

Alice Heidrich Prompt

**ANÁLISE DA FERMENTAÇÃO DE GLICOSE E XILOSE POR  
LEVEDURAS *Spathaspora* ISOLADAS DE MADEIRA EM  
DECOMPOSIÇÃO**

Dissertação de Mestrado submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica da Universidade Federal  
de Santa Catarina visando à obtenção  
do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Boris Ugarte  
Stambuk.

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Prompt, Alice Heidrich  
Análise da fermentação de glicose e xilose por leveduras  
Spathaspora isoladas de madeira em decomposição  
[dissertação] / Alice Heidrich Prompt ; orientador, Boris  
Juan Carlos Ugarte Stambuk - Florianópolis, SC, 2012.  
84 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Xilose. 3. Spathaspora. 4. Bioetanol.  
5. Lignocelulose. I. Stambuk, Boris Juan Carlos Ugarte.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica. III. Título.



Alice Heidrich Prompt

**ANÁLISE DA FERMENTAÇÃO DE GLICOSE E XILOSE POR  
LEVEDURAS *Spathaspora* ISOLADAS DE MADEIRA EM  
DECOMPOSIÇÃO**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e aprovada em sua forma final pelo programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Florianópolis, 27 de Novembro de 2012.

---

Prof. Dr. Boris Ugarte Stambuk.  
Coordenador do curso de Pós-Graduação em Bioquímica.

**Banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Márcio José Rossi  
MIP/CCB/UFSC

---

Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré  
BQA/CCB/UFSC

---

Prof. Dr. Carlos Peres Silva  
BQA/CCB/UFSC



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Boris U. Stambuk, pela sua orientação, paciência, e, sobretudo pela oportunidade a mim concedida de fazer parte de sua equipe de laboratório.

Ao professor Dr. Sérgio Alves Júnior, por me ajudar e passar seus conhecimentos no início do meu trabalho.

À colega de laboratório e amiga Adriane Mouro, que muito me ensinou e nunca se negou a me ajudar sempre que precisei. Agradeço também à Dr<sup>a</sup> Maria de Lourdes Magalhães, que contribuiu muito para minha formação. Aos demais amigos e colegas de laboratório Ana, Augusto, Belisa, Catarina, Daniella, Davi, Débora, Francisco, Gabriela, Marília, Marcelo, Mylena e Victor pelas conversas, companhia, contribuições e amizade durante o tempo de trabalho.

A minha família, mãe, pai, irmãs, sobrinhos. Sem eles nada disso seria possível. À minha sogra, pelo apoio a mim dado durante esse tempo.

Ao meu amor, namorado e melhor amigo Pedro. Pelo seu amor, companheirismo, carinho, dedicação e, principalmente, pela paciência. Por sempre ter me apoiado em todas as minhas escolhas e nunca ter se negado a me ajudar no que fosse preciso.

Às minhas amigas de Porto Alegre, que são essenciais em minha vida. Pelo carinho e momentos de descontração que passamos durante o tempo desse trabalho. A Nádia, que se tornou uma grande amiga neste período do meu trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pelo apoio e esclarecimento prestado durante o curso.

Ao laboratório do professor Alcir, por disponibilizar alguns de seus equipamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), e Agência de Cooperação Internacional do Japão (JICA) pela bolsa de mestrado e apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.



