**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Isolamento e Seleção de Leveduras para Fermentação de Xilose

Camila de Souza Varize

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestra em Ciências. Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2013**

Camila de Souza Varize
Tecnóloga em Produção Sucroalcooleira

Isolamento e Seleção de Leveduras para Fermentação de Xilose

Orientador:
Dr. **LUIZ CARLOS BASSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestra em Ciências. Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Varize, Camila de Souza
Isolamento e Seleção de Leveduras para Fermentação de Xilose / Camila de Souza
Varize. - - Piracicaba, 2013.
77 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.
Bibliografia.

1. Hemicelulose 2. Xilose 3. Fermentação 4. Leveduras 5. Isolamento de micro-organismos 6. Etanol de segunda geração I. Título

CDD 660.62
V313i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico

À minha Mãe Eliane, que me presenteou com o bem mais precioso:

A vida

Ensinou-me os primeiros passos e primeiras palavras...

...Lutou, sorriu e chorou.

Deu-me o exemplo de ser forte.

Conscientizou-me do quanto é importante buscar conhecimento.

Demonstrou que incondicionalmente sempre me amará

Obrigada por ser minha Mãe

Amo você

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar e transmitir força e paz a cada dia;

À minha mãe e ao meu padrasto, Eliane e Alecsander, e às minhas irmãs, Caroline e Angélica, pelo grande carinho, incentivo, convivência e principalmente por representarem a minha principal fonte de apoio;

Ao meu pai Edinaldo, pelo carinho e primeiros ensinamentos da minha vida;

Ao Lucas Dantas Lopes, pelo companheirismo, forte estímulo, e pela imensa ajuda na concretização deste trabalho;

Ao meu orientador, Dr. Luiz Carlos Basso, por todos os ensinamentos científicos e pela oportunidade de realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pela concessão das linhagens de leveduras;

Ao Técnico de laboratório, Luis Lucatti (Cometa), pela contagiante alegria e por estar sempre predisposto a ajudar;

Aos amigos do laboratório, Renata, Stefania, Natália, Elisângela, Nara, Elisa, Talita, Alexandra, Ananda, Osni, Juliana e todos os outros colegas que já estiveram ou ainda estão presentes no laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras, ESALQ/USP, pelos auxílios no que me foi necessário e pela boa convivência. Em especial à Renata por toda atenção e presteza;

À minha nona, Sônia, e a todos os meus tios, primos e demais componentes da minha família, por todo o carinho e também pelos momentos agradáveis;

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da ESALQ/USP;

À agência CNPq, pela concessão de bolsa durante os dois anos de mestrado;

Obrigada.

O mais importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir. Questionar é o que leva a humanidade ao avanço. Se você aceitar todas as coisas a sua volta sem repensá-las jamais, nunca irá conseguir encontrar soluções e novas oportunidades.

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Lignocelulose.....	17
2.2 Bioetanol.....	20
2.3 Xilitol.....	22
2.4 Fermentação de xilose por leveduras.....	23
3 OBJETIVO.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Meios de cultura.....	31
4.2 Isolamento de leveduras.....	32
4.3 Micro-organismos utilizados e método de preservação.....	33
4.4 Preparo do inóculo.....	34
4.5 Fermentações em meio sintético de xilose como fonte de carbono.....	34
4.6 Fermentação em meio constituído de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	35
4.7 Análises de concentração celular e quantificações de xilose, etanol e xilitol.....	35
4.7.1 Fator de conversão de xilose em etanol.....	35
4.8 Análises estatísticas.....	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Leveduras isoladas.....	37
5.2 Fermentações em meio YEPX.....	38
5.2.1 Crescimento celular dos isolados.....	38
5.2.2 Capacidade fermentativa dos isolados.....	41
5.2.3 Crescimento celular das linhagens identificadas.....	48
5.2.4 Capacidade fermentativa das linhagens identificadas.....	48
5.2.5 Crescimento celular das linhagens pré-selecionadas.....	55
5.2.6 Capacidade fermentativa das linhagens pré-selecionadas.....	56
5.3 Experimento fermentativo final das linhagens selecionadas.....	59
6 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	67

RESUMO

Isolamento e seleção de leveduras para fermentação de xilose

A importância atribuída aos biocombustíveis aumentou de forma drástica nos últimos anos, pois além de reduzir a dependência de petróleo e os gastos com energia fóssil, o uso de fontes de energia renováveis resulta também em uma diminuição significativa das emissões de gases tóxicos para a atmosfera. A biomassa de origem vegetal é uma das mais baratas e abundantes matérias-primas renováveis para o desenvolvimento sustentável e é uma fonte promissora para a produção de biocombustíveis. O bioetanol produzido a partir das frações lignocelulósicas, conhecido como etanol de segunda geração, tem um potencial de mercado promissor como biocombustível. No entanto, a tecnologia do processo ainda está em escala de demonstração. Há grande necessidade de melhorias no processo de produção a fim de reduzir o custo de produção. Caso houvesse a utilização total dos açúcares presentes na biomassa vegetal, existiria uma maior rentabilidade e competitividade, tornando esse processo mais viável. Os polissacarídeos constituintes do material lignocelulósico, como hemicelulose e celulose, por uma reação de hidrólise podem ser transformados em açúcares simples, tais como xilose e glicose, que podem ser utilizados como substrato em processos fermentativos. Algumas linhagens de leveduras não pertencentes ao gênero *Saccharomyces* possuem a capacidade de bioconversão das pentoses (xilose e arabinose), constituintes da fração hemicelulósica, em etanol. Neste contexto, o presente estudo objetivou isolar leveduras de madeira em fase de decomposição para avaliação das mesmas quanto à capacidade de bioconversão da xilose, principal constituinte da fração hemicelulósica, em etanol. Foram obtidas 83 colônias de leveduras do isolamento, sendo que todas foram inoculadas em meio de xilose como fonte de carbono. Somente onze isolados não apresentaram capacidade de produção de etanol a partir de xilose, os isolados que exibiram essa capacidade apresentaram uma variação de 0,60 até 6,58 g L⁻¹ de etanol. Além dos isolados, quinze linhagens pertencentes a espécies de leveduras já conhecidas como fermentadoras de xilose foram avaliadas quanto à produção de etanol. As linhagens pertencentes às espécies *Spathaspora passalidarum* (HMD1.3) e *Candida shehatae* (HM52.2) foram as maiores produtoras de etanol e não apresentaram diferenças significativas entre elas. Dentre todos os isolados obtidos, os isolados I38 e I54 não diferiram entre si, e foram os maiores produtores de etanol. O isolado I38 apresentou resultados significativamente maiores do que as linhagens padrão *Spathaspora arborariae* HM19.1A e *Sheffersomyces stipitis* NRRLY7124, enquanto o isolado I54 não diferiu da linhagem padrão HM19.1A, mas foi superior à linhagem NRRLY7124.

Palavras-chave: Hemicelulose; Xilose; Fermentação; Leveduras; Isolamento de micro-organismos; Etanol de segunda geração

ABSTRACT

Isolation and selection of yeasts for xylose fermentation

The importance given to biofuels drastically increased in the last years, because besides reducing oil dependence and spending on fossil energy, the use of renewable energy sources also results in a significant reduction of toxic gas emissions to the atmosphere. Plant biomass is one of the cheapest and most abundant renewable feedstock for sustainable development and is a promising source for biofuel production. Bioethanol produced from lignocellulosic fractions, known as second generation ethanol, have a promising market potential as a biofuel. However, the process technology is still in demonstration scale. There is a great need for improvements in the production process in order to reduce the production cost. If there was a total utilization of sugars in plant biomass, there would be greater profitability and competitiveness, making this process more feasible. The polysaccharides components of lignocellulosic material, such as cellulose and hemicellulose, by hydrolysis reaction can be transformed into simple sugars such as xylose and glucose, which can be used as substrate for fermentation. Some yeast strains not belonging to the genus *Saccharomyces* have the ability of bioconversion of pentoses (xylose and arabinose), components of the hemicellulose fraction, to ethanol. In this context, the aim of the present study was the isolation of yeasts from decaying wood, to assess their ability in bioconversion of xylose, the main constituent of the hemicellulosic fraction, to ethanol. Eighty-three colonies were obtained from the yeasts isolation, which all were inoculated in media containing xylose as carbon source. Only eleven strains did not showed the ability of ethanol production from xylose, the strains that exhibited this ability varied between 0.60 to 6.58 g L⁻¹ of ethanol. In addition to the isolated strains, fifteen strains belonging to yeast species already known as xylose fermenters were assessed for ethanol production. The strains belonging to the species *Spathaspora passalidarum* (HMD1.3) and *Candida shehatae* (HM52.2) were the largest producers of ethanol and showed no significant differences between them. Among all obtained strains from isolation, I38 and I54 did not differed from each other, and were the largest producers of ethanol. The I38 strain showed results significantly higher than the standard strains *Spathaspora arborariae* HM19.1A and *Sheffersomyces stipitis* NRRLY7124, while the I54 strain did not differed from the standard strain HM19.1A, but was higher than the strain NRRLY7124.

Keywords: Hemicellulose; Xylose; Fermentation; Yeasts; Isolation of microorganisms; Second generation ethanol

1 INTRODUÇÃO

O cenário energético mundial carece de alternativas para substituição dos combustíveis fósseis, principalmente em consequência dos malefícios que estes causam ao meio ambiente (NIGAM et al., 2011). Os combustíveis derivados de petróleo são atualmente muito utilizados em todo o mundo. A prospecção e utilização desse recurso natural envolvem altos custos e preocupações climáticas (SEARCHINGER et al, 2008; SATHRE, 2014). Além de o petróleo ser um recurso não renovável, seus derivados causam contaminações subterrâneas preocupantes (FINOTTI et al., 2001). A queima dos combustíveis fósseis, como gasolina e óleo diesel, contribui para a liberação de grande parte dos gases causadores do efeito estufa e, conseqüentemente, mudanças climáticas (HOOK et al., 2013; AGUDELO et al., 2013). Tendo em vista essa realidade, os biocombustíveis tornam-se alternativas atraentes para substituição dos combustíveis fósseis. O bioetanol representa estimada fonte de energia limpa e renovável. É o biocombustível mais empregado em todo o mundo, tanto na forma pura, quanto na forma de aditivo à gasolina (MCKENDRY, 2002; SÁNCHEZ et al., 2008).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, sendo os EUA líder mundial a partir da utilização do amido de milho (GERBENS-LEENES et al., 2012). A cana-de-açúcar, principal matéria-prima para produção de etanol no Brasil, é considerada muito vantajosa em relação a outras culturas. Seu alto balanço energético é um dos exemplos que demonstra sua primazia, pois a proporção do balanço de energia para a cana é de 8,3, ou seja, para cada unidade de energia empregada na produção do etanol, mais de oito unidades são produzidas (MACEDO et al., 2007).

Entretanto, as principais matérias-primas utilizadas para obtenção de substratos fermentescíveis, como o milho, cana-de-açúcar e beterraba, possuem aplicações alimentícias, fato esse causador de uma recorrente discussão sobre novas alternativas para produção de etanol (KOÇAR et al., 2013). A produção de biocombustíveis convencionais defronta-se também com obstáculos para atingir os níveis desejados, o que fomenta forte estímulo à adoção de tecnologias avançadas, como o etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos (SARKAR et al., 2012).

A biomassa lignocelulósica constitui a maior parte do material vegetal, contém de 35 a 50% de celulose, 20 a 35% de hemicelulose e 10 a 25% de lignina. É a maior fonte de matéria orgânica renovável, representa grande valor biotecnológico e é muito gerada através de práticas agrícolas e florestais (SAHA, 2004). Um dos resíduos lignocelulósicos mais

abundantes no Brasil é o bagaço de cana-de-açúcar, o que motiva pesquisas para desenvolvimento de novas tecnologias a fim de desvendar a melhor forma de aproveitamento desse subproduto (CARDONA et al., 2010).

A hemicelulose e a celulose, polissacarídeos constituintes do material lignocelulósico, podem ser transformadas através de uma reação de hidrólise em monômeros de açúcares tais como hexoses e pentoses (principalmente glicose e xilose), os quais podem ser utilizados como substrato em processos fermentativos (O'NEILL et al., 2003; MARTÍNEZ et al., 2012).

As pentoses, principais constituintes da fração hemicelulósica, são o segundo mais abundante carboidrato na biosfera (O'NEILL et al., 2003). Tais carboidratos podem ser utilizados por algumas espécies de leveduras para bioconversão em etanol, ou em outros produtos químicos de alto valor agregado, como o xilitol (CHU et al., 2007).

Todavia, a fermentação de xilose envolve uma série de dificuldades, tais como, substrato com mistura de pentoses e hexoses, presença de substâncias tóxicas geradas na hidrólise, desequilíbrio no balanço de oxido-redução do microrganismo fermentador e custos elevados dos investimentos nas instalações. Portanto, ainda não se conseguiu uma produção de etanol a partir de xilose em nível comercial, sendo necessário um estudo minucioso para viabilizar o processo de conversão (HAHN- HAGERDAL et al., 2007). Outra informação importante é que a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente empregada nas fermentações industriais, não apresenta capacidade metabólica para bioconversão de xilose em etanol (BATT et al., 1986; HAHN- HAGERDAL et al., 2007).

A biodiversidade brasileira é desmesurável quanto às leveduras capazes de metabolizar ou fermentar as pentoses, representando uma importante fonte de micro-organismos com grande potencial para a bioconversão de frações lignocelulósicas em etanol. Neste contexto se insere o presente estudo, o qual explorou a biodiversidade de leveduras isoladas de madeira em decomposição, objetivando selecionar linhagens com melhor desempenho em metabolização de xilose para a produção de etanol.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lignocelulose

A biomassa lignocelulósica é a matéria seca que constitui a maior parte do material vegetal (WYMAN, 1994). É a principal componente estrutural das plantas lenhosas e não lenhosas e a maior fonte de matéria orgânica renovável (MALBERBE, 2002; HOWARD et al., 2003). A lignocelulose constitui a biomassa mais abundante disponível na Terra, o que a torna detentora de grande valor biotecnológico (LI et al., 2013). É gerada em grandes quantidades através de práticas agrícolas e florestais, indústrias de celulose, madeira e outras agroindústrias (LEE, 1997). Existe grande interesse na sua transformação em biocombustíveis, como o bioetanol, e em outros produtos com alto valor agregado (SAHA, 2004).

