xilitol, glicerol e etanol. As amostras, quando necessário, foram diluídas. As concentrações determinadas permitiram calcular o consumo dos açúcares e produção de metabólitos ao longo do tempo de fermentação.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Fermentação em diferentes concentrações de xilose

A figura 7 mostra o crescimento das leveduras em diferentes concentrações de xilose (4%, 8% e 10%) em 28 °C. Os resultados obtidos mostram que independente da concentração de xilose a biomassa celular se mantém constante, no entanto, pode ser observado que a levedura *S. passalidarum* produziu maior biomassa quando comparada a *S. arborariae* e *S. stipitis*.

As leveduras do gênero *Spathaspora* apresentaram durante a fase log, nas diferentes concentrações de xilose, velocidades específicas de crescimento similares (*S. arborariae*  $\mu = 0,1002 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ ; *S. passalidarum*  $\mu = 0,1042 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ ), enquanto a levedura *S. stipitis* apresentou uma velocidade específica de crescimento média de  $0,087 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$  (Tabela 1). Todas as linhagens mantiveram a viabilidade celular durante as 70 horas do processo fermentativo (resultados não mostrados).

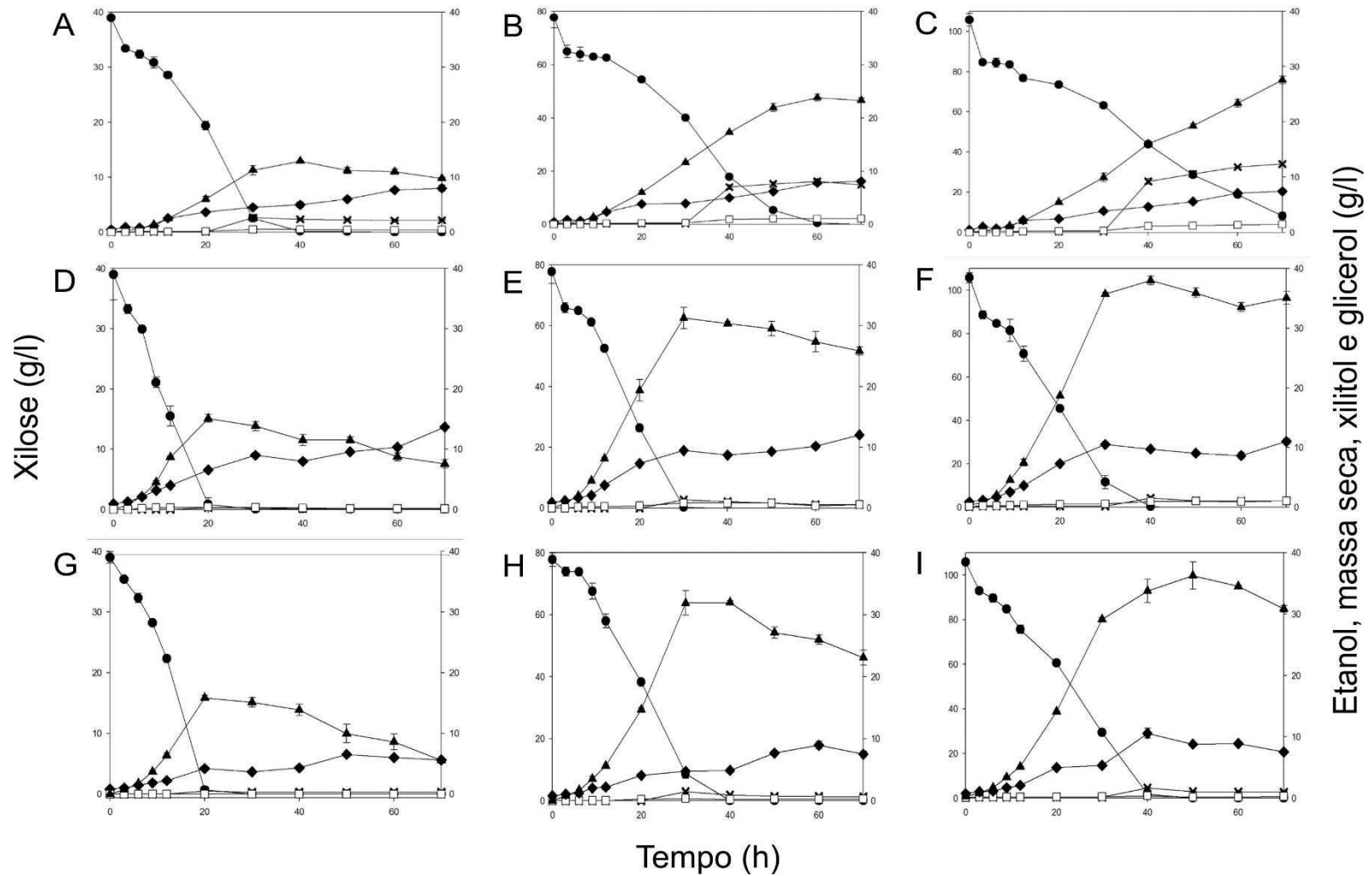


Figura 7: Cinética de fermentação em 28°C por *S. arborariae* (A, B e C), *S. passalidarum* (D, E e F) e *S. stipitis* (G, H e I) nas concentrações de 4, 8 e 10% de xilose. Sendo: Xilose (●); Etanol (▲); Massa Seca (◆); Glicerol (□); Xilitol (x).

Todas as leveduras produziram maior concentração de etanol em meio com 10% de xilose. O rendimento de etanol por xilose consumida ( $Y_{P/S}$ ) encontrado na concentração de 10% xilose, foram 0,32 g/g em *S. arborariae*, 0,42 g/g em *S. passalidarum* e 0,37 g/g *S. stipitis* (Tabela 1). O rendimento de etanol durante a fermentação de xilose descrito na literatura por essas leveduras, é variável e está relacionado as condições diversas de experimentos.

A levedura *S. passalidarum* obteve os maiores rendimentos de etanol em períodos mais curtos de tempo. O maior rendimento de etanol em 10% de xilose foi observado em 40 horas de fermentação ( $Y_{P/S}$  0,42 g/g), enquanto que em *S. arborariae* foi em 70 horas ( $Y_{P/S}$  0,32 g/g) e a *S. stipitis* em 50 horas obtendo rendimento de  $Y_{P/S}$  0,37 g/g. Em quase todos os experimentos as leveduras consumiram 100% da xilose presente no meio em período inferior à 70 horas, com exceção da *S. arborariae* que em 10% de xilose, consumiu aproximadamente 92% do açúcar (Figura 7 A-I).