## RESUMO

A crescente preocupação com o futuro esgotamento dos combustíveis fósseis tem impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias para produção de combustíveis alternativos como o etanol. O etanol de segunda geração é dependente da fermentação dos açúcares que constituem a biomassa lignocelulósica, composta por lignina, celulose e hemicelulose. A hemicelulose é composta tanto por hexoses como por pentoses. A xilose é a pentose predominante na lignocelulose, e o segundo açúcar mais abundante na natureza. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, principal microrganismo utilizado na produção de etanol de primeira geração, é incapaz de fermentar essa pentose. Por essa razão, pesquisas para identificar novas leveduras capazes de fermentar a xilose têm enorme aplicação biotecnológica. Neste trabalho foram analisadas 42 linhagens de leveduras, isoladas de madeira em decomposição na biodiversidade brasileira, como possíveis leveduras fermentadoras de xilose. Entre essas leveduras, quatro novas espécies fermentadoras de xilose foram classificadas e denominadas *Spathaspora brasiliensis*, *Spathaspora roraimanensis*, *Spathaspora suhii*, e *Spathaspora xylofermentans*. Essas diferentes leveduras *Spathaspora* apresentaram diferentes rendimentos na produção de etanol quando crescidas em meios contendo xilose ou glicose como fonte de carbono, quando fermentam em sistema de batelada misturas de xilose e glicose, ou hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar. Nossos resultados indicam que as espécies *S. roraimanensis*, *S. xylofermentans* e as já conhecidas *S. passalidarum* e *S. arborariae*, apresentam os melhores rendimentos na produção de etanol durante a fermentação de xilose. Finalmente, analisamos a expressão relativa de genes, presentes no genoma da levedura *S. arborariae*, possivelmente envolvidos na metabolização de xilose. Nossos resultados mostraram uma maior expressão relativa de 4 genes (que codificam para as enzimas xilose redutase e xilulocinase, e dois transportadores de xilose) nas células cultivadas em xilose, quando comparado com células crescidas em glicose. Estes novos genes constituem interessantes alvos para, através de engenharia genética, otimizar a produção de etanol a partir de hidrolisados da biomassa lignocelulósica.

**Palavras-chave:** xilose, *Spathaspora*, lignocelulose, bioetanol.



## ABSTRACT

Growing concerns with the future depletion of fossil fuels has driven the development of new technologies for the production of alternative fuels like ethanol. Second generation ethanol depends on the fermentation of sugars from lignocellulosic biomass, composed of lignin, cellulose and hemicellulose. Hemicellulose contains both hexoses and pentoses. Xylose is the predominant pentose in lignocellulose, and the second most abundant sugar in nature. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the major microorganism used in the production of first generation ethanol, is unable to ferment this pentose. Therefore, studies aiming the identification of new yeasts capable of fermenting xylose have several biotechnological applications. In this work we analyzed 42 yeast strains isolated from decaying wood in the Brazilian biodiversity as possible xylose-fermenting yeasts. Among these yeasts, four new xylose fermenting species were classified and named *Spathaspora brasiliensis*, *Spathaspora roraimanensis*, *Spathaspora suhii*, and *Spathaspora xylofermentans*. These different *Spathaspora* yeasts presented different ethanol yields when grown in media containing glucose or xylose as carbon source, during batch fermentations with glucose and xylose mixtures, or with sugarcane bagasse enzymatic hydrolysates. Our results indicate that the species *S. roraimanensis*, *S. xylofermentans* and the already known *S. passalidarum* and *S. arborariae*, show the best yields in ethanol production during xylose fermentation. Finally, we determined the relative expression of genes, present in the genome of the yeast *S. arborariae*, possibly involved in the metabolism of xylose. Our results showed a higher relative expression of four genes (encoding the enzymes xylose reductase and xyluloquinase, and two xylose transporters) in cells grown on xylose, as compared to cells grown in glucose. These new genes are interesting targets for optimizing, through genetic engineering, the production of ethanol from lignocellulosic biomass hydrolysates.