As proporções dos componentes estruturais do material lignocelulósico variam de acordo com os fatores biológicos e espécie vegetal. A composição química da biomassa lignocelulósica geralmente contém de 35 a 50% de celulose, 20 a 35% de hemicelulose, 10 a 25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. O material lignocelulósico é composto por polímeros de hidratos de carbono (celulose e hemicelulose) e um polímero aromático (lignina). Tais polímeros de hidratos de carbono contêm diferentes monômeros de açúcar, compostos por seis ou cinco carbonos que estão firmemente presos à lignina (WYMAN, 1994). Em menores proporções, também podem ser encontrados na lignocelulose, resinas, ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais (NEUREITER et al., 2002).

A celulose é o mais abundante componente estrutural do material lignocelulósico (MORRIS et al., 2003). É um polímero de cadeia longa composto de um só monômero (glicose), classificado como polissacarídeo ou carboidrato. Sua estrutura se forma pela união de moléculas de β -glicose (hexosana), através de ligações β -1,4-glicosídicas (MCMILLAN, 1993).

A hemicelulose é o segundo componente mais abundante da lignocelulose, constitui-se por um polímero heterogêneo de pentoses (pentosanas), hexoses (hexosanas) e ácidos urônicos. É um polímero de baixo peso molecular em relação à celulose. As pentosanas, maior constituinte da fração hemicelulósica, por hidrólise se desdobram em pentoses (xilose e arabinose), enquanto as hexosanas, em hexoses (manose, glicose e galactose) (O'NEILL et al., 2003; ÖHGREN et al., 2006). A xilose pode ser metabolizada por algumas espécies de

leveduras para a produção de etanol ou outros produtos químicos, como o xilitol (CHU et al., 2007; CADETE et al., 2009).

A lignina, terceiro maior polímero constituinte na lignocelulose, é uma macromolécula tridimensional amorfa formada por três alcoóis de fenilpropanóides: coniferil, cumaril e sinapril. Confere rigidez, impermeabilidade e resistência contra ataques biológicos aos tecidos vegetais (FENGEL et al., 1989). A lignina é reconhecida como o único recurso natural renovável para a síntese de produtos químicos aromáticos. O seu isolamento e transformação tem atraído cada vez mais atenção para o uso em processos biotecnológicos ou produção de calor e eletricidade (JINXING et al., 2012).

A celulose, hemicelulose e lignina formam estruturas chamadas microfibrilas, organizadas em macrofibrilas, que fornecem estabilidade estrutural para a parede celular da planta (Figura 1) (RUBIN, 2008).

Figura 1 - Estrutura da Lignocelulose (RUBIN, 2008)

A obtenção do bioetanol a partir de lignocelulose é alcançada pela fermentação dos açúcares provenientes da hidrólise dos polissacarídeos constituintes da biomassa vegetal (ZHANG, 2008). O processo é realizado primeiramente através de um pré-tratamento que pode ser mecânico, químico e/ou térmico, com o objetivo de diminuir a quantidade de lignina e possibilitar a posterior hidrólise (enzimática ou ácida) (REYES et al., 1998).

As enzimas conhecidas como celulasas se subdividem em endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. São sintetizadas por micro-organismos específicos capazes de realizar a hidrólise enzimática dos polímeros que constituem a celulose (OGEDA et al., 2010). As hemicelulasas são enzimas que hidrolisam a hemicelulose: onde as enzimas denominadas xilanases são capazes de hidrolisar o polissacarídeo linear β -1,4 presente nas xilanas e produzir oligômeros, esses oligômeros são hidrolisados à xilose pelas enzimas β -xilosidases (SHALLON et al., 2003).

A hidrólise ácida consiste no tratamento da biomassa com uma solução ácida. Os ácidos normalmente utilizados são ácido sulfúrico e ácido clorídrico, mas embora sejam agentes potentes, os ácidos concentrados são tóxicos e corrosivos. Sendo assim, são necessários reatores que sejam resistentes à corrosão. Além disso, para tornar o processo economicamente viável, o ácido concentrado deve ser recuperado após o processo de hidrólise (SIVERS et al., 1995).

O processo de obtenção do etanol a partir de frações lignocelulósicas ainda é limitado basicamente devido à baixa velocidade no processo, ao elevado custo de enzimas e à grande quantidade de ácidos inorgânicos corrosivos liberados no processo (HU et al., 2013). O bioetanol lignocelulósico tem um potencial de mercado promissor, no entanto, a tecnologia do processo está em escala de demonstração. Há grande necessidade de melhorias no processo a fim de reduzir o custo de produção, proporcionando melhor rentabilidade e competitividade, que só será atingida se houver utilização total dos açúcares constituídos no material lignocelulósico (MACRELLI et al., 2012).

2.2 Bioetanol

A problemática dos combustíveis fósseis atingiu interesse global, pois além do fato desses combustíveis serem finitos, sua utilização acarreta a emissão de gases que contribuem para o efeito estufa e mudanças climáticas (WUEBBLES et al, 2001; DEMIRBAS et al., 2006; SEARCHINGER et al, 2008). O setor de transporte em todo o mundo é dependente de combustíveis à base de petróleo. A queima dos combustíveis fósseis, como óleo diesel e gasolina, é responsável por parte significativa da emissão dos gases causadores do efeito estufa (GEE), sendo o dióxido de carbono (CO_2) o gás mais produzido (WUEBBLES et al, 2001; GALLO, 2011).

Os biocombustíveis são fonte de energia renovável e desempenham um papel importante de solução sustentável, sendo uma promissora fonte de substituição aos combustíveis fósseis. Podem ser produzidos a partir da matéria orgânica, como da biomassa vegetal (RUSSO et al., 2012). O etanol é o biocombustível mais utilizado para o transporte em todo o mundo. Pode ser produzido a partir de diferentes tipos de matérias-primas que são classificadas em três categorias: açúcares simples, amido e lignocelulose (BALAT et al., 2009).

O etanol também possui grande influência econômica, pois é um biocombustível com alto índice de resistência à detonação usado em motores, eficiência que propicia melhor desempenho dos veículos automotores. Também pode ser aplicado de forma intensiva na indústria de bebidas, nos setores químicos, farmacêutico e de limpeza (PENIDO-FILHO, 1980).

Os Estados Unidos e o Brasil são os maiores produtores de etanol do mundo. Contudo, a produção nos EUA é baseada na utilização da biomassa do milho, por ser uma cultura mais adequada às condições climáticas lá encontradas, enquanto no Brasil se utiliza quase que exclusivamente a cana-de-açúcar para a produção do álcool etílico (WHEALS et al., 1999; WALTER et al., 2008; GERBENS-LEENES et al., 2012).

Segundo o United States Department of Agriculture (USDA, 2012), o Brasil é o maior produtor e exportador de açúcar e o segundo maior produtor de etanol do mundo. Em 2012, o setor sucroalcooleiro no Brasil foi responsável por aproximadamente 2% do PIB nacional e por 31% do PIB da agricultura, tendo empregado cerca de 4,5 milhões de pessoas (BIOSEV, 2013).

Dados da safra 2011/2012 afirmam que a região Centro-Sul do Brasil é responsável por aproximadamente 90% da produção de etanol e 87% da produção de açúcar do país.

Embora as exportações de etanol pelas unidades produtoras da região Centro-Sul tenham atingido 1,74 bilhão de litros até 16 de setembro de 2013, alta de 10,21% sobre o valor observado no mesmo período da safra 2012/2013, a nova estimativa da UNICA mantém a expectativa inicial de que 2,70 bilhões de litros de etanol serão exportados. Do volume total de produção esperado na safra 2013/2014 (25,04 bilhões de litros), estima-se que apenas 10,78% deverá ter como destino o mercado externo, permanecendo a maior parte (89,22%) direcionada ao abastecimento no mercado doméstico (UNICA, 2013).

Dentre as razões de se produzir etanol de cana-de-açúcar, as principais são relacionadas à produtividade, ao ciclo de vida e ao balanço energético. O custo de produção é mais baixo e a quantidade de biomassa e biocombustível produzido por área de cultivo é, dentro dos limites das tecnologias, superior a de qualquer outra cultura. A razão entre a energia obtida e a energia total utilizada para produzi-la é muito maior para o álcool de cana-de-açúcar em comparação a qualquer outro biocombustível (LEITE et al., 2007; CARIOCA et al., 2011). Com grande aporte tecnológico, por meio de geração, importação, adaptação e transferência interna, a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar avançou significativamente nos últimos trinta anos (MACEDO et al., 2007).

O rápido crescimento da população e industrialização ocasionou aumento contínuo da demanda mundial por etanol. Culturas tradicionais, como o milho e a cana-de-açúcar, são incapazes de atender a demanda global. O valor primário da alimentação humana e animal de tais culturas é um fato que influencia a escolha das fontes para produção de etanol combustível. Diante de tal realidade, os materiais lignocelulósicos são matérias-primas atraentes para a produção de etanol (SARKAR et al., 2012).

No Brasil, é possível um avanço tecnológico maior mediante o desenvolvimento de tecnologias para o melhor uso da biomassa residual da cana-de-açúcar, uma vez que esta representa cerca de dois terços da biomassa total (MACEDO et al., 2007). Em virtude do aumento das atividades na indústria sucroalcooleira, pesquisadores buscam alternativas para utilização dos subprodutos de cana-de-açúcar, como por exemplo: biomassa de levedura, vinhaça, torta de filtro, bagaço, palha, entre outros, sendo o bagaço quantitativamente mais importante (SARMENTO et al., 1999).

O bagaço de cana-de-açúcar contém cerca de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina, é um subproduto apontado como abundante fonte de biomassa lignocelulósica, o que o torna uma interessante alternativa para o aumento da produção de etanol (PANDEY et al., 2000; CARDONA et al., 2010). A contribuição da cana-de-açúcar

como suprimento de energia poderá ser superior e diversificada, com geração de produtos de maior valor agregado através do desenvolvimento de biorrefinarias (MACEDO et al., 2007).

A produção de etanol combustível continuará sendo parte significativa da indústria e poderá se tornar um sistema de agricultura potencialmente auto-sustentável se a utilização da lignocelulose for uma realidade comercial (WHEALS et al., 1999). Tecnologias estão sendo desenvolvidas a fim de permitir uma conversão rentável de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis e também em produtos químicos de alto valor agregado (GRAY et al., 2006).

2.3 Xilitol

O xilitol é um poliálcool formado por cinco carbonos em sua estrutura molecular ($C_5H_{12}O_5$), apresenta poder adoçante similar ao da sacarose e é encontrado na natureza em frutas e vegetais. Sua extração não é economicamente viável, já que a concentração de xilitol em plantas é relativamente baixa (NOLLEAU et al., 1993; MAKINEN, 2000; PETERSON, 2013).

É eficaz na substituição alimentar da sacarose, uma vez que seu metabolismo é independente de insulina, assim muito utilizado no tratamento de pessoas diabéticas (DOMINGUEZ et al., 1997; PETERSON, 2013). Diante das propriedades físicas e químicas que possui, o xilitol torna-se um composto de elevado valor agregado, dessa forma tem atraído grande interesse das indústrias farmacêutica, alimentícia e na área de dentifrícios. Sua comprovada eficiência na redução da incidência de cáries promoveu grande aplicação na área de saúde bucal (WINKELHAUSEN et al., 1998; MUSSATO et al., 2002; MISRA et al., 2011).

O xilitol em escala industrial é fabricado por redução química da xilose, porém, sua produção biológica seria mais atraente devido aos baixos custos e melhores características organolépticas. A produção por via química exige um grande aporte energético, fato esse que encarece o produto e o torna pouco competitivo em relação a outros adoçantes. O processo biotecnológico é realizado em condições de temperatura e pressão moderada, e tem, portanto, os requisitos de energia mais baixos. Essa bioconversão é altamente específica, resultando em rendimentos mais elevados e baixos custos de separação e purificação do produto, bem como efluentes mais limpos (WINKELHAUSEN et al., 1998; IKEUCHI et al., 1999; TAMBURINI et al., 2010).

A obtenção de xilitol por via biotecnológica está associada à capacidade dos micro-organismos em sintetizar a enzima xilose redutase (XR), essa enzima catalisa a redução de

xilose a xitol com a participação dos cofatores NADPH ou NADH. O xitol pode ser tanto excretado da célula, como oxidado a xilulose pela enzima xitol desidrogenase (XDH), cuja atividade requer o cofator NAD^+ . Resumidamente, a produção de xitol depende de uma elevada atividade da enzima XR ou de uma baixa atividade da enzima XDH, sendo o grau de atividade dessas enzimas um critério utilizado para identificar os melhores produtores (VAN DIJKEN, 1986; BRUINENBERG, 1986; RIZZI et al., 1989; ZENG et al., 2009; TAMBURINI et al., 2010; PAL et al., 2013).

Bactérias, fungos filamentosos e leveduras são micro-organismos capazes de realizar a bioconversão de xilose em xitol. Leveduras, principalmente as pertencentes ao gênero *Candida*, são as mais conhecidas com capacidade de realizar essa bioconversão (OH et al., 1998; GUO et al., 2006; WEST, 2009).

A produção de xitol por leveduras é influenciada pelas condições experimentais impostas durante o processo fermentativo, tais como pH, temperatura, idade e concentração do inóculo, concentração do substrato inicial, agitação, taxa de transferência de oxigênio e composição do meio (NIGAN et al., 1995; PARAJO et al., 1998a,b,c; FARIA et al., 2002). Estudar o efeito dessas condições é de fundamental importância para a produção de xitol com altos níveis de produtividade (MUSSATO et al., 2008).

2.4 Fermentação de xilose por leveduras

Grande interesse tem sido manifestado na bioconversão da xilose em etanol ou em outros produtos químicos de alto valor agregado, como o xitol. Rendimentos elevados são dependentes do uso eficiente de todos os açúcares disponíveis no material lignocelulósico (WEBB et al., 1990; CHU et al., 2007). No entanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tradicionalmente empregada no processo de produção de etanol, não apresenta capacidade metabólica para a transformação de xilose em etanol (BATT et al., 1986).