Em relação ao consumo de açúcar, as leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis*, consomem mais rapidamente comparando a *S. arborariae*. O esgotamento de 4% de xilose ocorre após 40 horas de fermentação pela *S. arborariae* (Figura 7A), as demais leveduras consomem 100% do açúcar em 20 horas de fermentação (Figura 7 D e G). O mesmo pode ser observado nas demais concentrações de xilose, sendo o consumo completo de 8% para *S. arborariae* ocorre em 60 horas (Figura 7 B), em *S. passalidarum* em 30 horas e *S. stipitis* em 40 horas (Figura 7 E e H). Em meio contendo 10% xilose, a levedura *S. arborariae* consome aproximadamente 92% da xilose durante a fermentação (Figura 7 C), enquanto nas demais ocorre o completo consumo de xilose em 40 horas (Figura 7 F e I).

No presente trabalho, foi possível observar que todas as leveduras apresentaram curva típica de crescimento, após o esgotamento do açúcar ocorreu redução da concentração de etanol. Este comportamento também foi relatado para essas leveduras em estudos utilizando meio sintético e/ou hidrolisados lignocelulósicos (Cadete et al., 2009; Cunha-Pereira et al., 2011).

O principal produto obtido nestes ensaios de fermentação foi o etanol, e em menores concentrações co-produtos como o xilitol e o glicerol. Sendo o glicerol em baixas concentrações pela *S. arborariae* e *S. passalidarum*, em média 1,46 g/L e 1,04 g/L, respectivamente, apresentando concentrações máximas em ensaios com 10% de xilose. Este subproduto não foi produzido nos ensaios realizados com *S. stipitis*.

Apesar de baixa a produção de glicerol nos experimentos realizados, em altas concentrações de açúcares, este co-produto pode estar relacionado ao estresse osmótico, uma vez que, o glicerol atua como osmorregulador ou soluto compatível na célula (Nevoigt e Stahl, 1998).

O xilitol produzido, não ultrapassou os rendimentos de etanol em todas as leveduras. Em *S. passalidarum* a produção de xilitol foi menor comparado com *S. arborariae*. A maior concentração de xilitol foi observada em experimentos realizados com a *S. arborariae*, sendo 2,6 g/L, 8,0 g/L e 12,4 g/L em concentrações de 4%, 8% e 10% de xilose, respectivamente. A levedura *S. passalidarum* e *S. stipitis*, apresentaram produção máxima de xilitol em 10% de xilose (1,7 g/L).

Foi possível verificar elevada produtividade de etanol por *S. passalidarum* ( $Q_P = 0,74 \text{ g/L.h}^{-1}$  a  $1,03 \text{ g/L.h}^{-1}$ ) e  $\eta$  entre 69% e 80% e para *S. stipitis* ( $Q_P = 0,72 \text{ g/L.h}^{-1}$  a  $0,79 \text{ g/L.h}^{-1}$ ) e  $\eta$  entre 70 e 80% (Tabela 1). Ambas apresentaram resultados similares, no entanto, *S. passalidarum* em 10% produziu maior concentração de etanol (38,0 g/L) e produtividade em etanol ( $Q_P = 0,94 \text{ g/L.h}^{-1}$ ).

Cadete (2009), em experimento com a levedura *S. arborariae*, no meio de fermentação contendo YP 2% de xilose, em 28 °C, apresentou rendimentos de etanol de 0,37 g/g com uma densidade óptica inicial próxima a 0,1.

Em experimentos fermentativos em meio sintético YP adicionado 50 g/L de xilose a temperatura de 30 °C, Cadete (2012), verificou produção de etanol variando de 15 g/L a 18 g/L para *S. passalidarum*, a produtividade de etanol ( $Q_P = 0,62 \text{ g/L.h}^{-1}$  a  $0,75 \text{ g/L.h}^{-1}$ ) e eficiência de fermentação de aproximadamente 70%.

Os rendimentos mais altos de etanol obtidos nos experimentos com *S. passalidarum* podem ser devido à preferência da enzima xilose redutase (XR) pelo cofator NADH, não gerando desequilíbrio entre a oferta e procura dos cofatores, visto que a enzima xilitol desidrogenase (XDH) é  $\text{NAD}^+$  dependente (X. Hou, 2012).

Tabela 1: Parâmetros fermentativos em diferentes concentrações de xilose.

Velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ); rendimento de etanol ( $Y_{(P/S)}$ ); produtividade de etanol ( $Q_P$ ); eficiência de fermentação ( $Y\%$ ); desvio padrão inferior à 0,005(\*)

Linhagem de levedura	Xilose	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Etanol (g/L)		$Y_{(P/S)}$ (g/g)		$Q_P$ (g/L.h $^{-1}$ )		Y%		Tempo (horas)
<i>S. arborariae</i>	4%	0,10	12,9	$\pm 0,11$	0,34	$\pm 0,01$	0,32	$\pm 0,03$	65,1	$\pm 0,06$	40
	8%	0,10	24,2	$\pm 0,27$	0,31	$\pm 0,02$	0,39	$\pm 0,01$	57,1	$\pm 1,08$	60
	10%	0,10	27,6	$\pm 0,68$	0,32	$\pm 0,01$	0,39	$\pm 0,01$	60,8	$\pm 1,49$	70
<i>S. passalidarum</i>	4%	0,10	15,1	$\pm 0,65$	0,37	$\pm 0,00^*$	0,74	$\pm 0,03$	70,9	$\pm 0,16$	20
	8%	0,11	31,3	$\pm 1,77$	0,40	$\pm 0,05$	1,03	$\pm 0,06$	68,5	$\pm 2,25$	30
	10%	0,11	38,0	$\pm 0,72$	0,42	$\pm 0,00^*$	0,94	$\pm 0,02$	80,7	$\pm 0,56$	40
<i>S. stipitis</i>	4%	0,09	15,8	$\pm 0,44$	0,42	$\pm 0,01$	0,78	$\pm 0,02$	81,05	$\pm 2,50$	20
	8%	0,08	32,0	$\pm 0,29$	0,36	$\pm 0,00^*$	0,79	$\pm 0,00^*$	69,9	$\pm 0,36$	40
	10%	0,09	36,3	$\pm 2,24$	0,37	$\pm 0,02$	0,72	$\pm 0,04$	71,5	$\pm 4,7$	50

## 5.2 Fermentação em diferentes temperaturas

A partir dos resultados obtidos durante a fermentação em diferentes concentrações de xilose, pode-se concluir que a melhor concentração de açúcar para caracterização destas leveduras em diferentes temperaturas foi 10% de xilose, visto que nesta concentração ambas leveduras apresentaram bom crescimento celular e produção de etanol.