**Keywords:** xylose, *Spathaspora*, lignocellulose, bioethanol.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema simplificado do metabolismo de xilose até etanol por leveduras, fungos filamentosos e bactérias..... 28
- Figura 2 – Reação global da fermentação alcoólica..... 30
- Figura 3 – Reações bioquímicas da via glicolítica em célula de levedura ..... 31
- Figura 4 – Representação esquemática das vias de metabolização de hexoses e pentoses em leveduras. A ligação entre a via glicolítica e a via das pentoses-fosfato..... 35
- Figura 5 – Crescimento ( $DO_{570nm}$ ) e produção de etanol pelas leveduras NSG2.5.2a, NSG2.7.2a, NSG2.10.1B e NSG2.9.1a em meio rico YP contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose (preto), xilose (vermelho), arabinose (verde), celobiose (amarelo), sacarose (azul escuro), maltose (rosa), e galactose (azul claro).. ..... 46
- Figura 6 - Crescimento ( $DO_{570nm}$ ) e produção de etanol pelas leveduras HMD19.3 e XMD16.2 em meio rico YP contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose (preto), xilose (vermelho), arabinose (verde), celobiose (amarelo), sacarose (azul escuro), maltose (rosa), e galactose (azul claro)..... 48
- Figura 7 – Crescimento ( $DO_{570nm}$ ) e produção de etanol pelas leveduras XMD23.2 e HMD25.1 em meio rico YP contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose (preto), xilose (vermelho), arabinose (verde), celobiose (amarelo), sacarose (azul escuro), maltose (rosa), e galactose (azul claro)..... 49
- Figura 8 - Posição filogenética das novas espécies de *Spathaspora* (em negrito) determinado pelas sequencias da região D1/D2 LSU do RNA ribossomal, utilizando o programa MEGA5..... 50
- Figura 9 - Crescimento das leveduras (a) *S. brasiliensis* HMD19.3, (b) *S. suhii* XMD16.2 e (c) *S. roraimanensis* XMD23.2 em meios ricos YP contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose (símbolos abertos) ou xilose (símbolos fechados)..... 52

Figura 10 - Crescimento das leveduras (a) <i>S. xylofermentans</i> HMD23.3 e (b) HMD25.1 em meios ricos YP contendo 20 g L <sup>-1</sup> de glicose (símbolos abertos) ou xilose (símbolos fechados).....	53
Figura 11 - Crescimento das leveduras (a) <i>S. passalidarum</i> HMD10.2 e (b) HMD14.2 em meios ricos YP contendo 20 g L <sup>-1</sup> de glicose (símbolos abertos) ou xilose (símbolos fechados)..	54
Figura 12 - Análise da fermentação em batelada simples das cepas (a) <i>Spathaspora brasiliensis</i> HMD19.3, (b) <i>Spathaspora suhii</i> XMD16.2 e (c) <i>Spathaspora roraimanensis</i> XMD23.2.....	56
Figura 13 - Análise da fermentação em batelada simples das cepas (a) <i>Spathaspora xylofermentans</i> HMD23.3 e (b) <i>Spathaspora xylofermentans</i> HMD25.1. Os gráficos da esquerda representam o crescimento celular em YPDX 2% (círculo fechado)..	58
Figura 14 – Fermentação em batelada com hidrolisados de cana-de-açúcar da levedura <i>Spathaspora brasiliensis</i> HMD 19.3 utilizando hidrolisado “A” (a) e hidrolisado “B” (b) como substrato..	60
Figura 15 - Fermentação em batelada com hidrolisados de cana-de-açúcar da levedura <i>Spathaspora suhii</i> XMD 16.2 utilizando hidrolisado “A” (a) e hidrolisado “B” (b) como substrato..	61
Figura 16 - Fermentação em batelada com hidrolisados de cana-de-açúcar da levedura <i>Spathaspora roraimanensis</i> XMD 23.2 utilizando hidrolisado “A” (a) e hidrolisado “B” (b) como substrato..	62
Figura 17 - Fermentação em batelada com hidrolisados de cana-de-açúcar da levedura <i>Spathaspora xylofermentans</i> HMD 23.3 utilizando hidrolisado “A” (a) e hidrolisado “B” (b) como substrato..	63
Figura 18 - Fermentação em batelada com hidrolisados de cana-de-açúcar da levedura <i>Spathaspora xylofermentans</i> HMD 25.1 utilizando hidrolisado “A” (a) e hidrolisado “B” (b) como substrato..	64
Figura 19 - Filograma mostrando a relação dos dois transportadores (Transp1 e Transp4) presentes no genoma de <i>S. arborariae</i> (em vermelho) com outros transportadores de leveduras e fungos...	66