Comparado com a glicose, a xilose é mais difícil de ser assimilada e fermentada pela ação de micro-organismos (SKOOG et al., 1988). A descoberta das leveduras fermentadoras de xilose teve início na década de 80 (WEBB et al., 1990), desde então, as espécies de levedura extensivamente estudadas para a fermentação de xilose são *Pachysolen tannophilus* (SCHNEIDER et al., 1981), *Kluyveromyces marxianus* (MARGARITIS et al., 1982), *Candida shehatae* (DU PREEZ et al., 1986), *Sheffersomyces stipitis* (AGBOGBO et al., 2008; KRAHULEC et al., 2012), *Spathaspora arborariae* (CADETE et al., 2009; PEREIRA et al., 2011) e *Spathaspora passalidarum* (NGUYEN et al., 2006; HOU, 2012).

Muitas outras espécies de leveduras também são relatadas como capazes de fermentar xilose, como as dos gêneros *Brettanomyces*, *Clavispora*, *Schizosaccharomyces*. Várias outras espécies de *Candida*: *C. Tenius*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. blankii*, *C. friedrichii*, *C. solani* e *C. parapsilosis* e também espécies de *Debaromyces*: *D. nepalensis* e *D. polymorpha* (JEFFRIES, 1981; SKOOG et al., 1988; OLSSON et al., 1996).

Pesquisas relatam também a capacidade de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* que foram geneticamente modificadas ou adaptadas para fermentar xilose em etanol, tais pesquisas medem esforços para uma fermentação viável (CHU et al., 2007; HAHN-HAGERDAL et al., 2007).

O processo de bioconversão de xilose *in vitro* é afetado por diversos fatores, tais como: temperatura, concentração de xilose, pH do meio de cultivo, concentração do inóculo, estado fisiológico do inóculo e taxa de aeração (DU PREEZ, 1994).

A exploração de leveduras fermentadoras de pentoses para a produção de etanol a partir de xilose é limitada principalmente pela baixa tolerância ao etanol, lenta taxa de fermentação e também pela dificuldade em controlar a taxa de fornecimento de oxigênio ao nível ótimo. Além dessas limitações fisiológicas, o uso de hidrolisados lignocelulósicos como substrato apresenta obstáculos adicionais para uma fermentação eficiente devido à presença de inibidores, especialmente o ácido acético. A presença combinada de açúcares (hexoses e pentoses) presentes no hidrolisado também introduz dificuldades (HAHN-HAGERDAL et al., 1994), visto que hexoses podem inibir o metabolismo de xilose através de repressão e inativação dos sistemas de transporte de xilose ou de enzimas (WEBB et al., 1990).

A captação de xilose pelas células de leveduras ocorre através de proteínas transportadoras de membrana. Mais detalhadamente, o transporte de xilose ocorre por um mecanismo de difusão facilitada, onde a única força direcionadora é o gradiente do açúcar. Ocorre também por um sistema de transporte ativo (co-transporte H^+ - açúcar) (SPENCER-MARTINS, 1994; HAHN-HAGERDAL et al., 2007).

Em leveduras, o metabolismo de xilose é realizado a partir da capacidade desses micro-organismos em sintetizar as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH). No interior da célula, a xilose atravessa dois estágios, de redução e oxidação (WEBB et al., 1990).

O metabolismo de xilose em leveduras ocorre segundo o esquema descritivo abaixo e o diagrama esquemático (Figura 2) (WEBB et al., 1990; HAHN-HAGERDAL et al., 1994; LONN et al., 2003; JEFFRIES, 2006; KUHAD et al., 2011):

1. Inicialmente a xilose é transportada para o interior da célula;
2. Com a presença das coenzimas NADH e NADPH, a enzima xilose redutase (XR) converte a xilose em xilitol, liberando NAD^+ e NADP^+ respectivamente;
3. O xilitol formado pode ser tanto excretado ao meio quanto oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), na presença estrita da coenzima NAD^+ , liberando NADH;
4. A xilulose produzida é fosforilada pela enzima xiluloquinase (XK) e forma a xilulose-5-fosfato;
5. A xilulose-5-fosfato é metabolizada pela via pentose fosfato (PPP);
6. A via pentose fosfato (PPP) realiza duas fases: A fase oxidativa converte glicose-6P em ribulose-5P, CO_2 e NADH e fase não oxidativa (fase de regeneração) converte ribulose-5P em ribose-5P, xilulose-5P, sedoheptulose-7P e finalmente eritrose-4P, que através da frutose-6P e gliceraldeído-3P, retornam os carbonos para a glicólise;
7. Os metabólitos resultantes da via pentose fosfato (frutose-6P e gliceraldeído-3P) são metabolizados na glicólise (rota de Embden-Meyerhof) e são levados a piruvato;
8. O piruvato pode ser oxidado pelo Ciclo de Krebs e recuperar as coenzimas através da cadeia respiratória, ou pode também, pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, ser fermentado a etanol (neste processo é reoxidado o NADH resultante da oxidação do gliceraldeído-3P).

Figura 2 - Diagrama esquemático do metabolismo de xilose (KUHAD et al., 2011)

A enzima xilose isomerase (XI) é capaz de transformar a xilose diretamente em xilulose, tornando-se possível outra via metabólica. Esta via não produz xilitol e, é realizada por alguns procariotos, fungos e plantas, no entanto, ainda não foi descrita essa capacidade natural em leveduras. Existem espécies geneticamente modificadas para codificar essa capacidade enzimática, porém, o uso desta tecnologia está em fase de avaliação (MADHAVAN et al., 2009).

Em algumas leveduras, a enzima xilose redutase (XR) é dependente somente da coenzima NADPH, liberando NADP^+ . Em outras, a enzima XR pode utilizar ambas as coenzimas (NADPH e NADH), liberando NADP^+ e NAD^+ respectivamente. Na etapa subsequente, a enzima xilitol desidrogenase (XDH) é dependente estritamente da coenzima NAD^+ , desta forma causando desbalanço de coenzimas, o que limita o processo de fermentação de xilose para produção de etanol, pois essa específica dependência pode ocasionar um acúmulo de xilitol (VAN DIJKEN et al., 1986).

As coenzimas utilizadas pelas principais enzimas envolvidas, xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), em condições de anaerobiose, procedem com ainda maior desbalanço de coenzimas, pois a coenzima NADP^+ pode ser reduzida via frutose-6-fosfato, e a

coenzima NADH não pode ser oxidada na ausência de oxigênio. Desta forma ocorre acúmulo de xilitol e, conseqüentemente, redução da produção de etanol (JEFFRIES, 2006). Sendo assim, o controle de oxigenação ao nível ótimo é um dos fatores fisiológicos mais importantes. A aeração determina a divisão do fluxo de carbono da xilose entre crescimento celular e bioconversão. A enzima XR que tiver atividade com a presença de ambas as coenzimas poderá propiciar a produção de etanol em condições de anaerobiose (DU PREEZ, 1994; FURLAN et al., 1994).

O transporte de xilose pelas células, o metabolismo, fatores fisiológicos e parâmetros ambientais são aspectos determinantes da capacidade de conversão desse substrato em etanol. Sendo assim, considera-se de fundamental importância um estudo acurado dos mesmos para uma efetiva produtividade.

3 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo selecionar linhagens de leveduras isoladas de madeira em decomposição com capacidade de produção de etanol em meios contendo xilose como fonte de carbono.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras do Departamento de Ciências Biológicas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, Piracicaba - SP.

A metodologia foi dividida em três principais etapas:

- ✓ Isolamento e preservação de leveduras
- ✓ Reativação e inoculação em meio contendo xilose como única fonte de carbono.
- ✓ Seleção das linhagens com melhor desempenho fermentativo e inoculação das mesmas em meio contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

4.1 Meios de cultura

Os meios de cultura e suas respectivas formulações, utilizados no percorrer de todo o experimento, estão descritos a seguir:

YNBX

0,67% de *yeast nitrogen base*;

0,5% de xilose;

pH 5,0.

YEPX

1% de extrato de levedura;

1% de peptona bacteriológica;

2% de xilose;

pH 5,0;

Para preparação de YEPX sólido acrescentou-se 2% de ágar.

YEPD

1% de extrato de levedura;

1% de peptona bacteriológica;

2% de glicose.

Meio constituído de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

1% de extrato de levedura;

2% de xilose;

0,10% de celobiose;

0,45% de arabinose;

0,1% de glicose;

pH 5,0;

0,33% de ácido acético residual do processo de hidrólise.

O meio constituído de hidrolisado hemicelulósico foi preparado da seguinte forma: 400 g de bagaço seco (6,5% de umidade) previamente peneirado (<1mm) foram embebidos em 5000 ml de H₂SO₄ 1% (m/v) durante 3 dias à temperatura ambiente e aquecido em autoclave a 121°C por 60 minutos. O material foi filtrado com auxílio de seringa (3530 ml) e o resíduo de bagaço úmido (1533 g) foi novamente aquecido com 1500 ml de água (121°C por 60 minutos), recuperando-se 1130 ml de filtrado. Os filtrados foram combinados e submetidos à evaporação a vácuo (65°C) até atingir uma concentração de xilose de 20 g/L. A seguir, o concentrado teve o pH ajustado para 5,0 com NaOH, filtrado em papel e armazenado a -20°C. Para o ensaio fermentativo o hidrolisado foi suplementado com 1% de extrato de levedura.

Todos os meios de cultura foram autoclavados por 20 minutos a 121°C. Após a esterilização foi adicionado 1% de uma solução estoque dos antibióticos Clorafenicol e Tetraciclina 10.000 ppm, resultando em dosagem recomendada de 100 ppm.

4.2 Isolamento de leveduras

O procedimento de isolamento foi realizado em duas ocasiões, na primeira etapa foram obtidas 26 colônias, e na segunda, 57 colônias. O método de isolamento foi baseado no protocolo descrito por Cadete et al. (2009):

Aproximadamente 3g de tronco de árvore em decomposição foram colocados separadamente em erlenmeyers contendo 50 ml de meio líquido estéril YNBX. Os frascos foram incubados a 25°C em agitador a 150 rpm, durante 5 dias.

Após esse período, 500 µl de cada erlenmeyer foi transferido para tubos de fundo chato contendo 5 ml de meio líquido estéril YEPX. Tais tubos foram incubados sob agitação de 150 rpm, a 28°C, durante o período de 48 horas.

A partir do crescimento em YEPX, realizaram-se diluições seriadas em água estéril para obtenção de aproximadamente $4,00 \times 10^2$ células.ml⁻¹ e $2,00 \times 10^2$ células.ml⁻¹, e foram realizados plaqueamentos por superfície, onde cada placa de Petri recebeu 100 µl de cada concentração. Tal alíquota foi espalhada com auxílio de uma alça de Drigalski em meio YEPX sólido e as placas foram incubadas a 28°C durante 5 dias.

As colônias de leveduras isoladas foram semeadas por esgotamento, com o auxílio de uma alça de platina, em placas de Petri contendo o mesmo meio (YEPX sólido) e, posteriormente, as placas foram incubadas sob as mesmas condições, 28°C durante 5 dias.

Após o crescimento das colônias puras, resgataram-se as mesmas, com auxílio de uma alça de platina, em tubos de ensaio contendo 3,0 ml de meio líquido estéril YEPD. Tais tubos foram incubados a 28°C durante o período de 36 horas e, então, os cultivos em meio YEPD foram preservados com glicerol em ultra freezer a -80°C.

4.3 Micro-organismos utilizados e método de preservação

Onze linhagens de leveduras, relatadas como capazes de produzir etanol em meio constituído de xilose, foram cedidas da coleção de linhagens pertencentes à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Tais linhagens (Tabela 1), isoladas de madeira em decomposição pelo Prof. Dr. Carlos A. Rosa, foram inoculadas em meio de xilose como única fonte de carbono para posterior seleção. A linhagem nomeada HM19.1A foi utilizada como padrão.

Tabela 1 – Linhagens pertencentes a UFMG	
Linhagens da UFMG	Gênero e Espécie
HM19.1A	<i>Spathaspora arborariae</i>
HMD2.1	<i>Spathaspora passalidarum</i>
HMD14.1	<i>Spathaspora passalidarum</i>
HMD1.3	<i>Spathaspora passalidarum</i>
HMD25.1	<i>Spathaspora xylofermentans</i>
HMD32.1	<i>Sheffersomyces stipitis</i>
HM52.2	<i>Candida shehatae</i>
HM43.4	<i>Candida shehatae</i>
XM5.2	<i>Candida shehatae</i>
XMD15.2	<i>Sheffersomyces stipitis</i>
IMH43.2	<i>Sheffersomyces stipitis</i>

Quatro linhagens pertencentes ao Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras, relatadas como capazes de produzir etanol em meio constituído de xilose, também foram inoculadas em meio de xilose para posterior seleção, sendo a NRRLY7124 também utilizada nos experimentos como linhagem padrão (Tabela 2).

Tabela 2 – Linhagens pertencentes ao Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras ESALQ/USP

Linhagens	Gênero e Espécie
CBS4705	<i>Candida shehatae</i>
CBS4286	<i>Candida shehatae</i>
CBS5813	<i>Candida shehatae</i>
NRRLY7124	<i>Sheffersomyces stipitis</i>

Foram obtidos 83 isolados a partir do isolamento de madeira em decomposição. Tais isolados, juntamente com as outras linhagens identificadas, foram preservados a -80°C em microtubos eppendorf contendo: 700 µl de cada linhagem crescida em meio líquido estéril YEPD (após incubação a 28°C durante 36 horas) mais 300 µl de glicerol 70%.

4.4 Preparo do inóculo

O inóculo dos ensaios fermentativos foi preparado adicionando 100 µl de cada suspensão contida nos microtubos eppendorf (mantido na preservação) em tubos de ensaio contendo 3,0 ml de meio YEPD, que foram posteriormente incubados a 28°C durante o período de 48 horas. Após o crescimento, 100 µl de cada cultivo foram inoculados novamente em tubos de ensaio contendo 3,0 ml de meio YEPD e incubados a 28°C durante 36 horas.

4.5 Fermentações em meio sintético de xilose como fonte de carbono

Estes ensaios fermentativos foram executados através da adição de 100 µl do inóculo em tubos de fundo chato contendo 6 ml de meio de xilose como fonte de carbono (YEPX). Os tubos foram incubados a 28°C, sob agitação de 150 rpm. Uma alíquota de 1 ml foi retirada em intervalos pré-estabelecidos para realização das análises de concentração celular, quantificação de xilose e formações de etanol e xilitol.