O crescimento da levedura *S. arborariae* apresentou-se similar nas temperaturas de 28 °C e 32 °C, no entanto em 35 °C houve uma menor produção de biomassa celular (Figura 8 A-C). Em todas as temperaturas testadas a velocidade específica de crescimento se manteve semelhante ( $0,10 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ), demonstrando que esta espécie de levedura cresce em uma faixa de 28 °C a 35 °C (Tabela 2). As células permaneceram viáveis em diferentes temperaturas durante todo o processo fermentativo (dados não mostrados).

A velocidade específica de crescimento, a viabilidade e o crescimento celular (massa seca g/L) pela levedura *S. arborariae* se manterem similares em 28 °C, 32 °C e 35 °C. No entanto, o rendimento de etanol obtido nas temperaturas de 32 °C e 35 °C foram inferiores comparado a menor temperatura de ensaio, sendo  $Y_{P/S}$  0,20 g/g e 0,19 g/g, respectivamente, nestas temperaturas, foi possível observar que houve a maior produção de xilitol comparado à etanol, sendo 0,28 g/g e 0,34 g/g, respectivamente, os rendimentos. Nestas temperaturas a maior produção de xilitol encontrada foi de  $22,8 \pm 0,1 \text{ g/L}$ , no tempo de 70 horas de fermentação. No processo fermentativo em 28 °C, o rendimento em etanol observado foi de 0,32 g/g, e a maior produção de etanol foi de 27,6 g/L em 70 horas de experimento, e eficiência de conversão 61 (Tabela 2) para *S. arborariae*.

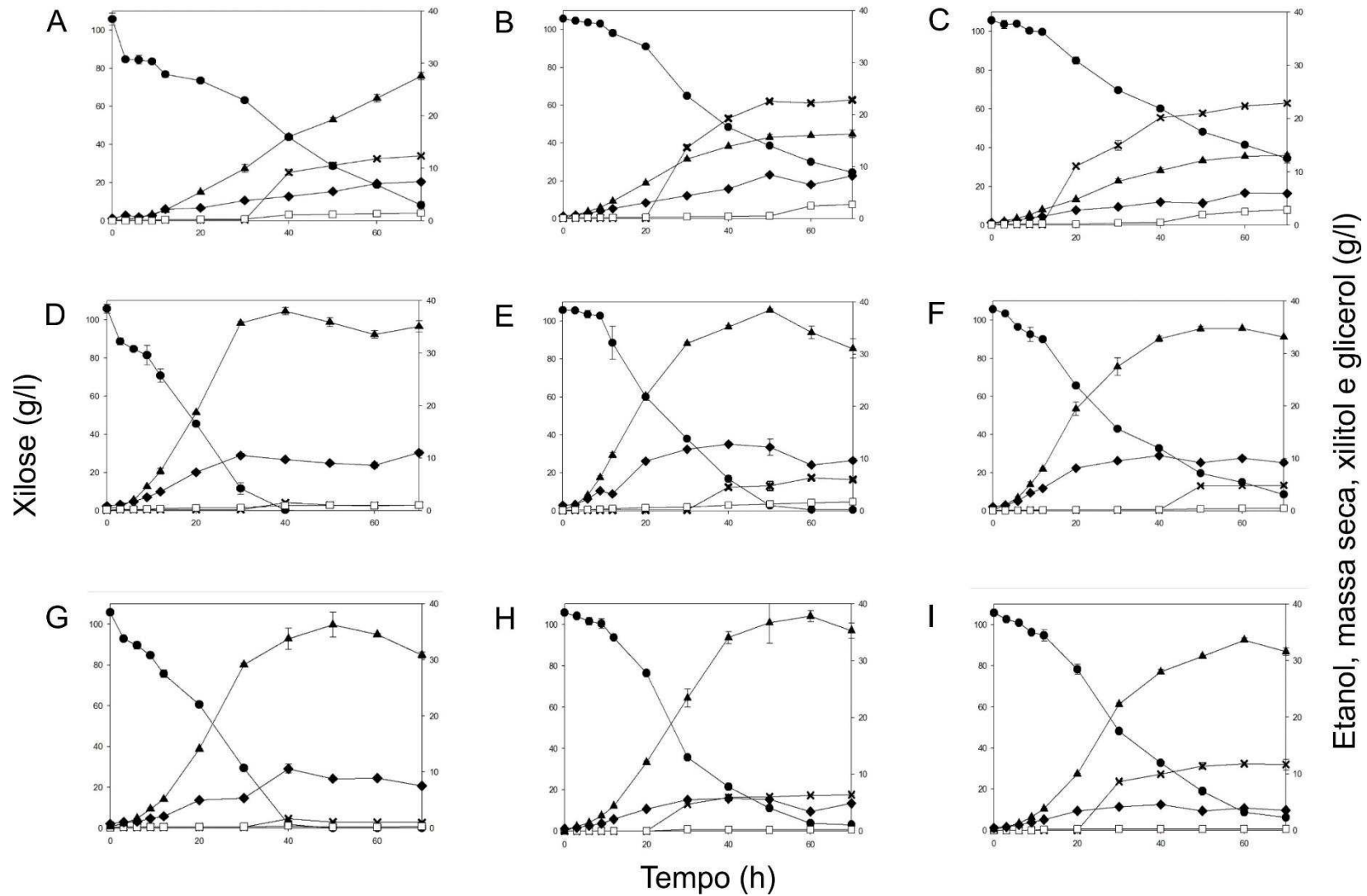


Figura 8: Cinética de fermentação em 10% de xilose, por *S. arborariae* (A, B e C) em 28°C, *S. passalidarum* (D, E e F) e *S. stipitis* (G, H e I) em 32°C. Sendo: Xilose (●); Etanol (▲); Massa Seca (◆); Glicerol (□); Xilitol (x).