Figura 20 - Expressão relativa dos genes das enzimas xilose redutase (Xyl-XR), xiluloquinase (Xyl-XK) e dos genes do transportador 1 (Xyl-Transp1) e transportador 4 (Xyl-Transp4) em células da levedura *S. arborariae* HMD19.1a crescidas em glicose (barras pretas) ou xilose (barras cinza) como fonte de carbono. .... 68



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados na análise da expressão gênica. .....	43
Tabela 2 – Rendimento (g de etanol g <sup>-1</sup> de açúcar) fermentativo durante o crescimento em glicose ou xilose pelas leveduras <i>Spathaspora</i> . .....	51





## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b><i>Introdução</i></b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b><i>Revisão Bibliográfica</i></b> .....	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Histórico e importância econômica do Etanol Combustível no Brasil</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Bioetanol e a biomassa lignocelulósica</b> .....	<b>24</b>
2.2.1	Pré-tratamento e hidrólise da Biomassa Lignocelulósica .....	25
<b>2.3</b>	<b>Leveduras fermentadoras de xilose</b> .....	<b>26</b>
<b>2.4</b>	<b>Metabolização da xilose</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5</b>	<b>Bioquímica da fermentação alcoólica</b> .....	<b>30</b>
2.5.1	Glicólise e fermentação alcoólica.....	30
2.5.2	Via das pentoses fosfato .....	32
<b>3</b>	<b><i>Objetivos</i></b> .....	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>37</b>
<b>4</b>	<b><i>Materiais e métodos</i></b> .....	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Leveduras</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Meios de cultura e condições de cultivo das leveduras</b>	<b>39</b>
<b>4.3</b>	<b>Ensaio Fermentativo</b> .....	<b>40</b>
4.3.1	Fermentações em batelada com mistura de glicose e xilose...	40
4.3.2	Fermentações em batelada com hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar .....	41
<b>4.4</b>	<b>Métodos Analíticos</b> .....	<b>41</b>
4.4.1	Determinação de glicose .....	41
4.4.2	Determinação de xilose .....	41
4.4.3	Determinação de etanol.....	42
4.4.4	Cromatografia líquida de alta pressão .....	42
<b>4.5</b>	<b>Análise da expressão gênica através de rt-pcr quantitativo</b> .....	<b>42</b>
<b>5</b>	<b><i>Resultados e Discussão</i></b> .....	<b>45</b>

<b>6 Conclusões .....</b>	<b>69</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>71</b>
<i>Anexo 1.....</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
<i>Anexo 2.....</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
<i>Anexo 3.....</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
<i>Anexo 4.....</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>

## 1 INTRODUÇÃO

Combustíveis fósseis como o petróleo, carvão mineral, gás natural e seus derivados representam 82% do consumo energético mundial (EIA, 2012). Eles são responsáveis por grande parte da poluição local e pela maior parte das emissões de gases de efeito estufa do planeta. Considerando o petróleo um recurso finito, o crescimento de sua utilização por países emergentes tem conduzido ao aumento dos preços nos mercados. Como resultado da crescente demanda, o preço do barril de petróleo custou cerca de U\$ 82,00 em 2010 e aumentou para mais de U\$ 112,00 em 2011. Estima-se que os preços continuarão aumentando, e em 2035 o valor do barril de petróleo seja de U\$ 125,00 (EIA, 2012).

A crescente preocupação sobre o custo do petróleo, o futuro esgotamento dos combustíveis fósseis e seu impacto negativo sobre o ambiente, tem impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias para produção de combustíveis alternativos como o etanol (Jeffries, 2006, Sagar; Kartha, 2007 e Solomon, 2010). Tradicionalmente, o etanol de primeira geração é produzido a partir dos açúcares dos grãos do milho (amido) ou do caldo e melão da cana-de-açúcar (sacarose) (Gray; Zhao; Emptage, 2006).