Todos os isolados e linhagens identificadas foram submetidos a essa fermentação e, a partir dos resultados das análises, foram pré-selecionados. Foi preparado o inóculo das linhagens pré-selecionadas a partir da cultura preservada em glicerol (item 4.4) e as mesmas foram inoculadas com uma alíquota de 200 µl em tubos de fundo chato contendo 6 ml do

mesmo meio (YEPX), a 30°C, sob agitação de 150 rpm. Uma alíquota de 1 ml foi retirada em intervalos pré-estabelecidos para realização das mesmas análises.

4.6 Fermentação em meio constituído de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O ensaio fermentativo realizado em meio constituído de hidrolisado hemicelulósico foi realizado através da adição de 200 µl do inóculo em tubos de fundo chato contendo 6 ml do referido meio de cultura, que foram incubados a 28°C, sob agitação de 150 rpm. Uma alíquota (1 ml) foi retirada 3 vezes em intervalos de 10 horas para realização das análises de concentração celular, quantificação de xilose e formações de etanol e xilitol.

4.7 Análises de concentração celular e quantificações de xilose, etanol e xilitol

A concentração celular foi determinada por absorbância com o auxílio de espectrofotômetro (densidade ótica D.O._{600nm}) a partir de uma curva de calibração. A quantificação de xilose e as formações de etanol e xilitol foram estimadas em g L⁻¹, mediante cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Para tanto, empregou-se a coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H BioRad (Hercules, CA, USA) a 65°C, utilizando-se H₂SO₄ 5 mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6 ml.min⁻¹ e detector de índice de refração GC 410 (Instrumentos Científicos C.G. LTDA, São Paulo, Brasil), conforme descrito por Alves (1994).

4.7.1 Fator de conversão de xilose em etanol

O fator de conversão foi calculado a partir da seguinte equação:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta p}{\Delta s} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i}$$

Nesta equação Pf e Pi são as concentrações final e inicial do produto (etanol em g L⁻¹) e Sf e Si são as concentrações final e inicial do substrato (xilose em g L⁻¹) (LOURENÇO, 2009).

4.8 Análises estatísticas

Para verificar a disposição dos tipos morfológicos dos isolados de acordo com as variáveis (etanol e xilitol em g L⁻¹), foi realizada uma análise de componentes principais (PCA). Para a realização desta análise multivariada, utilizou-se o software CANOCO 4.5 (TER BRAAK & SMILAUER, 2002).

A fim de verificar diferenças significativas entre as linhagens selecionadas quanto à produção de etanol (g L⁻¹) e fator de conversão (Y p/s), foram realizadas análises de variância (ANOVA) e testes de comparação de médias de Tukey no software PAST, utilizando as médias referentes às triplicatas de cada linhagem. As médias foram consideradas diferentes ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (HAMMER et al., 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Leveduras isoladas

Como já mencionado no item 4.3, foram obtidas 83 colônias de leveduras do isolamento de madeira em decomposição. Dentre o total, obtiveram-se três tipos de perfil morfológico, sendo eles:

Perfil morfológico tipo 1: Foi caracterizado por colônias amareladas e lisas. Em microscópio foram observadas células pequenas com formato esférico (Figura 3). Em meio YEPD líquido foi verificado crescimento, porém com o meio ainda com aspecto translúcido, depósito de biomassa no fundo compacto e fácil ressuspensão. Este perfil morfológico foi encontrado em 60 colônias, sendo assim, considerado o perfil dominante.

Figura 3 - Perfil morfológico tipo 1, verificado em placa de Petri e análise microscópica com objetiva de 40x

Perfil morfológico tipo 2: Caracterizado por colônias brancas e lisas. Em microscópio foram observadas células com formatos irregulares em vários grupamentos (Figura 4). Em meio YEPD líquido foi verificado crescimento tornando o meio com aspecto levemente turvo, depósito de biomassa no fundo não compacto e fácil ressuspensão. Este perfil foi encontrado em 19 colônias.

Figura 4 - Perfil morfológico 2, verificado em placa de Petri e análise microscópica com objetiva de 40x

Perfil morfológico 3: Neste tipo morfológico foram observadas colônias brancas e rugosas. Em microscópio foram observadas células com formatos irregulares e a presença de algumas pseudo-hifas (Figura 5). Em meio YEPD líquido foi verificado crescimento tornando o meio com aspecto levemente turvo, com película de biomassa na superfície, depósito de biomassa no fundo compacto e difícil ressuspensão. Este perfil foi encontrado em somente 4 colônias.

Figura 5 - Perfil morfológico 3, verificado em placa de Petri e análise microscópica com objetiva de 40x

5.2 Fermentações em meio YEPX

5.2.1 Crescimento celular dos isolados

A partir dos ensaios fermentativos realizados em meio YEPX (item 4.5), foram realizadas as análises de densidade ótica para determinação de crescimento celular das linhagens obtidas da primeira etapa do isolamento. Primeiramente foram analisadas 26 amostras juntamente com 2 linhagens padrão (HM19.1A e NRRLY7124). Tais análises foram realizadas 3 vezes em intervalos de 12 horas, para assim ser traçado o perfil de crescimento de cada linhagem.

Todas as linhagens apresentaram crescimento celular satisfatório. Pelos resultados expostos na Figura 6, verifica-se que todas as linhagens apresentaram pico de crescimento no período de 36 horas. Os isolados nomeados I17, I15, I14, I11 e I6 foram os que apresentaram maior concentração celular, em ordem decrescente, no último período. Já os isolados I4 e I7, assim como a linhagem padrão NRRLY7124, exibiram menor concentração celular para este período.

Figura 6 - Perfis de crescimento medido por D.O. (600nm) nos tempos de 12, 24 e 36 horas das linhagens obtidas da primeira etapa do isolamento

Na etapa seguinte, foram analisadas quanto ao crescimento celular, as linhagens obtidas da segunda etapa do isolamento, ou seja, 57 amostras mais 2 linhagens padrão (HM19.1A e NRRL Y7124). Verifica-se na Figura 7 que a maioria das linhagens apresentou picos mais elevados já no período de 24 horas, sendo as linhagens nomeadas I28, I34 e I50 as que apresentaram maior crescimento celular neste período. No período de 36 horas as linhagens que se destacaram com maior concentração celular foram as I32, I28, I34, I31 e I50. As linhagens I52, I61, I68 e I66 apresentaram menor concentração celular no último período.

Figura 7 - Perfis de crescimento medido por D.O. (600nm) nos tempos de 12, 24 e 36 horas das linhagens obtidas da segunda etapa do isolamento

5.2.2 Capacidade fermentativa dos isolados

Foram realizadas as análises para quantificação de etanol dos isolados obtidos da primeira etapa do isolamento, ou seja, 26 amostras juntamente com 2 linhagens padrão (HM19.1A e NRRLY7124). Dentre estas, somente 9 linhagens não apresentaram capacidade de conversão de xilose em etanol. Os isolados com essa capacidade apresentaram uma variação de produção de 1,13 até 6,58 g L⁻¹ no período de 36 horas (Figura 8). As linhagens nomeadas I3 (6,58 g L⁻¹), I24 (6,42 g L⁻¹), I20 (6,39 g L⁻¹), I23 (5,88 g L⁻¹) e I25 (5,63 g L⁻¹) foram as que exibiram os maiores valores de etanol nessa respectiva ordem de produção. As linhagens padrão HM19.1A e NRRLY7124 produziram 3,43 g L⁻¹ e 3,21 g L⁻¹ de etanol, respectivamente, no período de 36 horas.

Figura 8 - Produção de etanol (g L⁻¹) no período de 36 horas, linhagens obtidas da primeira etapa do isolamento e linhagens padrão, inoculadas em meio YEPX. Barras mais claras correspondem as linhagens com maior produtividade

Quanto à produção de xilitol, todos os 26 isolados inoculados em meio YEPX apresentaram tal capacidade, variando de 0,26 até 8,66 g L⁻¹ no período de 36 horas (Figura 9). Os isolados I3, I24, I20, I23 e I25, destacados acima com maior capacidade de produção de etanol, apresentaram baixa produção de xilitol e também uma concentração celular mediana (Figura 6), o que evidencia a capacidade dos mesmos de utilização da fonte de carbono preferencialmente para conversão em etanol.

Nove linhagens se destacaram como maiores produtoras de xilitol (Figura 9). As linhagens nomeadas I5 (8,66 g L⁻¹), I15 (7,21 g L⁻¹), I14 (6,89 g L⁻¹), I13 (6,52 g L⁻¹), I16 (6,52 g L⁻¹), I12 (6,18 g L⁻¹), I26 (6,01 g L⁻¹), I22 (5,86 g L⁻¹) e I19 (5,80 g L⁻¹) foram as

maiores produtoras de xilitol nessa respectiva ordem de produção. A linhagem padrão HM19.1A produziu baixa quantidade de xilitol ($0,68 \text{ g L}^{-1}$), e a linhagem padrão NRRLY7124 apresentou produção nula.

Figura 9 - Produção de xilitol (g L^{-1}) no período de 36 horas, linhagens obtidas da primeira etapa do isolamento e linhagens padrão, inoculadas em meio YEPX. Barras mais claras correspondem as linhagens com maior produtividade

No ensaio fermentativo subsequente foram analisadas as linhagens obtidas da segunda etapa do isolamento, ou seja, 57 amostras mais as 2 linhagens padrão. Nesta etapa somente duas linhagens não apresentaram capacidade de bioconversão de xilose em etanol (Figura 10), sendo elas: I66 e I68. As linhagens com essa capacidade apresentaram uma variação de produção de $0,60$ até $4,51 \text{ g L}^{-1}$ no período de 36 horas. Destacando-se como maiores produtoras de etanol, nesta respectiva ordem de produção, as linhagens nomeadas I29 ($4,51 \text{ g L}^{-1}$), I38 ($4,31 \text{ g L}^{-1}$), I47 ($4,14 \text{ g L}^{-1}$), I65 ($4,13 \text{ g L}^{-1}$), I54 ($4,13 \text{ g L}^{-1}$) e I41 ($4,06 \text{ g L}^{-1}$). Tais linhagens apresentaram baixos valores de concentração celular (Figura 7), sendo assim, pode-se supor que as mesmas utilizaram a fonte de carbono preferencialmente para a conversão em etanol. As linhagens padrão HM19.1A e NRRLY7124 apresentaram uma produção de etanol de $3,54 \text{ g L}^{-1}$ e $2,95 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 10 - Produção de etanol (g L^{-1}) no período de 36 horas, linhagens obtidas da segunda etapa do isolamento e linhagens padrão, inoculadas em meio YEPX. Barras mais claras correspondem as linhagens com maior produtividade

Somente três linhagens obtidas da segunda etapa do isolamento não apresentaram capacidade de bioconversão de xilose em xilitol (Figura 11). A produção de xilitol variou de 0,04 até $6,75 \text{ g L}^{-1}$ no período de 36 horas. As linhagens nomeadas I68 ($6,75 \text{ g L}^{-1}$), I66 ($6,60 \text{ g L}^{-1}$) e I52 ($6,24 \text{ g L}^{-1}$) foram as maiores produtoras nesse período. Tais linhagens apresentaram baixo crescimento celular, de acordo a Figura 7. Sendo assim, pode-se propor que as mesmas utilizaram a fonte de carbono preferencialmente para conversão em xilitol, já que as linhagens nomeadas I52, I66, I68 e I71 apresentaram pouca ou nenhuma produção de etanol. A linhagem padrão HM19.1A apresentou uma produção de xilitol de $0,72 \text{ g L}^{-1}$ e a linhagem NRRLY7124 não apresentou capacidade de bioconversão no período de 36 horas.

Figura 11 - Produção de xilitol (g L^{-1}) no período de 36 horas, linhagens obtidas da segunda etapa do isolamento e linhagens padrão, inoculadas em meio YEPX. Barras mais claras correspondem as linhagens com maior produtividade

Apesar do fato de que os métodos de isolamento, realizados através da utilização de meios de cultura sólidos, tenham a eficácia de nos fornecer somente uma fração da população microbiana, devido à presença de micro-organismos não cultiváveis (AGNOLUCCI et al., 2009), todas as linhagens de leveduras obtidas a partir deste isolamento de madeira em fase de decomposição foram capazes de crescer em meio constituído de xilose como fonte de carbono. Sendo que a maioria delas apresentou a capacidade de bioconversão da xilose fornecida em etanol, o que é um resultado satisfatório para o objetivo empregado neste estudo. Madeira em fase de decomposição constitui-se de uma excelente fonte de micro-organismos com capacidade de degradação de material lignocelulósico, pois o isolamento microbiano proveniente desse material tem proporcionado uma grande variedade de espécies de leveduras com interessante potencial de bioconversão de xilose, açúcar integrante da fração hemicelulósica, em etanol (CADETE et al., 2009; MORAIS et al, 2013; CADETE et al., 2012).

Ao analisar os resultados, tornou-se possível constatar que os isolados obtidos caracterizados pelo perfil morfológico tipo 1, o perfil dominante, apresentaram diferentes vias de produção ao utilizar a xilose como fonte de carbono. Pois, enquanto alguns produziram somente etanol, outros produziram etanol e xilitol ou, até mesmo, produziram somente xilitol (Figura 12).

Já os isolados caracterizados pelo perfil morfológico tipo 2 apresentaram uma específica capacidade de produção de etanol (1,68 até 5,58 g L⁻¹), sendo que nenhum deles produziu somente xilitol. A produção de xilitol para os isolados que apresentaram essa capacidade, dentro deste perfil, variou de 0,04 até 0,49 g L⁻¹, o que é uma produção considerada muito baixa deste produto intermediário no metabolismo de xilose realizado por leveduras (TAYLOR et al., 1990). Desta forma, pode-se sugerir que os isolados com perfil morfológico tipo 2, por possuírem uma via muito similar entre eles, dando preferência para produção de etanol, apresentaram uma correlação entre o tipo morfológico e o perfil metabólico encontrado (produção de etanol) (Figura 12).