A linhagem *S. arborariae* UFMG-HM19.1A, utilizada no presente trabalho, foi isolada do Parque Nacional da Serra do Cipó, o qual apresenta clima tropical de altitude, com verões frescos e chuvosos e uma estação seca bem estabelecida, com temperaturas médias anuais oscilando entre 17 e 18,5 °C (Cadete, et al., 2009). Dessa forma, temperaturas mais elevadas podem ter causado estresse para a levedura, desfavorecendo por exemplo, a atividade da enzima xilitol desidrogenase, levando ao acúmulo de xilitol, e/ou causado desequilíbrio de cofatores.

A levedura *S. passalidarum*, também apresentou crescimento similar durante todo o processo fermentativo nas três temperaturas avaliadas (28 °C, 32 °C e 35 °C). A velocidade específica de crescimento foi maior na temperatura de 35 °C, com valor de 0,15 h<sup>-1</sup>. Nas demais temperaturas, a velocidade específica de crescimento se mantiveram iguais, com valor de 0,11h<sup>-1</sup> (Tabela 2) e a viabilidade celular também se manteve durante o processo fermentativo.

As concentrações produzidas de etanol pela levedura *S. passalidarum* foram similares nas temperaturas de 28 °C e 32 °C (38 ± 0,4 g/L), em 35 °C ocorreu a menor concentração de etanol (34,8 g/L). Ao contrário da levedura *S. arborariae*, a *S. passalidarum* produziu mais etanol comparando ao xilitol em todas as temperaturas, sendo 1,6 g/L ± 0,06, 6,4 g/L ± 0,30 e 4,9 g/L ± 0,12, em 28 °C, 32 °C e 35 °C, respectivamente.

Comparando o crescimento (massa seca) da levedura *S. stipitis* durante a fermentação em diferentes temperaturas, foi possível observar o melhor crescimento em 28 °C e nas temperaturas de 32 °C e 35 °C o crescimento foi similar (Figura 8 G-I). No entanto, a velocidade específica de crescimento foi inversamente proporcional, sendo a menor 0,09 h<sup>-1</sup> em 28 °C e nas temperaturas de 32 °C e 35 °C foi semelhante, sendo, 0,13 h<sup>-1</sup> e 0,12 h<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 2).

O rendimento em etanol pela *S. stipitis*, foi similar em todas as temperaturas estudadas, tendo em média  $Y_{P/S} = 0,36$  g/g, com concentração máxima de etanol (37,8 g/L), em 60 horas de fermentação a 32 °C. A produção de xilitol foi crescente de acordo com o aumento da temperatura.

De forma semelhante a *S. arborariae*, a *S. stipitis* produziu menor concentração de xilitol em temperatura mais baixa (1,6 g/L ± 0,05), sendo produzido no máximo, 6,4 g/L ± 0,15 e 11,8 g/L ± 0,26, nas temperaturas de 32 °C e 35 °C, respectivamente. No entanto, a produção de xilitol não ultrapassou as concentrações de etanol. A viabilidade

desta levedura em 28 °C se manteve constante durante todo o processo de fermentação, no entanto a 32 e 35 °C, após 50 horas de fermentação foi possível verificar a ausência do crescimento de colônias em meio sólido, mesmo em baixa diluição.

Em relação a capacidade de assimilação da xilose, todas as linhagens de leveduras, consomem este açúcar em maior velocidade em 28 °C, comparado as demais. No entanto a levedura *S. arborariae* não consome toda a xilose presente no meio, sendo a assimilação máxima de aproximadamente 92% na temperatura de 28 °C em 70 horas, e assimilação mínima de aproximadamente 66% em 70 horas a 35°C. *S. passalidarum* e *S. stipitis* em 40 horas de fermentação a 28 °C, consomem 100% da xilose presente no meio.

A levedura *S. passalidarum* crescendo a 32 e 35 °C assimila 100% da xilose em 60 horas e 92% em 70 horas, respectivamente. De forma semelhante, a *S. stipitis* crescendo na temperatura de 32 e 35 °C, em 70 horas de fermentação consome aproximadamente 97 e 94% da xilose, respectivamente. Tal fator pode estar relacionado a temperatura ótima de atividade das enzimas e/ou transportadores, além disso a temperatura mais elevada e concentração de etanol podem causar estresse celular.

Em *S. arborariae* a maior produção de glicerol nas temperaturas 28, 32 e 35 °C foram 1,46, 2,73 e 2,88 g/L, respectivamente. Em *S. passalidarum* as concentrações deste subproduto foram menores quando comparado a *S. arborariae*, com valores de 1,04, 1,74 e 1,33 g/L, para as temperaturas de 28, 32 e 35 °C.

Em experimentos realizados por Hou (2012), a enzima XR de *S. stipitis* e *S. passalidarum* utilizam como cofator NADPH e NADH, no entanto, é possível observar preferência por NADPH por *S. stipitis*, e de NADH pela *S. passalidarum*. E verificou-se que a enzima XDH é NAD<sup>+</sup> dependente em ambas, sendo assim a levedura *S. stipitis* requer concentrações baixas de oxigênio para que NAD<sup>+</sup> seja regenerada, enquanto a processo de fermentação por *S. passalidarum* não há desequilíbrio de cofatores. Desta forma, podemos inferir que de forma similar ao estudo relatado com a levedura *S. stipitis*, a enzima XDH de *S. arborariae* tenha preferência por NAD<sup>+</sup>.

Tabela 2: Parâmetros fermentativos em diferentes temperaturas.

Linhagem de levedura	Temperaturas	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Etanol		Y <sub>(P/S)</sub> (g/g)		Q <sub>P</sub> (g/L.h <sup>-1</sup> )		Y%		Tempo (horas)
			(g/L)	±		±		±		±	
<i>S. arborariae</i>	28°C	0,10	27,6	±0,7	0,32	±0,01	0,39	±0,01	60,8	±1,5	70
	32°C	0,11	16,3	±0,7	0,20	±0,02	0,23	±0,01	37,5	±2,3	70
	35°C	0,10	13,1	±0,1	0,19	±0,01	0,18	±0,01	36,6	±1,5	70
<i>S. passalidarum</i>	28°C	0,11	38,0	±0,7	0,42	±0,00*	0,094	±0,02	80,7	±0,6	40
	32°C	0,11	38,4	±0,3	0,38	±0,01	0,77	±0,01	72,2	±2,2	50
	35°C	0,15	34,8	±0,1	0,38	±0,00*	0,58	±0,00*	73,3	±0,2	60
<i>S. stipitis</i>	28°C	0,09	36,3	±2,2	0,35	±0,00*	0,72	±0,04	73,2	±2,4	50
	32°C	0,13	37,8	±1,0	0,36	±0,02	0,61	±0,03	71,0	±1,6	60
	35°C	0,12	33,6	±0,4	0,34	±0,03	0,68	±3,4	68,5	±3,4	60

Velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ); rendimento de etanol (Y(P/S)); produtividade de etanol (Q(P)); eficiência de fermentação (Y%); desvio padrão inferior à 0,005(\*)

### 5.3 Cofermentação de glicose e xilose

Os experimentos de cofermentação foram realizados considerando as melhores condições de fermentação de xilose. Em relação à concentração de açúcar, todas as leveduras apresentaram melhores rendimentos de etanol em fermentações com 10% de xilose. Porém, nas diferentes temperaturas, *S. arborariae*, *S. passalidarum* e *S. stipitis* se comportaram de maneira diferente em relação ao rendimento de etanol. Para a levedura *S. arborariae*, a melhor condição de temperatura foi de 28 °C, em contrapartida, para a levedura *S. passalidarum* e *S. stipitis*, a temperatura de 32 °C foi que apresentou melhores rendimentos de etanol.

De acordo com os resultados, foi possível observar que todas as leveduras consomem glicose e xilose simultaneamente, no entanto, o consumo de glicose inicialmente é rápido. Após o esgotamento de glicose, a xilose passa a ser consumida mais rapidamente, porém, devido à alta concentração de açúcares no meio, a xilose não é totalmente consumida no final de 70 horas de fermentação (Figura 9).

A *S. arborariae* consome totalmente a glicose em 30 e 40 horas, na presença de 2% e 4% de glicose, respectivamente (Figura 9 B e C). Em *S. passalidarum*, a glicose foi totalmente consumida em 20 e 40 horas, respectivamente (Figura 9 E e F). O esgotamento de 2% e 4% de glicose pela *S. stipitis*, ocorre respectivamente em 20 e 30 horas de cofermentação (Figura 9 H e I). Novamente, foi possível observar o consumo rápido dos açúcares por *S. passalidarum* e *S. stipitis* em comparação com *S. arborariae*.

Na presença de glicose *S. arborariae*, *S. passalidarum* e *S. stipitis* apresentaram maior velocidade específica de crescimento quando comparado aos experimentos contendo apenas xilose. Este comportamento pode ser devido à maior afinidade dos transportadores de açúcares por glicose, e também devido a maior quantidade de transportadores específicos de glicose.

A viabilidade celular se manteve constante na presença de 2% e 4% de glicose em *S. arborariae*, durante as 70 horas de fermentação. As leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis* apresentaram aumento no número de células viáveis durante as primeiras 30 horas nas duas concentrações de glicose. Possivelmente se deve ao fato destas leveduras, apresentarem maior velocidade específica de crescimento enquanto a fonte preferencial de açúcar está presente.

Tabela 3: Parâmetros fermentativos em cofermentação.

Velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ); rendimento de etanol ( $Y(P/S)$ ); produtividade de etanol ( $Q_P$ ); eficiência de fermentação ( $Y\%$ ); desvio padrão inferior à

Linhagem de levedura	Concentração de glicose	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Etanol (g/L)		$Y_{(P/S)}$ (g/g)		$Q_P$ (g/L.h $^{-1}$ )		Y%		Tempo (horas)
<i>S. arborariae</i>	0%	0,10	27,6	$\pm 0,7$	0,32	$\pm 0,01$	0,39	$\pm 0,01$	60,8	$\pm 1,5$	70
	2%	0,37	26	$\pm 0,1$	0,29	$\pm 0,0^*$	0,37	$\pm 0,00^*$	57,1	$\pm 0,6$	70
	4%	0,35	25,7	$\pm 0,8$	0,28	$\pm 0,02$	0,36	$\pm 0,02$	55,0	$\pm 3,8$	70
<i>S. passalidarum</i>	0%	0,11	38,4	$\pm 0,3$	0,38	$\pm 0,01$	0,77	$\pm 0,01$	72,2	$\pm 2,2$	50
	2%	0,43	29,9	$\pm 0,3$	0,32	$\pm 0,01$	0,42	$\pm 0,03$	61,7	$\pm 2,6$	70
	4%	0,40	25,8	$\pm 0,9$	0,32	$\pm 0,01$	0,36	$\pm 0,01$	61,8	$\pm 1,5$	60
<i>S. stipitis</i>	0%	0,13	37,8	$\pm 1,0$	0,36	$\pm 0,02$	0,61	$\pm 0,00^*$	71,0	$\pm 1,6$	60
	2%	0,14	29,3	$\pm 1,3$	0,36	$\pm 0,02$	0,42	$\pm 0,02$	69,4	$\pm 3,8$	70
	4%	0,16	32,0	$\pm 1,7$	0,35	$\pm 0,0^*$	0,45	$\pm 0,03$	68,8	$\pm 4,4$	60

0,005(\*)

Para o cálculo de rendimento de etanol ( $Y_{P/S}$ ) considerou-se a média da concentração dos substratos (glicose e xilose) inicial e final. Assim, o valor do rendimento teórico é 0,515 (0,52 da xilose e 0,51 da glicose).

A levedura *S. arborariae* produziu aproximadamente a mesma concentração de etanol (26,0 g/L) nas duas concentrações de glicose. As concentrações de etanol observadas em *S. passalidarum* e *S. stipitis*, foram de 29,9 g/L e 29,3 g/L (2% de glicose) e 25,8 g/L e 32,0 g/L (4% de glicose), respectivamente (Tabela 3).

Em aproximadamente 72 horas de cofermentação em meio sintético contendo, 20 g/L de xilose, 20 g/L de glicose e 10 g/L de arabinose, Cunha-Pereira (2011), verificou uma produção de etanol de 15 g/L pela levedura *S. arborariae* UFMG-HM-19.1A. os valores de  $Y_{P/S}$  e  $Q_P$  encontrados, foram equivalentes a 0,45 g/g e 0,21 g/L.h<sup>-1</sup>, respectivamente.

*S. passalidarum* apresentou rendimentos de 0,32 g/g e  $Q_P$  igual a 0,42 g/L.h<sup>-1</sup>, em 2% e 4% de glicose. Os respectivos rendimentos para *S. stipitis* em cofermentação com 2% e 4% de glicose foram de 0,36 g/g e 0,33 g/g, e produtividade volumétrica igual a 0,42 g/L.h<sup>-1</sup> e 0,45 g/L.h<sup>-1</sup>, respectivamente.