A produção global de etanol no ano de 2010 atingiu 23 bilhões de galões. No mesmo ano, o Brasil produziu 26.495 bilhões de litros de etanol (RFA, 2012) a partir da cana-de-açúcar cultivada em 8 milhões de hectares (CONAB, 2012). Como consequência da produção de etanol de primeira geração, milhões de toneladas de bagaço de cana são gerados anualmente no país, e grande parte desse bagaço é utilizado para geração de calor e/ou energia elétrica para a própria usina (Stambuk *et al.*, 2008). Sabe-se, no entanto, que por ser rico em açúcares, o bagaço gerado pode ter outro destino: a produção de bioetanol (ou etanol de segunda geração).

Considerando que os açúcares constituintes do bagaço e da palha da cana-de-açúcar possam ser completamente viabilizados para fermentação com um grau de eficiência de 90%, sua fermentação pode promover um aumento de mais de 50% na quantidade de etanol obtida por tonelada de cana, em virtude da grande quantidade de açúcares que compõem a biomassa em questão (Gonçalves *et al.*, 2005; Pessoa-Jr *et al.*, 2005).

O principal microrganismo utilizado para produção de etanol de primeira geração, *Saccharomyces cerevisiae*, é incapaz de fermentar a xilose (Merico *et al.*, 2007 e Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007), o principal

açúcar constituinte da biomassa lignocelulósica. Por esse motivo, é de grande interesse a descoberta de novas espécies de leveduras capazes de fermentar essa pentose, dando enfoque para espécies isoladas da biodiversidade brasileira. Assim, o principal objetivo desta dissertação foi à procura por novas espécies de leveduras fermentadoras da pentose D-xilose para produção de etanol de segunda geração.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO ETANOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL

No início da década de 1970 o Brasil implantou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Em meio a uma crise mundial, impulsionada pelos altos custos dos barris de petróleo, o programa tinha como objetivo a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar para substituir a gasolina, produto derivado do petróleo utilizado como combustível para veículos leves (Goldemberg, 2006).

Na primeira fase do Proálcool, que teve início em 1975, a proporção de etanol em veículos leves passou de 1,1% em 1975 para 16,7% em 1979, sem a necessidade de mudanças nos motores dos automóveis. Na segunda fase do programa, que começou em 1979, o álcool hidratado começou a ser produzido para uso direto como combustível, o que levou a uma mudança completa nos motores dos automóveis (Zanin *et al.*, 2000). Com o auxílio do governo, em 1986 a produção de etanol atingiu seu ápice, e 96% dos veículos utilizavam álcool como combustível.

Nos anos seguintes, principalmente pela estabilidade dos preços do barril de petróleo, a produção de etanol sofreu um forte declínio. Como o etanol já não era mais vantajoso em relação à gasolina, a produção de veículos movidos a álcool estagnou (Zanin *et al.*, 2000).

Contudo, três anos depois, devido à crescente preocupação por problemas ambientais ocasionados pelo uso de combustíveis fósseis e pela busca por energias renováveis, esse quadro foi revertido: se deu início a comercialização dos carros *flex*. O surgimento dos motores bicombustíveis fez com que a produção de álcool ganhasse novamente força no Brasil (Goldemberg, 2008).

De acordo com dados da Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (ANFAVEA), em 2009 85,24% dos veículos novos comercializados no país eram bicombustíveis. Com isso, o Brasil novamente tomou papel de destaque na substituição da gasolina pelo etanol, combustível renovável e menos poluente. Atualmente, 80,94 % dos veículos automotivos são bicombustíveis (ANFAVEA, 2012).

Segundo levantamento do Ministério de Minas e Energia (MME) (Filho, 2012) sobre a matriz energética brasileira, o crescimento da participação de fontes renováveis passou de 45% em 2010 para 48% em 2012, e a diminuição dos combustíveis fósseis, de 53% para 51% no mesmo período. Também de acordo com previsões do MME, a

produção de etanol em 2020 será de 87 milhões de metros cúbicos, com superávit de 22 milhões de metros cúbicos para exportação.