O parâmetro utilizado para pré-selecionar as linhagens obtidas do isolamento foi a produção de etanol em g L⁻¹ (Tabela 3). A partir das análises de morfologia, crescimento celular, quantificação de xilose e formações de etanol e xilitol, observou-se que na primeira etapa do isolamento, todas as linhagens que apresentaram maiores valores de etanol eram as do perfil morfológico tipo 2. Então, foram selecionadas cinco linhagens caracterizadas com esse perfil que exibiram os maiores valores de etanol em g L⁻¹, sendo elas: I3, I20, I23, I24 e I25.

Na segunda etapa do isolamento foram pré-selecionadas dez linhagens com maior produção de etanol, sendo cinco com perfil morfológico tipo 1 (I38, I41, I47, I53 e I54) e cinco com perfil morfológico tipo 2 (I29, I35, I61, I65 e I67) (Tabela 3).

Os isolados caracterizados pelo perfil morfológico tipo 3 não apresentaram capacidade de produção de etanol (ou produção insignificante) a partir de xilose, no entanto, todos apresentaram capacidade de produção de xilitol, sendo eles: I52, I66, I68, e I71, representados pela cor azul na Figura 12. Tal informação enfatiza aquela suposição de que pode haver, também neste caso, uma correlação entre o tipo morfológico e o perfil metabólico encontrado (produção de xilitol).

Desta forma, 15 isolados dentre os perfis morfológicos tipos 1 e 2 foram pré-selecionados para realização dos ensaios fermentativos posteriores, como pode ser observado nas numerações descritas na Figura 12 e Tabela 3.

A análise de componentes principais (PCA) (Figura 12) exhibe a disposição dos 3 tipos morfológicos, sendo cada tipo representado por uma cor, em relação às variáveis etanol e xilitol.

Tabela 3 - Parâmetros fermentativos dos isolados pré-selecionados

Isolados	Etanol^a	Y p/s^b	Xilose residual^c
I3	6,59	0,44	-
I20	6,39	0,42	-
I23	5,88	0,39	-
I24	6,42	0,43	-
I25	5,63	0,37	-
I29	4,52	0,32	2,09
I35	3,43	0,30	4,55
I38	4,31	0,27	-
I41	4,06	0,26	0,30
I47	4,15	0,26	0,09
I53	3,56	0,22	0,03
I54	4,13	0,26	-
I61	3,83	0,30	3,24
I65	4,14	0,29	1,66
I67	3,43	0,26	2,62

^a Produção de etanol em g L⁻¹ no período de 36 horas

^b Yp/s (g g⁻¹) g de etanol produzido / g de xilose consumida no período de 36 horas

^c Xilose residual no período de 36 horas

Figura 12 - Análise de componentes principais (PCA) realizada no software CANOCO 4.5, mostrando a disposição dos tipos morfológicos e das variáveis etanol e xilitol (g L^{-1}). As numerações se referem aos 15 isolados pré-selecionados e as cores aos tipos morfológicos, sendo o perfil morfológico tipo 1 representado pela cor amarela, tipo 2 pela cor vermelha e tipo 3 pela cor azul

Na Figura 12 observa-se os 3 tipos morfológicos em relação às variáveis etanol e xilitol. As linhagens do tipo morfológico 1 estão dispersas por todo o gráfico, mostrando que há uma heterogeneidade metabólica, com algumas linhagens mais relacionadas à produção de etanol, outras à produção de xilitol e outras à produção de ambos.

Já os isolados do tipo morfológico 2 apresentaram um perfil metabólico mais homogêneo, estando mais relacionados à produção de etanol. Mesma homogeneidade metabólica foi observada para as linhagens do tipo 3, com a diferença que estas últimas se relacionaram com a produção de xilitol, com quase nenhuma produção de etanol.

5.2.3 Crescimento celular das linhagens identificadas

As linhagens identificadas descritas nas tabelas 1 e 2 (item 4.3) foram analisadas, quanto ao crescimento celular, nos intervalos de 12, 24 e 36 horas (Figura 13). Tais linhagens apresentaram diferentes perfis de crescimento, pois enquanto algumas apresentaram máxima concentração celular já no período de 24 horas (HMD32.1 e HMD14.1), outras apresentaram maior concentração celular no último período. Neste ensaio fermentativo destacaram-se as linhagens HM32.1, HM19.1A e HMD2.1 com maior crescimento no período de 24 horas, e as linhagem HM19.1A, HMD2.1, HM43.4 e XM5.2 no período de 36 horas.

Figura 13 - Perfis de crescimento medido por D.O. (600nm) nos tempos de 12, 24 e 36 horas das linhagens identificadas

5.2.4 Capacidade fermentativa das linhagens identificadas

Foram realizadas as análises para quantificação de etanol (g L^{-1}) das linhagens identificadas descritas nas tabelas 1 e 2 (item 4.3), inoculadas em meio YEPX. Neste ensaio fermentativo todas as linhagens apresentaram capacidade de bioconversão da xilose em etanol (Figura 14), sendo as linhagens CBS4286 ($0,38 \text{ g L}^{-1}$) e HMD25.1 ($2,12 \text{ g L}^{-1}$) as que apresentaram menor produção no período de 36 horas. As linhagens HM52.2 ($7,32 \text{ g L}^{-1}$), XM5.2 ($7,18 \text{ g L}^{-1}$), HMD1.3 ($6,87 \text{ g L}^{-1}$) e HM43.4 ($5,72 \text{ g L}^{-1}$) foram as maiores produtoras

de etanol no período de 24 horas. No último período (36 horas), as linhagens HMD2.1 (6,16 g L⁻¹), CBS5813 (6,10 g L⁻¹), HMD1.3 (5,16 g L⁻¹) e HM43.4 (5,90 g L⁻¹) foram as que apresentaram maior produção de etanol nessa respectiva ordem. Algumas linhagens apresentaram pico de produção de etanol logo no período de 24 horas e, após este período, verifica-se uma queda na produção. Uma justificativa para tal comportamento pode ser dada no sentido de que quando não havia mais xilose no meio, as leveduras consumiram o etanol produzido.

Figura 14 - Produção de etanol em g L⁻¹ nos tempos de 12, 24 e 36 horas das linhagens identificadas

Quando as leveduras são crescidas em meios de cultura através de métodos laboratoriais (*in vitro*), passam primeiramente pelo período de adaptação, denominado fase lag. Posteriormente, as células de leveduras se reproduzem utilizando a energia resultante da fermentação da fonte de carbono, produzindo etanol (fase log ou exponencial). Após esta fase, devido ao esgotamento da fonte de carbono, as células param de se dividir por um pequeno período (fenômeno conhecido como troca diaúxica) e alteram a expressão de seus genes. Então, as células utilizam o próprio etanol produzido e desta forma realizam respiração, tal comportamento é denominado fase pós-diaúxica (HERMAN, 2002; JEFFRIES, 2000).

Com relação à produção de xilitol (Figura 15), somente 3 linhagens se destacaram como maiores produtoras: HMD25.1 (3,16 g L⁻¹), HM19.1A (2,09 g L⁻¹) e CBS4286 (2,00 g L⁻¹).

Figura 15 - Produção de xitol em g L⁻¹ nos tempos de 12, 24 e 36 horas das linhagens identificadas

A linhagem *Sheffersomyces stipitis* nomeada NRRLY7124 apresentou pico de produção de etanol no período de 36 horas com um valor de 3,23 g L⁻¹ (Figura 14). Quanto ao crescimento celular, apresentou desempenho mediano se comparado com outras linhagens testadas neste mesmo ensaio fermentativo (Figura 13). Esta linhagem apresentou também uma produção muito baixa de xitol (0,04 g L⁻¹) no período de 24 horas (Figura 15), sendo que no ultimo período já não havia evidência alguma da produção de xitol. Este mesmo comportamento (produção nula xitol) foi verificado nos ensaios anteriores a este, onde esta linhagem foi utilizada como padrão dos isolados. Contudo, pode-se supor que a via realizada pela NRRLY7124, por não ter excretado xitol para fora da célula, favoreceu a desidrogenação do xitol a xilulose e assim ocasionou um acúmulo de etanol.

Furlan et al. (1994) investigaram diferentes leveduras, incluindo a *Sheffersomyces stipitis* NRRLY7124, para selecionar estirpes mais apropriadas para converter xilose em

etanol. Como resultado similar ao presente ensaio fermentativo, não houve produção alguma de xilitol por esta linhagem.

Outra informação complementar é que Furlan et al. (1994) utilizaram a taxa de arejamento como um parâmetro variável durante o processo fermentativo. Experimentos de fermentação foram realizados em condições micro-aeróbias e aeróbias. Os resultados sugerem que condições micro-aeróbicas são as mais adequadas às condições de funcionamento para fermentação de xilose com *Sheffersomyces stipitis* NRRLY7124, onde após 104 horas de fermentação foi apresentada por esta linhagem uma produção de 15 g L^{-1} de etanol, sendo que a concentração inicial do substrato foi de 50 g L^{-1} de xilose.

Outra linhagem *Sheffersomyces stipitis*, nomeada HMD32.1, apresentou capacidade de produção muito similar nos tempos de 24 e 36 horas, sendo os valores específicos: 4,21 e 4,52 g L^{-1} de etanol, respectivamente (Figura 14). Esta linhagem apresentou crescimento celular mediano (Figura 13) e também valores baixos de xilitol, sendo sua produção máxima de 0,15 g L^{-1} de xilitol no tempo de 24 horas (Figura 15). Linhagens também pertencentes à espécie *Sheffersomyces stipitis*: XMD15.2 e IMH43.2, apresentaram valores de produção similares entre elas, sendo suas produções máximas de etanol de 3,30 e 2,51 g L^{-1} , no período de 24 horas (Figura 14). Estas também apresentaram crescimento celular mediano (Figura 13) e baixa produção de xilitol, sendo os valores máximos de xilitol: 0,28 e 0,68 g L^{-1} , respectivamente, no período de 36 horas (Figura 15).

Segundo Papini et al. (2012), a levedura *Scheffersomyces stipitis*, mais conhecida como *Pichia stipitis*, quando imposta a condições estritamente anaeróbicas, praticamente não consegue produzir etanol e também não sobrevive mais do que uma geração. A regulação da fermentação em *S. stipitis* depende dos níveis de oxigênio, onde a produção de etanol ocorre em maior quantidade apenas quando o oxigênio se torna limitante.

De acordo com Dellweg et al. (1989), a desidrogenação de xilitol a xilulose foi confirmada como sendo o passo limitante na velocidade e capacidade fermentativa realizada por *Scheffersomyces stipitis*. Sob condições de aerobiose, a xilose é quase que exclusivamente metabolizada por intermédio da redução da coenzima NADPH como doadora de elétrons, ao passo que, na ausência de oxigênio, cerca de 85% da xilose é reduzida por intermédio da coenzima NADH. Ou seja, em aerobiose, a xilose primeiramente é reduzida a xilitol quase que exclusivamente com a presença da coenzima NADPH, e na ausência de oxigênio, NADH é a preferencial coenzima doadora de elétrons. As atividades das duas enzimas chave, xilose redutase e xilitol desidrogenase, parecem estar sob o controle de

inibição ou não inibição competitiva com os substratos, produtos e coenzimas. Estes regulamentos podem explicar o comportamento cinético desta levedura, pois de modo geral, em condições aeróbicas *Scheffersomyces stipitis* pode crescer em xilose, com taxas de crescimento específicas reduzidas. Na ausência de oxigênio a xilose é convertida em etanol e xilitol enquanto que em condições limitadas de oxigênio, a produção de etanol é aumentada, a respiração é controlada e o xilitol não é formado.

A linhagem *Spathaspora arborariae* HM19.1A, espécie fermentadora de xilose recentemente isolada no Brasil (CADETE et al., 2009), apresentou produção de etanol bastante similar nos períodos de 24 e 36 horas, sendo os valores de produção de etanol 2,28 e 2,32 g L⁻¹, respectivamente (Figura 14). Esta linhagem foi a que apresentou, neste ensaio fermentativo, maior concentração celular (Figura 13). Uma justificativa para tal comportamento é que, como constatado por Prompt (2012), estas novas espécies de *Spathaspora* preferem consumir os açúcares de forma oxidativa e, geralmente, são altas as concentrações celulares obtidas pelas mesmas.

Também pode ser verificado na Figura 15 que, depois da linhagem nomeada HMD25.1 *Spathaspora xylofermentans* (3,16 g L⁻¹ de xilitol), a linhagem HM19.1A foi a que apresentou maior produção de xilitol (2,09 g L⁻¹) no período de 36 horas (Figura 15). Neste sentido, pode-se sugerir que, neste caso, a produção de etanol é desviada para a produção de xilitol, o que pode ser uma consequência direta do desbalanço de coenzimas entre a xilose redutase, às vezes NADPH dependente, e xilitol desidrogenase, estritamente dependente da coenzima NAD⁺ (PROMPT, 2012).

Segundo Mouro (2012), a levedura *S. arborariae*, HM19.1A, embora tenha apresentado a enzima xilose redutase dependente de NADPH, fermenta eficientemente a xilose devido apresentar um sistema de co-transporte H⁺-xilose de alta capacidade, o que pode contribuir para sua eficiência fermentativa, pois o transporte de xilose para dentro da célula é considerado um dos fatores limitantes no metabolismo da xilose.

A linhagem *Spathaspora passalidarum* nomeada HMD2.1 apresentou produção de etanol de 5,47 e 6,16 g L⁻¹, nos períodos de 24 e 36 horas (Figura 14), e produção máxima de 0,39 g L⁻¹ de xilitol no período de 24 horas, ou seja, uma produção considerada muito baixa de xilitol (Figura 15). Tal linhagem, juntamente com HM19.1A, obteve as maiores concentrações celulares nos períodos analisados (Figura 13). Outras linhagens, pertencentes à espécie *Spathaspora passalidarum*, HMD1.3 e HMD14.1, obtiveram bom desempenho fermentativo em meio constituído de xilose como única fonte de carbono. A linhagem HMD1.3 apresentou

pico de produção de etanol ($6,87 \text{ g L}^{-1}$) no período de 24 horas (Figura 14), e a concentração celular obtida por essa linhagem se comparada com as outras testadas neste ensaio, foi considerada mediana (Figura 13). No que se diz respeito à produção de xilitol, foi considerada muito baixa, com uma máxima de $0,28 \text{ g L}^{-1}$ (24 horas) (Figura 15). A linhagem HMD14.1, pertencente ao mesmo gênero e espécie, apresentou um valor máximo de produção de etanol de $4,72 \text{ g L}^{-1}$, no tempo de 36 horas (Figura 14), e também apresentou baixa concentração celular e pouca produção de xilitol (Figuras 13 e 15).