Considerando-se a concentração inicial elevada de xilose (100 g/L) em relação à concentração de glicose (20 g/L e 40 g/L, respectivamente) e os altos rendimentos de etanol encontrados 29,9 g/L para *S. passalidarum* e 32,0 g/L para *S. stipitis*, os resultados do estudo sugerem que a fermentação de hidrolisado lignocelulósico por estas estirpes são promissoras para produção de etanol a partir da D-xilose.

O subproduto xilitol foi produzido com maiores rendimentos em *S. arborariae*, 15,7 g/L em 2% de glicose, e 13,2 g/L em 4% de glicose. Em *S. passalidarum*, o rendimento foi 6,5 g/L e 8,1 g/L, em 2% e 4% de glicose, respectivamente. A levedura *S. stipitis* produziu no processo de cofermentação, concentrações de xilitol inferiores a 6 g/L. Mais uma vez, *S. arborariae* demonstrou ser promissora para produção de xilitol, comparada as demais.

Segundo resultados obtidos por Hou (2012), concluiu-se que a presença de glicose pode afetar o metabolismo de xilose em *S. passalidarum* por ocupar os transportadores da difusão facilitada de xilose. Ou ainda a presença de glicose intracelular pode causar um sinal de repressão da síntese das enzimas XR e XDH, as quais são induzidas pela xilose

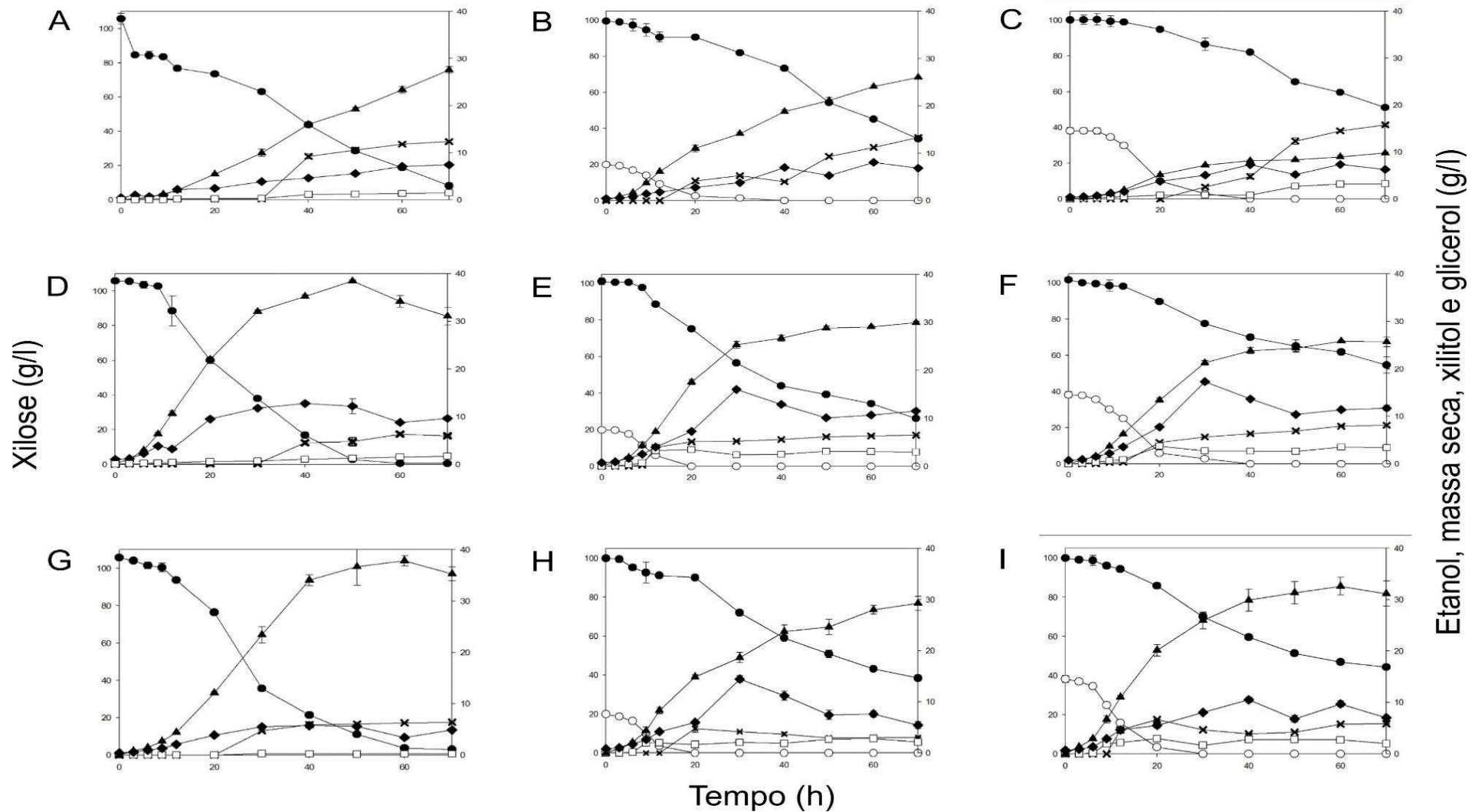


Figura 9: Cinética da cofermentação das leveduras *S. arborariae* (A, B e C), *S. passalidarum* (D, E e F) e *S. stipitis* (G, H e I), em 10% de xilose com 0, 2 e 4% de glicose respectivamente. Sendo: Xilose (●); Etanol (▲); Massa Seca (◆); Glicerol (□); Xilitol (x).

#### 5.4 Avaliação do crescimento na presença de inibidores

As linhagens foram submetidas a fermentação, nas temperaturas de 28 °C para *S. arborariae* e 32 °C para *S. passalidarum* e *S. stipitis* em meio líquido com 10% de xilose e adicionado de furfural (2,5 g/L), (HMF) (0,5 g/L) e ácido acético (3,0 g/L). As concentrações foram definidas de acordo com a caracterização do hidrolisado hemicelulósico, realizado no presente trabalho.

Na figura 10 (A, B e C), pode ser observado que o ácido acético inibiu o crescimento de todas as leveduras, uma vez que na forma não dissociada, pode difundir através da membrana citoplasmática e se dissociar no citoplasma, reduzindo o pH (BELLIDO et al., 2011).

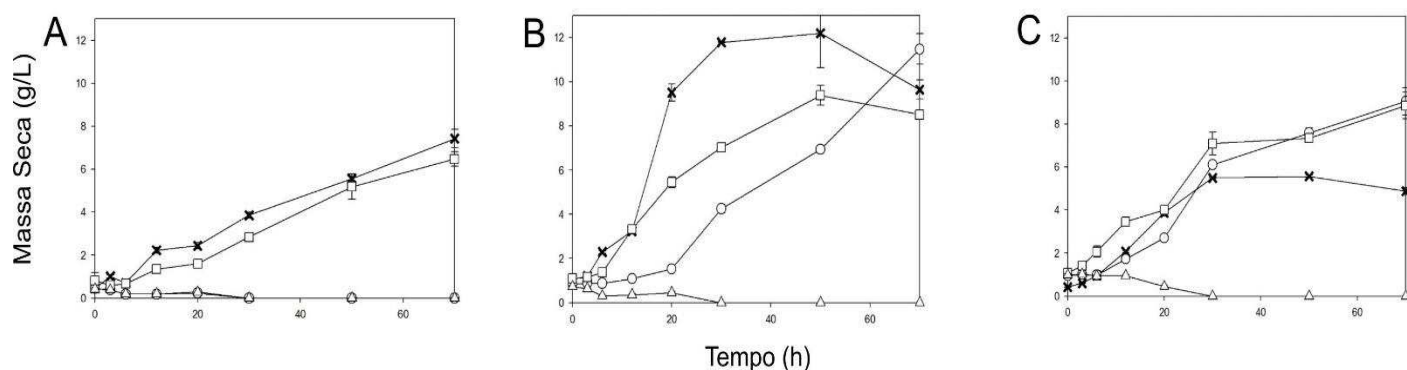


Figura 10: Produção de massa seca por *S. arborariae* (A), *S. passalidarum* (B) e *S. stipitis* (C). Controle (x); Furfural (o); HMF (□); Ácido acético (Δ).

O crescimento de *S. arborariae* na presença de furfural foi completamente inibido. Na presença de HMF, a produção de biomassa foi inferior comparado ao controle, no entanto, não inibiu o crescimento.

As leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis* produziram mais biomassa na presença de furfural e HMF, sendo tolerantes a estes inibidores.

Nas concentrações mais baixas de etanol, 2 e 4%, as leveduras *S. arborariae* e *S. passalidarum* cresceram normalmente (Tabela 4), a *S. stipitis* não sofreu com efeito inibitório de etanol em 2%, no entanto, houve decréscimo de crescimento em 4% e inibição total do crescimento em 6%. A *S. arborariae*, apesar de ter apresentado bom crescimento em 4%, quando em 6% houve inibição do crescimento, a figura 11 demonstra o padrão de avaliação do crescimento.

Tabela 4: Avaliação do crescimento na presença de etanol.

Linhagem de levedura	Concentração de Etanol		
	2%	4%	6%
<i>S. arborariae</i>	+++	+++	-
<i>S. passalidarum</i>	+++	+++	+
<i>S. stipitis</i>	+++	++	-

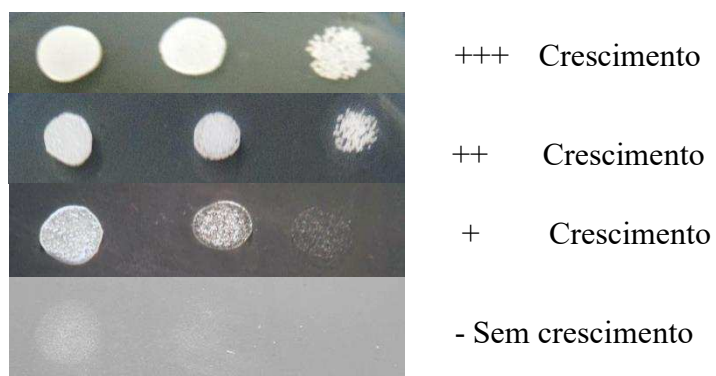


Figura 11: Padrão para avaliação do crescimento em diferentes concentrações de etanol, nas diluições 1:1; 1:10; 1:100.

## 6. CONCLUSÕES

Os melhores rendimentos de etanol em 10% de xilose. Sendo na temperatura de 28 °C

(*S. arborariae*) e 32 °C (*S. passalidarum* e *S. stipitis*);

A viabilidade celular se manteve nos ensaios de fermentação;

Nos experimentos realizados com inibidores, a levedura *S. arborariae*, *S. passalidarum* e *S. stipitis* demonstraram ser tolerantes ao HMF;

No entanto, a levedura *S. arborariae* não cresceu no meio contendo furfural, ao contrário da *S. passalidarum* e *S. stipitis*;

No entanto, nenhuma das espécies toleram a concentração utilizada de ácido acético;

Quanto a tolerância ao etanol, a *S. passalidarum* foi a única espécie que apresentou crescimento em 6%;

Avaliando os resultados obtidos, podemos então sugerir a linhagem *S. passalidarum* como mais promissora para produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, quando comparada as demais do presente trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS

AGBOGBO, F. K., COWARD-KELLY, G., TORRY-SMITH, M., WENGER, K. S. Fermentation of glucose-xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochemistry* 2006; 41: 2333-2336.

AGBOGBO, F.K., & COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett* 2008; 30: 1515-1524.

BELLIDO, C.; BOLADO, S.; COCA, M.; et al. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology* 2011; 102: 10868–10874.

BIOFUELS, BIOFUELS. "biofuels." *Science* 2012; 311: 506-508.

BIRCH, R. M.; WALKER, G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 2000; 26: 678-687.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010; 14: 557–577.

CADETE, R. M., SANTOS, R. O., MELO, M. A., MOURO, A., GONÇALVES, D. L., STAMBUK, B. U., GOMES, C. O., LACHANCE, M., ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. Nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *FEAMS Yeast Res.* 2009; 9: 1338-1342.

CADETE, R. M.; MELO, M. A; DUSSÁN, K. J.; et al. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. *PloS one* 2012; 8: 431- 435.

CADETE, R. M.; MELO, M. A; ZILLI, J. E.; et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel (D)-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. *Antonie van Leeuwenhoek* 2013; 103: 421–431.