De acordo com Mouro (2012), linhagens do gênero *Spathaspora* são geralmente muito eficientes em assimilar a xilose. Tal autor relatou que todas as linhagens pertencentes a esse gênero testadas em seu estudo, incluindo HMD1.3, consumiram a xilose (concentração inicial de 2%) em menos de 20 horas e apresentaram uma produção de 5 a 6 g L^{-1} de etanol. Também relatou que em leveduras *S. passalidarum* as enzimas envolvidas na metabolização de xilose apresentaram maior atividade, e também mais especificamente, a enzima xilose redutase tem maior afinidade para a coenzima NADH, em relação ao NADPH, enquanto que a enzima xilitol desidrogenase demonstra uma total dependência de NAD^+ . Neste sentido, tais leveduras, pertencentes a esta espécie, tornam-se muito interessantes, já que uma das limitações mais importantes do metabolismo de xilose em leveduras é o desbalanço de coenzimas.

Neste ensaio fermentativo as linhagens foram pré-selecionadas de acordo com os maiores valores de produção de etanol em g L^{-1} (Tabela 4). As linhagens HM52.2 *Candida shehatae*, XM5.2 *Candida shehatae*, HMD1.3 *Spathaspora passalidarum* e HM43.4 *Candida shehatae* foram as que apresentaram maior capacidade de produção de etanol no período de 24 horas, ou seja, possuem essa capacidade com mais rapidez se comparadas com as outras linhagens analisadas neste mesmo ensaio fermentativo (Figura 14). Ao observar as análises de crescimento celular (Figura 13), verifica-se que as linhagens HM43.4 e XM5.2 apresentaram também elevados valores de concentração celular no período de 36 horas, o que significa que as mesmas além de produzirem maiores valores de etanol, apresentaram também alta capacidade de crescimento celular em meio constituído de xilose. Referente à produção de xilitol, as linhagens pré-selecionadas apresentaram pouca produção (menor que $0,30 \text{ g L}^{-1}$) (Figura 15). Então, a partir dos resultados das análises de crescimento celular, quantificações de xilose, etanol e xilitol, pode-se sugerir que as linhagens HM52.2 e HMD1.3 utilizaram a fonte de carbono preferencialmente para produção de etanol e as linhagens HM43.4 e XM5.2 utilizaram a xilose tanto para conversão em etanol, quanto para crescimento celular.

Tabela 4 - Parâmetros fermentativos das linhagens (UFMG) pré-selecionadas

Linhagens	Etanol (24h)^a	Y p/s (24h)^b	Xilose (24h)^c
HM52.2 <i>Candida shehatae</i>	7,32	0,41	0,22
XM5.2 <i>Candida shehatae</i>	7,18	0,39	0,07
HMD1.3 <i>Spathaspora passalidarum</i>	6,88	0,40	1,03
HM43.4 <i>Candida shehatae</i>	5,73	0,37	2,68

Linhagens	Etanol (36 h)^d	Y p/s (36h)^e	Xilose (36h)^f
HM52.2 <i>Candida shehatae</i>	4,87	0,27	-
XM5.2 <i>Candida shehatae</i>	4,92	0,27	-
HMD1.3 <i>Spathaspora passalidarum</i>	5,17	0,28	-
HM43.4 <i>Candida shehatae</i>	5,09	0,28	-

^a Produção de etanol em g L⁻¹ no período de 24 horas^b Yp/s (g g⁻¹) g de etanol produzido / g de xilose consumida no período de 24 horas^c Xilose residual no período de 24 horas^d Produção de etanol em g L⁻¹ no período de 36 horas^e Yp/s (g g⁻¹) g de etanol produzido / g de xilose consumida no período de 36 horas^f Xilose residual no período de 36 horas

Alguns estudos encontrados na literatura referentes à espécie de levedura *Candida Shehatae* relatam que a mesma é muito eficiente em converter a xilose em etanol quando está em condições onde o oxigênio é limitado. Tais estudos reportam que a mesma parece ter um comportamento descrito como Cabtree-negativo, que desenvolve crescimento celular e libera dióxido de carbono, quando não há nenhuma limitação de nutrientes, mas pode produzir etanol em condições limitadas de oxigênio (HAHN-HAGERDAL et al., 2006; DU PREEZ, 1994; DU PREEZ et al., 1986; ALEXANDER et al., 1988).

Segundo Slininger et al. (1990), o pH 4,5 é o mais recomendável para fermentação de xilose por *Sheffersomyces stipitis*, minimizando até mesmo a possibilidade de contaminação. Du Preez (1994) relatou que a temperatura ótima para produção de etanol pelas espécies fermentadoras de xilose, principalmente pertencentes ao gênero *Sheffersomyces* e *Candida*

encontra-se entre 28 e 32°C, sendo que essa faixa pode variar dependendo da concentração do açúcar e tipo de substrato. Em leveduras *S. stipitis* e *C. shehatae*, a produtividade específica e produtividade volumétrica de etanol ocorre a uma temperatura de 30°C (DU PREEZ et al., 1986). O etanol produzido pelas células de leveduras aliado às condições de cultivo, principalmente a temperatura, pode causar um efeito inibitório no metabolismo das mesmas, pois pode ocasionar alterações na membrana citoplasmática e nos mecanismos de transporte de xilose (HAHN-HAGERDAL et al., 1994).

Diante de discussões referentes às linhagens fermentadoras de xilose testadas neste ensaio fermentativo, pode ser enfatizado que a capacidade de tais linhagens, já conhecidas como fermentadoras de xilose para conversão em etanol, está quase sempre relacionada com os níveis de oxigenação impostos às mesmas.

O oxigênio exerce um papel fundamental no equilíbrio de oxidação e redução durante o metabolismo de xilose, no transporte de xilose para dentro da célula, no desenvolvimento de crescimento celular e na função mitocondrial (JEFFRIES et al., 2004; JIN et al., 2004; VERDUYN et al., 1985; LIGTHELM et al., 1988). Diante disso, o processo fermentativo em meio de xilose visando à produção de etanol pode ser favorecido se houver estudos minuciosos a fim de desvendar a necessidade específica de oxigenação exigida por cada espécie fermentadora para conversão no produto de interesse.

5.2.5 Crescimento celular das linhagens pré-selecionadas

Foram determinados os perfis de crescimento celular das 19 linhagens pré-selecionadas descritas nas tabelas 3 (item 5.2.2) e 4 (item 5.2.4). Tais análises foram executadas 4 vezes em intervalos de 10 horas no decorrer do ensaio fermentativo. Neste ensaio, 200 µl de cada pré-inóculo foi adicionado ao meio YEPX. Os tubos contendo cada meio inoculado foram incubados a 30°C, sob agitação de 150 rpm. Os isolados I38 e I41 foram os que apresentaram maior crescimento celular no período de 40 horas. De modo geral, a maioria das linhagens de leveduras testadas neste experimento apresentou maior produção no ultimo período analisado (40 horas) (Figura 16). Os isolados I65 e I67 apresentaram menor desempenho quanto ao crescimento em todos os períodos.

Figura 16 - Perfis de crescimento medido por D.O. (600nm) nos tempos de 10, 20, 30 e 40 horas das linhagens pré-selecionadas

5.2.6 Capacidade fermentativa das linhagens pré-selecionadas

As linhagens pré-selecionadas inoculadas em meio YEPX, de acordo com as informações de condições descritas no item anterior (item 5.2.5), apresentaram uma variação de produção de 0,65 até 5,67 g L⁻¹ de etanol no tempo de 24 horas e 2,07 até 3,63 g L⁻¹ no período de 30 horas. Pode ser observado no gráfico abaixo (Figura 17) que devido as condições diferenciadas colocadas para este experimento (200 µl de inóculo e temperatura 30°C), as linhagens nomeadas XM5.2 e HM43.4 apresentaram um comportamento bastante diferente. Tais linhagens obtiveram produção igual no período de 36 horas, com um valor máximo de 3,13 g L⁻¹ de etanol, sendo que no experimento anterior as mesmas mostraram maiores valores de produção de etanol. Como este ensaio fermentativo foi diferenciado por duas variáveis, justificar o que causou essa queda de produção de etanol torna-se mais especulativo. As linhagens HMD1.3 (5,67 g L⁻¹) e HM52.2 (4,79 g L⁻¹) foram as que produziram mais etanol no presente ensaio, mas também com valores menores do que os encontrados no ensaio realizado anteriormente. Na Figura 17 pode ser observado que as linhagens nomeadas HMD1.3 e HM52.2 apresentaram um pico de produção de etanol no período de 20 horas, enquanto que no último período analisado (30 horas) houve uma queda na produção. Tal comportamento pode ser novamente justificado no sentido de que quando

não havia mais fonte de carbono no meio, tais linhagens utilizaram o etanol produzido por elas (HERMAN, 2002; JEFFRIES, 2000). Essa justificativa se torna mais convincente ao observar a tabela 5, pois justamente as linhagens (HMD1.3 e HM52.2) que não apresentaram xilose residual no tempo de 20 horas foram as que apresentaram maior queda na produção de etanol no último período.

Os resultados revelam que as condições impostas neste ensaio não foram favorecedoras para o objetivo de maior produção de etanol, pois nessas condições as linhagens apresentaram maiores taxas de crescimento celular e menores valores de produção de etanol, se comparado com os ensaios anteriormente realizados. Tendo a informação de que a quantidade de inóculo foi maior para a mesma quantidade de meio, sugere-se que o melhor desempenho de crescimento celular obtido pelas linhagens seja a principal consequência do aumento da quantidade de inóculo. Como havia mais células no meio para disputar pelos mesmos nutrientes, além da mudança de temperatura, pode-se propor que as condições empregadas foram, em conjunto, causadoras de tal comportamento. Dentre os isolados, os que apresentaram maiores produções de etanol foram os nomeados I65 (3,63 g L⁻¹) e I23 (3,52 g L⁻¹), com os valores máximos de produção no último período analisado (30 horas).

Figura 17 - Produção de etanol em g L⁻¹ nos tempos de 20 e 30 horas das linhagens pré-selecionadas

A capacidade de produção de xilitol das linhagens pré-selecionadas, com exceção da linhagem XM5.2, não foi divergente quando comparada com os outros ensaios fermentativos realizados (Figura 18). Pois já era sabido que as linhagens caracterizadas pelo perfil morfológico dominante além de produzirem etanol, possuem a capacidade de produzir maior quantidade de xilitol, sendo justamente os isolados I38, I41, I47, I53 e I54, pertencentes a esse perfil, os que apresentaram maior produção de xilitol no presente ensaio fermentativo. A linhagem XM5.2 teve uma produção de xilitol de $0,93 \text{ g L}^{-1}$, no período de 30 horas.

Figura 18 - Produção de xitol em g L^{-1} nos tempos de 20 e 30 horas das linhagens pré-selecionadas

Sabendo que algumas linhagens apresentaram mais mudanças de comportamento do que outras quando ocorreram as alterações nas condições, sendo que o objetivo foi selecionar as linhagens com melhor desempenho para produção de etanol, foram selecionadas as linhagens que mais se adaptaram às condições e conseguiram mesmo assim produzir mais etanol (g L^{-1}) (tabela 5). Então, foram selecionados 2 isolados com o perfil morfológico tipo 1, sendo eles I38 e I54, e 4 isolados caracterizados pelo perfil morfológico tipo 2, sendo eles I3, I23, I29 e I65. As linhagens identificadas que apresentaram melhor desempenho fermentativo para produção de etanol no presente ensaio foram HMD1.3 (*Spathaspora passalidarum*) e HM52.2 (*Candida shehatae*).

Tabela 5 - Parâmetros fermentativos das linhagens selecionadas

Linhagens	Etanol (20 h)^a	Y p/s (20 h)^b	Xilose (20 h)^c
I3	1,40	0,29	12,02
I23	2,45	0,26	7,26
I29	1,87	0,25	9,26
I38	2,38	0,20	4,78
I54	2,35	0,18	3,87
I65	2,22	0,20	5,72
HMD1.3	5,67	0,34	-
HM52.2	4,79	0,29	-

Linhagens	Etanol (30 h)^d	Y p/s (30 h)^e	Xilose (30 h)^f
I3	3,34	0,20	-
I23	3,53	0,21	0,16
I29	3,41	0,20	-
I38	2,42	0,14	-
I54	2,35	0,14	-
I65	3,64	0,22	-
HMD1.3	2,54	0,15	-
HM52.2	2,95	0,18	-

^a Produção de etanol em g L⁻¹ no período de 20 horas^b Yp/s (g g⁻¹) g de etanol produzido / g de xilose consumida no período de 20 horas^c Xilose residual no período de 20 horas^d Produção de etanol em g L⁻¹ no período de 30 horas^e Yp/s (g g⁻¹) g de etanol produzido / g de xilose consumida no período de 30 horas^f Xilose residual no período de 30 horas

5.3 Experimento fermentativo final das linhagens selecionadas

O presente experimento foi executado através da adição de 200 µl do inóculo de cada amostra selecionada, juntamente com as linhagens padrão HM19.1A e NRRLY7124, em tubos de fundo chato contendo YEPX, os quais foram incubados a 28°C e 150 rpm. Este ensaio fermentativo foi realizado em triplicata e alíquotas de 1 ml foram retiradas em intervalos de 8 horas para posteriores análises de crescimento celular, quantificações de xilose, etanol e finalmente, a realização das análises estatísticas da produção de etanol em g L⁻¹ e fator de conversão (Y p/s).

A linhagem padrão HM19.1A, pertencente à espécie *Spathaspora arborariae*, se destacou com maior crescimento celular nos períodos analisados (Figura 19), sendo que este mesmo comportamento foi observado nos experimentos realizados no decorrer deste estudo.