CANILHA, L., CHANDEL, A. K., MILESSI, T. S. S., ANTUNES, F. A. F., FREITAS, W. L. C., FELIPE, M. G. A., SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012; 15.

CENBIO (Centro Nacional em Referência de Biomassa— Brazilian Reference Center on Biomass), <http://cenbio.iee.usp.br/>.

CHANDEL, A. K., SINGH O. V., VENKATESWAR R. L., CHANDRASEKHAR, G., LAKSHMI, N. M. Bioconversion of novel substrate *Saccharum spontaneum*, a weedy

material, into ethanol by *Pichia stipitis* NCIM3498. *Bioresource Technology* 2011; 102: 1709-1714.

CHANDEL, A. K.; CHANDRASEKHAR, G.; RADHIKA, K.; RAVINDER, R. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2011; 6: 8–20.

CHARLTON, A., ELIAS, R., FISH, S., FOWLER, P., GALLAGHER, J. The biorefining opportunities in Wales: Understanding the scope for building a sustainable, biorenewable economy using plant biomass. *Chemical Engineering Research and Design* 2009; 87: 1147–1161.

CHERUBINI, F. & ULGIATI, S. Crop residues as raw materials for biorefinery systems – A LCA case study. *Applied Energy* 2010; 87: 47–57.

CHU, B. C. H.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnology Advances* 2007; 25: 425–441.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento-National Supply Company), 2014. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar. Segundo Levantamento da Safra 2014/2015, <http://www.conab.gov.br/>.

CUNHA - PEREIRA, F. Avaliação da capacidade de bioconversão de hexoses e pentoses em bioetanol por *Spathaspora arborariae*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação. Porto Alegre, 2010.

CUNHA-PEREIRA, F., HICKERT, L. R., SEHNEM, N. T., SOUZA-CRUZ, P. B., ROSA, C. A., AYUB, M. A. Z. Conversion of sugar present in Rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. *Bioresource Technology* 2011; 102: 4218-4225.

DEMIRBAS, M.F., BALAT, M., BALAT, V. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. *Energy Conversion and Management* 2009; 50: 1746–1760. (A)

DEMIRBAS, M. F. Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review. *Applied Energy* 2009; 86: 151–161. (B)

GARCIA, D. Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis*, a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, 2012.

GARROTE, G., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. Springer 1999; 57: 191-202.

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

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007; 74: 937–953.

HAMACHER, T.; BECKER, J.; GÁRDONYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BOLES, E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology* 2002; 148: 2783–2788.

HALLSWORTH, J. E. Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1998; 85: 125-137.

HICKERT, L. R., SOUZA-CRUZ, P. B., ROSA, C. A., AYUB, M. A. Z. Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. *Bioresource Technology* 2013; 143: 112–116.

HIMMEL, E. M., DING, S., JOHNSON, D. K., ADNEY, W. S., NIMLOS, M. R., BRADY, J. W., FOUST, T. D. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 2007; 315: 804-807.

HOU, X. & YAO, S. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 93: 2591–2601.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Appl. Microbial Biotechnol* 2012; 94: 205-214.

JÖNSSON, L. J., ALRIKSSON, B., NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* 2013, 6:16.

KILIAN, S. G.; UDEN, N. VAN. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1988; 27: 545–548.

KIM, Y., KREKE, T., HENDRICKSON, R., PARENTI, J., LADISCH, M. R. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. *Bioresource Technology* 2013; 35: 30–38.

LACHKE, A. Biofuel from D-xilose –the second most abundant sugar. *General* 2002; 51-58.

LEISTRITZ, F. L. & HODUR, N. M. Biofuels: a major rural economic development opportunity. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining* 2008; 2:501–504.

LIU, Z. L.; MA, M.; SONG, M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Mol Genet Genomics* 2009; 282: 233-244.

LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; BERHOW, M. A.; KURTZMAN, C. P.; GORSICH, S. W. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural

and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2004; 31: 345-352.

LONG, T. M.; SU, Y.-K.; HEADMAN, J.; et al. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78: 5492–5500.

MADHAVAN, A., TAMALAMPUDI, S., USHIDA, K., KANAI, D., KATAHIRA, S., SRIVASTAVA, A., FUKUDA, H., BISARIA, V. S., KONDO, A. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; 82:1067–1078.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science* 2012; 38: 522–550.

MISHRA, P.; PRASAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989; 30: 294–298.

NGUYEN, N. H., SUH, S-O., MARSHALL, C. J., BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. Nov. and *Candida jeffriesii* sp. Nov. *Mycological Research* 2006; 110: 1232-1241.

PIGNAL, M. C. Une nouvelle espece de levure isolee de larves d'insectes: *Pichia stipitis*. *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon* 1967; 4: 163-168.

ROCHA, G. J. M., GONÇALVES, A. R., OLIVEIRA, B. R., OLIVARES, E. G., ROSSEL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2012; 35: 274-279.

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A., SILVA, J. B. A., VITOLO, M. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. *Process Biochemistry* 2003; 38: 1231- 1237.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *Ind Microbiol Biotechnol* 2003; 30: 279–291.

SAHA, B. C., NICHOLS, N. N., QURESHI, N., COTTA, M. A. Comparison of separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation processes for ethanol production from wheat straw by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 92: 865–874.

SHARMA, P., SARKER, B. R., ROMAGNOLI, J. A. A decision support tool for strategic planning of sustainable biorefineries. *Computers and Chemical Engineering* 2011; 35: 1767–1781.

SOCCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. S., MEDEIROS A. B. P., KARP, S. G., BUCKERIDGE, M., RAMOS, L. P., PITARELO, A. P., FERREIRA-LEITÃO, V., GOTTSCHALK, L. M. F., FERRARA, M. A., BON, E. P. S., MORAES, L. M. P., ARAÚJO, J. A., TORRES, F. A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology* 2010; 101:4820–4825.

SOUZA, C. J. A. Produção de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas do bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras termotolerantes. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, 2011.

TAYLOR, G. Biofuels and the biorefinery concept. *Energy Policy* 2008; 36: 4406–4409.

SUH, S-O., MARSHALL, C. J., McHUGH, J. V., BLACKWELL, M. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. *Molecular Ecology* 2003; 12: 3137-3145.

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

WALKER, G.M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. England: John Wiley & Sons Ltd. 1998; 362.

WAHLBOM, C. F. & HAHN-HÄGERDAL, B. Furfural, 5-hydroxymetil furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Wiley Periodicals* 2002; 78: 172-178.