Figura 19 - Perfis de crescimento medido por D.O. (600nm) nos tempos de 8, 16, 24 e 32 horas das linhagens selecionadas

Como já é sabido, no ensaio anterior a este (item 5.2.5) foram alteradas duas variáveis (temperatura e quantidade de inóculo), o que ocasionou bastante alteração no comportamento das linhagens testadas. Então, neste ensaio foi alterada somente uma variável (200 µl de inóculo), para assim ser esclarecido o que realmente ocasionou a queda na produção de etanol.

De um modo geral, todas as linhagens inoculadas ao meio YEPX no presente ensaio fermentativo apresentaram valores mais baixos de produção de etanol (g L^{-1}), se comparados com os valores obtidos nos ensaios realizados com 100 µl de inóculo, incubação a 28°C e 150 rpm. Os resultados obtidos a partir do presente ensaio são similares aos resultados do ensaio realizado anteriormente, onde houve a mudança das duas variáveis. Sendo assim, acredita-se que o que pode ter ocasionado a queda na produção de etanol, no ensaio anterior e no presente, foi principalmente a quantidade de inóculo utilizada.

Na Figura 20 verifica-se uma incontestável diferença na produção de etanol obtida pelas linhagens HMD1.3 ($4,63 \text{ g L}^{-1}$) e HM52.2 ($4,58 \text{ g L}^{-1}$) quando comparada a produção das outras linhagens, sendo que estas apresentaram seus valores máximos de produção já no período de 24 horas, com uma queda dos valores de etanol no último período analisado. Diante dos experimentos fermentativos realizados, tais linhagens comprovaram ser mais

eficientes para conversão de xilose em etanol, com mais rapidez e com valores muito mais elevados.

Dentre os isolados inoculados neste ensaio, os nomeados I38 ($3,48 \text{ g L}^{-1}$) e I54 ($3,37 \text{ g L}^{-1}$) foram os que apresentaram maior produção de etanol no tempo de 24 horas. No período de 32 horas, os isolados que apresentaram os maiores valores foram os nomeados I65 e I29, apresentando $3,52$ e $3,24 \text{ g L}^{-1}$ de etanol, respectivamente.

A linhagem HM19.1A apresentou uma produção máxima de $3,03 \text{ g L}^{-1}$ de etanol no período de 24 horas, já a outra linhagem padrão NRRLY7124 apresentou máximo de $2,47 \text{ g L}^{-1}$ neste mesmo período. Portanto, os isolados obtidos que apresentaram maiores valores de etanol superaram os valores produzidos pelas linhagens HM19.1A e NRRLY7124, que são bastante conhecidas na literatura como boas fermentadoras de xilose (PEREIRA et al., 2011; CADETE et al., 2009; MARTINIANO et al., 2013; SILVA et al., 2011; LEE et al., 2000).

Figura 20 - Produção de etanol em g L^{-1} nos tempos de 24 e 32 horas das linhagens selecionadas

Para saber se há realmente diferença entre as linhagens identificadas selecionadas e os isolados obtidos selecionados, foram realizados testes de comparação de médias de Tukey, e as linhagens foram consideradas diferentes quanto à produção de etanol e fator de conversão a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Figura 21).

A Figura 21 apresenta os valores de etanol e Y p/s nos tempos de 24 e 32 horas. Ao observar os resultados obtidos no tempo de 32 horas, verifica-se que há um decréscimo nos níveis de etanol, pois o esgotamento de xilose no meio ocasionou a utilização do próprio etanol produzido, como mencionado anteriormente (HERMAN, 2002; JEFFRIES, 2000). Portanto, a determinação das linhagens maiores produtoras de etanol foi feita com base no tempo de 24 horas, onde havia os picos de produção de etanol e xilose disponível. Por este fato, também pode-se verificar que não houve tantas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as linhagens selecionadas no último período, ou seja, elas se igualaram quanto à produção de etanol.

Quando comparados os parâmetros etanol (g L^{-1}) e fator de conversão (Y p/s), pode-se observar diferenças quanto aos valores produzidos e a mudança na ordem de maior produção entre os dois parâmetros. Quanto à diferença nos valores de produção, como já previamente explicado no item 4.7.1, o fator de conversão é calculado através da razão entre o etanol produzido e a xilose metabolizada. Já o motivo da mudança da ordem das linhagens de acordo com o Y p/s pode ser atribuída ao fato de que algumas linhagens apresentaram maior quantidade de xilose residual nos períodos analisados, alterando tal ordem (Tabela 6). Esta alteração pode ser observada para os isolados I38 e I54, que apresentaram valores mais altos de produção de etanol (g L^{-1}) do que os isolados I29 e I65, sendo esta ordem invertida para o parâmetro Y p/s (Figura 21). Então, a determinação das linhagens maiores produtoras de etanol foi feita com base nos valores produzidos de etanol em g L^{-1} , no tempo de 24 horas.

Tabela 6 – Xilose residual em g L^{-1} nos períodos de 24 e 34 horas

Linhagens	Xilose (24h)	Xilose (34)
HMD1.3	-	-
HM52.2	-	-
HMD19.1A	0,75	-
NRRLY7124	2,50	-
I3	6,46	0,39
I23	5,49	-
I29	5,49	-
I38	-	-
I54	0,33	-
I65	4,98	-

Figura 21 – Produção de etanol em g L^{-1} e fator de conversão $Y_{p/s}$ das 10 linhagens selecionadas. Diferenças entre médias definidas pelo teste de Tukey no software PAST. Médias com letras diferentes dentro de um mesmo parâmetro e tempo designam diferença significativa no nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Quanto à produção de etanol (g L^{-1}) e crescimento celular no tempo 24 horas, as linhagens HMD1.3 e HM52.2 não diferiram entre si, mas se diferenciaram significativamente das outras linhagens, sendo as maiores produtoras de etanol. Contudo, estas linhagens não foram as que mostraram maiores valores de concentração celular, e sim a linhagem HMD191A, que apresentou valores intermediários de produção de etanol (Figuras 19 e 21). Já o isolado I3, menor produtor de etanol, também apresentou baixo crescimento celular. Estas observações sugerem que não há necessariamente uma correlação entre produção de etanol e crescimento celular entre as linhagens estudadas.

Conclui-se que, dentre todas as linhagens analisadas, as linhagens *Spathaspora passalidarum* HMD1.3 e *Candida shehatae* HM52.2 foram destacadamente as maiores produtoras de etanol superando significativamente as linhagens padrão HM19.1A e NRRLY7124, bastante conhecidas na literatura como produtoras de etanol a partir de xilose. Dentre todos os isolados obtidos, os isolados I38 e I54 (caracterizados pelo perfil morfológico tipo 1) não diferiram entre si, e foram os maiores produtores de etanol. O isolado I38 foi maior significativamente do que as linhagens padrão HM19.1A e NRRLY7124, já o isolado I54 não diferiu da linhagem padrão HM19.1A, mas foi superior a linhagem NRRLY7124.

Ainda foi realizado um último experimento utilizando as 5 melhores linhagens quanto à produção de etanol g L^{-1} (24h) em meio hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Porém, como pode ser observado na Figura 22, houve um crescimento muito baixo das linhagens nos períodos analisados e não foi constatada produção de etanol. Uma possível explicação para esta ausência de produção e baixo crescimento é que o ácido acético residual do processo de hidrólise pode ter sido tóxico, inibindo o crescimento das linhagens, como constatado em outros trabalhos (OLSSON et al., 1985; TRAN et al., 1985; FELIPE et al., 1995; RANATUNGA et al., 1997). Entretanto, isso não quer dizer que as linhagens são incapazes de realizar tal atividade, pois algumas linhagens pertencentes às espécies aqui utilizadas conseguiram crescer e produzir etanol em hidrolisado com uma concentração menor de ácido acético (VAN-ZYL et al., 1988; SIMÕES, 2011; HICKERT et al., 2013a,b; PEREIRA et al., 2011). Por exemplo, no estudo de Simões (2011) a linhagem HM19.1A produziu etanol em meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com uma concentração de ácido acético mais baixa ($1,60 \text{ g L}^{-1}$), sendo que também houve suplementação nutricional com extrato de levedura.

Figura 22 - Perfis de crescimento medido por D.O. (600nm) nos tempos de 10, 20 e 30 horas das linhagens selecionadas para experimento em hidrolisado

Futuramente, novos testes devem ser feitos com outras concentrações de ácido acético no hidrolisado, a fim de verificar se as linhagens selecionadas conseguem realizar tal atividade. Além disso, as linhagens serão posteriormente identificadas por meio de sequenciamento.

6 CONCLUSÕES

A madeira em fase de decomposição mostrou ser uma excelente fonte para isolamento de leveduras com capacidade de crescimento em meio constituído de xilose como fonte de carbono.

Foram obtidas 83 colônias de leveduras do isolamento de madeira em fase de decomposição, sendo que 72 apresentaram capacidade de produção de etanol a partir de xilose. As linhagens obtidas do isolamento que exibiram essa capacidade apresentaram variação de 0,60 até 6,58 g L⁻¹ de etanol.

As linhagens pertencentes às espécies *Spathaspora passalidarum* (HMD1.3) e *Candida shehatae* (HM52.2) foram as maiores produtoras de etanol.

Dentre todos os isolados obtidos, os nomeados I38 e I54 foram os maiores produtores de etanol. O isolado I38 apresentou resultados significativamente maiores do que as linhagens padrão *Spathaspora arborariae* HM19.1A e *Sheffersomyces stipitis* NRRLY7124, enquanto o isolado I54 foi superior à linhagem NRRLY7124.

REFERÊNCIAS

- AGBOGBO, F.K.; HAAGENSEN, F.D.; MILAM, D.; WENGER, K.S. Fermentation of acid-pretreated corn stover to ethanol without detoxification using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 145, n. 1-3, p. 53-58, 2008.
- AGNOLUCCI, M.; VIGENTINI, I.; CAPURSO, G.; MERICO, A.; TIRELLI, A.; COMPAGNO, C.; FOSCHINO, R.; NUTI, M. Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 3, p. 238-244, 2009.
- AGUDELO, A.; VALERO, A.; USÓN, S. The fossil trace of CO₂ emissions in multi-fuel energy systems. **Energy**, Washington, v. 58, p. 236-246, 2013.
- ALEXANDER, M.A.; CHAPMAN, T.W.; JEFFRIES, T.W. Xylose metabolism by *Candida shehatae* in continuous culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 28, n. 4-5, p. 478-486, 1988.
- ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação dos ácidos orgânicos, bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. 1994. 251p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.
- BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, London, v. 86, p. 2273-2282, 2009.
- BATT, C.; CARVALHO, S.; EASSON-JUNIOR, D.D.; AKEDO, M.; SINSKEY, A.J. Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 28, p. 549-553, 1986.
- BIOSEV, A Louis Dreyfus Commodities Company - **Setor Sucroalcooleiro**. Publicado em: 18/09/2013. Disponível em: <<http://ri.biosev.com>> Acesso em: 30 out. 2013.
- BRUINENBERG, P.M. The NADP(H) redox couple in yeast metabolism. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 52, p. 411-429, 1986.
- CADETE, R.M.; MELO, M.A.; DUSSÁN, K.J.; RODRIGUES, R.C.L.B.; SILVA, S.S.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the brazilian amazonian forest. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 8, p. 1-11, 2012.
- CADETE, R.M.; SANTOS, R.O.; MELO, M.A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D.L.; STAMBUK, B.U.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 9, n. 8, p. 1338-1342, 2009.
- CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CARIOCA, J.O.B.; LEAL, M.R.L.V. Ethanol Production from Sugar-Based Feedstocks. **Comprehensive Biotechnology**, Waterloo, v. 3, p. 27-35, 2011.

CHU, B.C.H.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 5, p. 425-441, 2007.

DELLWEG, H.; RIZZI, M.; KLEIN, C. Controlled limited aeration and metabolic regulation during the production of ethanol from D-xylose by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 111-122, 1989.

DEMIRBAS, M.F.; BALAT, M. Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: A global perspective. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 47, p. 2371-2381, 2006.

DOMINGUEZ, J.M.; GONG, C.S.; TSAO, G.T. Production of Xylitol from D-Xylose by *Debaryomyces hansenii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 63-65, p. 117-127, 1997.

DU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting d-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 16, n. 11, p. 944-956, 1994.

DU PREEZ, J.C.; BOSCH, M.; PRIOR, B.A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Picchia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 8, n. 6, p. 360-364, 1986.

DU PREEZ, J.C.; BOSCH, M.; PRIOR, B.A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 8, n. 6, p. 360-364, 1986.

FARIA, L.F.F.; GIMENES, M.A.P.; NOBREGA, R.; PEREIRA-JUNIOR, N. Influence of Oxygen Availability on Cell Growth and Xylitol Production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 98-100, n. 1-9, p. 449-458, 2002.

FELIPE, M.G.A., VIEIRA, D.C., VITOLO, M., SILVA, S.S. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.35, p. 171-177, 1995.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Structure and Ultrastructure. In: FENGEL D.; WEGENER, G. (Ed.). **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989, cap. 2, p. 6-23.

FINOTTI, A.R.; CAICEDO, N.O.L. Contaminações subterrâneas com combustíveis derivados de petróleo: toxicidade e a legislação brasileira. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, Porto Alegre, v. 6, n. 2, p. 29-46, 2001.

FURLAN, S.A.; BOUILLAUD, P.; CASTRO, H.F. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. **Process Biochemistry**, London, v. 29, n. 8, p. 657-662, 1994.

GALLO, M. A fuel surcharge policy for reducing road traffic greenhouse gas emissions. **Transport Policy**, The Hague, v. 18, n. 2, p. 413-424, 2011.

GERBENS-LEENES, P.W.; VAN LIENDEN; HOEKSTRA, A.Y.; VAN DER MEER, T.H. Biofuel scenarios in a water perspective: The global blue and green water footprint of road transport in 2030. **Global Environmental Change**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 764-775, 2012.

GONG, C.S.; CHEN, L.F.; FLICKINGER, M.C.; CHIANG, L.C.; TSAO, G.T. Production of ethanol from d-Xylose by using d-xylose isomerase and yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 41, n. 2, p. 430-436, 1981.

GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

GUO, C.; ZHAO, C.; HE, P.; LU, D.; SHEN, A.; JIANG, N. Screening and characterization of yeasts for xylitol production. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, p. 1096-1104, 2006.

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

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

HAHN-HAGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, California, v.4, p. 1-9, 2001.

HERMAN, P.K. Stationary phase in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 602-607, 2002.

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**, Essex, v. 143, p. 112-116, 2013a.

HICKERT, L.R.; CUNHA-PEREIRA, F.; SOUZA-CRUZ, P.B.; ROSA, C.A.; AYUBI, M.A.Z. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and

Saccharomyces cerevisiae ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 131, p. 508-514, 2013b.

HOOK, M.; TANG, XU. Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change - A review. **Energy Policy**, Surrey, v. 52, p. 797-809, 2013.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 94, n. 1, p. 205-214, 2012.

HOWARD, R.L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, E.L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 2, n. 12, p. 602-619, 2003.

HU, X.; XIAO, Y.; NIU, K.; ZHAO, Y.; ZHANG, B.; HU, B. Functional ionic liquids for hydrolysis of lignocellulose. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 97, n. 1, p. 172-176, 2013.

IKEUCHI, T.; AZUMA, M.; KATO, J.; OOSHIMA, H. Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentrations of xylose. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 333-339, 1999.

JEFFRIES, T.W. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 3, n. 5, p. 213-218, 1981.

JEFFRIES, T.W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, n. 3, p. 320-326, 2006.

JEFFRIES, T.W. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 47, p. 221-268, 2000.

JEFFRIES, T.W.; JIN, Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 63, n. 5, p. 459-509, 2004.

JIN, Y.S.; JEFFRIES, T.W. Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, Orlando, v.6, n. 3, p. 229-238, 2004.

JINXING, L.; LI, XUEHUI, L.; GUO, B.; WANG, L.; ZHANG, N. Catalytic delignification of sugarcane bagasse in the presence of acidic ionic liquids. **Catalysis Today**, Amsterdam, v. 200, p. 99-105, 2013.

KOÇAR, G.; CIVAS, N. An overview of biofuels from energy crops: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 28, p. 900-916, 2013.

KRAHULEC, S.; KRATZER, R.; LONGUS, K.; NIDETZKY, B. Comparison of *Scheffersomyces stipitis* strains CBS 5773 and CBS 6054 with regard to their xylose metabolism: implications for xylose fermentation. **MicrobiologyOpen**, Brussels, v. 1, n. 1, p. 64-70, 2012.

KUHAD, R.C.; GUPTA, R.; KHASA, Y.P.; SINGH, A.; ZHANG, Y.H.P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 15, n. 9, p. 4950-4962, 2011.

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

LEE, T.Y. KIM, M.D.; KIM, K.Y.; PARK, K.; RYU, Y.W.; SEO, J.H. A parametric study on ethanol production from xylose by *Picchia stipitis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Busan, v. 5, p. 27-31, 2000.

LEITE, R.C.; CORTEZ, L.A.B. O etanol combustível no Brasil. In: SIMÕES, A.J.F. (Ed.). **Biocombustíveis no Brasil: realidades e perspectivas**. Brasília: MRE, 2007, cap. 3, p. 61-75.

LI, X.; JACKSON, P.; RUBTSOV, D.V.; FARIA-BLANC, N.; MORTIMER, J.C.; TURNER, S.R.; KROGH, K.B.; JOHANSEN, K.S.; DUPREE, P. Development and application of a high throughput carbohydrate profiling technique for analyzing plant cell wall polysaccharides and carbohydrate active enzymes. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 6, n. 94, p. 1-12, 2013.

LIGTHELM, M.E.; PRIOR, B.A.; PREEZ, J.C. The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of d-xylose and d-glucose to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 28, n.1, p. 63-68, 1988.

LONN, A.; TRAFF-BJERRE, K.L.; OTERO, R.R.C.; VAN ZYL, W.H.; HAHN-HAGERDAL, B. Xylose isomerase activity influences xylose fermentation with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing mutated *xylA* from *Thermus thermophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 5, p. 567-573, 2003.

LOURENÇO, M.V.M. **Seleção de leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol**. 2009. 76p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MACEDO, I.C.; NOGUEIRA, L.A.H. Avaliação da expansão da produção de etanol no Brasil. In: ARBIX, G. (Ed.). **Biocombustíveis**. Brasília: Cadernos NAE, 2005, cap. 2, p. 113-215.

MACRELLI, S.; MOGENSEN, J.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based etanol process. **Biotechnology for biofuels**, London, v. 5, n. 22, p. 1-18, 2012.

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. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 82, n. 6, p. 1067-1078, 2009.

MAKINEN, K.K. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol?. **Medical Hypotheses**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 603-613, 2000.

MALBERBE, S.; CLOETE, T.E. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. **Environmental Science & Bio/Technology**, New York, v. 1, p. 105-114, 2002.

MARGARITIS, A.; BAJPAI, P. Direct Fermentation of d-Xylose to Ethanol by *Kluyveromyces marxianus* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, n. 5, p. 1039-1041, 1982.

MARTÍNEZ, M. L.; SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V. Production of xylitol and ethanol by *Hansenula polymorpha* from hydrolysates of sunflower stalks with phosphoric acid. **Industrial Crops and Products**, Jaén, v. 40, p. 160–166, 2012.

MARTINIANO, S.E.; PHILIPPINI, R.R.; CHANDEL, A.K.; ROSA, C.A.; PAGNOCCA, P.C.; SILVA, S.S. Evaluation of rice bran extract as a nitrogen source for improved hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse by new xylose-fermenting yeast strains isolated from brazilian forests. **Sugar Tech**, Lucknow, v. 3, n. 5, p. 345-352, 2013.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 1, p. 47-54, 2002.

MCMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M.E.; BAKER, J.O.; OVEREND, R.P. (Ed.). **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. Washington: American Chemical Society, 1993, cap. 15, p. 292-324.

MISRA, S.; GUPTA, P.; RAGHUWANSHI, S.; DUTT, K.; SAXENA, R.K. Comparative study on different strategies involved for xylitol purification from culture media fermented by *Candida tropicalis*. **Separation and Purification Technology**, Kowloon, v. 78, n. 3, p. 266-273, 2011.

MORAIS, C.G.; CADETE, R.M.; UETANABARO, A.P.T.; ROSA, L.H.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 60, p. 19-28, 2013.

MORRIS, V.J.; RING, S.G.; MACDOUGALL, A.J.; WILSON R.H. Biophysical characterization of plant cell walls. In: ROSE J.K.C. (Ed.). **The Plant Cell Wall**. Oxford: Blackwell Publishing, 2003, cap. 2, p. 55-87.

MOURO, A. **Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira**. 2012. 69p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, London, v. 43, n. 5, p. 540-546, 2008.

MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 401-413, 2002.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dillute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 98, p. 49-58, 2002.

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**, Cambridge, v. 110, n. 10, p. 1232-1241, 2006.

NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 52-68, 2011.

NIGAN, P.; SINGH, D. Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute. **Process Biochemistry**, London, v. 30, n. 2, p. 117-124, 1995.

NOLLEAU, V.; BELLOY-PREZIOSI, J.P.; DELGENES, J.P.; NAVARRO, J.M. Xylitol Production from Xylose by Two Yeast Strains: Sugar Tolerance. **Current Microbiology**, New York, v. 27, p. 191-197, 1993.

O'NEILL M.A.; YORK, W.S. The composition and structure of plant primary cell walls. In: ROSE J.K.C. (Ed.). **The Plant Cell Wall**. Oxford: Blackwell Publishing, 2003, cap. 1, p. 1-54.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Biomass enzymatic hydrolysis. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OH, D.K.; KIM, S.Y. Increase of xylitol yield by feeding xylose and glucose in *Candida tropicalis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 50, p. 419-425, 1998.

ÖHGREN, K.; BENGTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, F.M.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 126, n. 4, p. 488-498, 2006.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 18, p. 312-331, 1996.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

PAL, S.; CHOUDHARY, V.; KUMAR, A.; BISWAS, D.; MONDAL, A.K.; SAHOO, D.K. Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 147, p. 449-455, 2013.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PAPINI, M.; NOOKAEW, I.; UHLÉN, M.; NIELSEN, J. *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 11, n. 136, p. 1-16, 2012.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, Essex, v. 66, n. 1, p. 25-40, 1998c.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: operation in culture media made with commercial sugars. **Bioresource Technology**, Essex, v. 65, n. 3, p. 203-212, 1998b.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, Essex, v. 65, n. 3, p. 191-201, 1998a.

PENIDO-FILHO, P. O álcool combustível. In: NOBEL (Ed.). **O álcool combustível: obtenção e aplicação nos motores**. São Paulo: Livraria Nobel S.A., 1980, cap. 3, p. 43-48.

PEREIRA, F.C.; HICKERT, L.R.; SEHNEM, N.T.; CRUZ, P.B.S.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 5, p. 4218-4225, 2011.

PETERSON, M.E. Xylitol. **Topics in Companion Animal Medicine**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 18-20, 2013.

PROMPT, A.H. **Análise da fermentação de glicose e xilose por leveduras *Spathaspora* isoladas de madeira em decomposição**. 2012. 85p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

RANATUNGA, T.D.; JERVIS, J.; HELM, R.F.; MC-MILLAN, J.D.; HATZIS, C. Identification of inhibitory components toxic toward *Zymomonas mobilis* C4 (pZB5) xylose fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 67, p. 185-198, 1997.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Enzymatic hydrolysis of rice hull using cellulases. Effect of chemical and photochemical treatments. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 140-143, 1998.

RIZZI, M.; HARWART, K.; BUI-THANH, N.A.; DELLWEG, H. A kinetic study of the NAD⁺-xylitol-dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 67, n. 1, p. 25-30, 1989.

RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, London, v. 454, n. 14, p. 841-845, 2008.

RUSSO, D.; DASSISTI, M.; LAWLOR, V.; OLABI, A.G. State of the art of biofuels from pure plant oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 16, n. 6, p. 4056-4070, 2012.

SAHA, B.C. Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. In: SAHA, B.C.; HAYASHI, K. (Ed.). **Lignocellulose Biodegradation**. Washington: American Chemical Society, 2004, cap. 1, p. 2-25.

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, Oxford, v. 37, p. 19-27, 2012.

SARMENTO, P.; GARCIA, R.; PIRES, A.J.V.; NASCIMENTO, A. Tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 28, n. 6, p. 1203-1208, 1999.

SATHRE, R. Comparing the heat of combustion of fossil fuels to the heat accumulated by their lifecycle greenhouse gases. **Fuel**, London, v. 115, p. 647-677, 2014.

SCHNEIDER, H.; WANG, P.Y.; CHAN, Y.K.; MALESZKA, R. Conversion of d-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 3, n. 2, p. 89-92, 1981.

SEARCHINGER, T.; HEIMLICH, R.; HOUGHTON, R.A.; DONG, F.; ELOBEID, A.; FABIOSA, J.; TOKGOZ, S.; HAYES, D.; YU, T. Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. **Science**, Cambridge, v. 319, n. 5867, p. 1238-1240, 2008.

SHALLON, D.; SHOHAN, Y. Microbial hemicellulases. **Ecology and Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 6, p. 219-228, 2003.

SILVA, J.P.A.; MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 151-156, 2011.

SIMÕES, G.S. **Avaliação de condições fermentativas iniciais de *Spathaspora arborariae* UFMG HM19.1 na produção de etanol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 73p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2012.

SKOOG, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Xylose fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 10, n. 2, p. 66-80, 1988.

SLININGER, P.; BOTHAST, R.J. Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Picchia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 35, p. 727-731, 1990.

SPENCER-MARTINS, I. Transport of sugars in yeasts: Implications in the fermentation of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, Essex, v. 50, n. 1, p. 51-57, 1994.

TAMBURINI, E.; BIANCHINI, E.; BRUNI, A.; FORLANI, G. Cosubstrate effect on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activity levels, and its consequence on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 46, n. 5, p. 352-359, 2010.

TAYLOR, K.B.; BECK, M.J.; HUANG, D.H.; SAKAI, T.T. The fermentation of xylose: studies by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Industrial Microbiology**, Berlin, v. 6, n. 1 p. 29-41, 1990.

TER BRAAK, C.J.F.; SMILAUER, P. CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). **Microcomputer Power**, Ithaca, NY, 2002, 500p.

TRAN, A.V.; CHAMBERS, R.P. Red oak wood derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia stipitis* CBS 5776. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 7, n. 11, p. 841-846, 1985.

UNICA, União da Indústria da Cana-de-açúcar - **Revisão de estimativa da safra 2013/2014 no Centro-Sul confirma crescimento de moagem direcionado para a produção de etanol**. Publicado em: 01/10/2013. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>> Acesso em: 30 out. 2013.

USDA, United States Department of Agriculture - **Can Brazil meet the world's growing need for ethanol?** Publicado em: 01/12/2012. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov>> Acesso em: 30 out. 2013.

VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 32, n. 3-4, p. 199-224, 1986.

VAN-ZYL, C.; PRIOR, B.A.; DU PREEZ, J.C. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolyzate by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 17, n. 1-3, p. 357-369, 1988.

VERDUYN, C.; VAN-KLEEF, R.; FRANK, J.; SCHREUDER, H.; VAN-DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Biochemical Journal**, London, v. 226, n. 3, p. 669-677, 1985.

VON SILVERS, M.; ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. **Bioresource Technology**, Essex, v. 51, p. 43-52, 1995.

WALTER, A.; ROSILLO-CALLE, F.; DOLZAN, P.; PIACENTE, E.; CUNHA, K.B. Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 32, n. 8, p. 730-748, 2008.

WEBB, S.R.; LEE, H. Regulation of d-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. **Biotechnology Advances**, New York, v. 8, n. 4, p. 685-697, 1990.

WEST, T.P. Xylitol production by *Candida* species grown on a grass hydrolysate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 913-916, 2009.

WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 17, n. 12, p. 482-487, 1999.

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

WUEBBLES, D.J.; JAIN, A.K. Concerns about climate change and the role of fossil fuel use. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 71, n. 1-3, p. 99-119, 2001.

WYMAN, C.E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresourse Technology**, New York, v. 50, p. 3-16, 1994.

ZENG, Q.K.; DU, H.L.; WANG, J.F.; WEI, D.Q.; WANG, X.N. Reversal of coenzyme specificity and improvement of catalytic efficiency of *Pichia stipitis* xylose reductase by rational site-directed mutagenesis. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 31, p. 1025-1029, 2009.

ZHANG, Y.H.P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 35, p. 367-375, 2008.