## 2.2 BIOETANOL E A BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O bioetanol de segunda geração é o etanol produzido a partir dos açúcares hidrolisados que constituem a biomassa lignocelulósica (Sarkar *et al.*, 2011). A lignocelulose, principal componente das plantas lenhosas e não lenhosas (Howard *et al.*, 2003) constitui mais de 50% da biomassa produzida mundialmente (Claassen, *et al.*, 1999), designando-se como uma importante matéria-prima para a produção de bioetanol (Gray, Zhao; Emptage, 2006). O uso da biomassa subaproveitada presente no bagaço e na palha da cana-de-açúcar pode aumentar a produção de etanol significativamente, sem a necessidade de aumentar a área de cultivo dessa gramínea (Stambuk *et al.*, 2008).

A biomassa lignocelulósica é composta por lignina, celulose e hemicelulose (Howard *et al.*, 2003; Himmel *et al.*, 2007). Conforme sua natureza, ela varia muito em sua composição (Le Digabel; Avérous, 2006).

A lignina, polímero aromático mais abundante da natureza, representa em torno de 15-25% do total da matéria seca da lignocelulose. É uma macromolécula constituída pela polimerização de unidades fenil-propano, que forma uma matriz extremamente complexa (Higuchi, 1990). Por ligar-se tanto a hemicelulose quanto a celulose, a lignina atua como um componente estrutural e uma barreira física para qualquer enzima ou solução (Anderson; Akin, 2008; Dashtban; Schraft; Qin 2009) A celulose, constituinte mais abundante da biomassa lignocelulósica, representando 30-60% do seu total, é um homopolímero linear de glicose, formado por ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas. A conformação secundária e terciária da celulose e sua associação com a lignina, hemicelulose, proteínas e elementos minerais, torna a celulose uma molécula resistente à hidrólise, podendo ser hidrolisada enzimaticamente (Zaldivar; Nielsen; Olsson, 2001). A hemicelulose constitui cerca de 20-40% da lignocelulose. É um heteropolissacarídeo composto por hexoses (D-galactose, L-galactose, D-manose, L-ramnose, L-fucose), pentoses (D-xilose, L-arabinose) e ácidos urônicos (ácido D-glicurônico) (Zaldivar; Nielsen; Olsson, 2001). Ao contrário da celulose, os polímeros de hemicelulose podem ser hidrolisados facilmente, pois eles não formam agregados com cadeias de celulose (Pérez *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007). A xilose é a pentose predominante na biomassa lignocelulósica das gramíneas (Matsushika *et al.*, 2009).

### 2.2.1 Pré-tratamento e hidrólise da Biomassa Lignocelulósica

O processo biológico para produção de etanol combustível a partir da biomassa lignocelulósica como substrato, requer três passos. Primeiro é necessário que ocorra a deslignificação para liberar a celulose e a hemicelulose do seu complexo com a lignina (pré-tratamento da biomassa). Segundo, deve ocorrer a desestruturação dos polímeros dos carboidratos (celulose e hemicelulose) para produção dos açúcares livres. E finalmente, a fermentação mista dos açúcares (hexoses e pentoses) para produção de etanol (Aristidou; Penttila, 2000, Sun; Cheng, 2002, Naik *et al.*, 2010b, Sarkar *et al.*, 2011).

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica consiste na remoção da hemicelulose e/ou a lignina para diminuir o grau de polimerização da celulose. Isso acarreta no aumento da capacidade digestiva das enzimas e conseqüentemente numa quantidade maior de açúcares fermentescíveis (Wyman *et al.*, 2005).

Os tratamentos da lignocelulose podem ser: (1) através de reagentes que incluem ácidos e bases, os quais solubilizam a lignina e/ou hemicelulose; (2) puramente físicos, no qual aumenta a reatividade do material frente às enzimas; (3) pré-tratamentos biológicos com fungos e bactérias que promovam a degradação seletiva do material. Esse último, entretanto, possui velocidade de degradação extremamente lenta (Rivers; Emert, 1987). Uma das melhores opções de pré-tratamento, combina princípios químicos e físicos, e entre os diferentes métodos, a hidrólise com ácidos diluídos dos açúcares presentes da porção hemicelulósica, seguida ou não de uma descompressão súbita (explosão), tem se mostrado eficiente, rápido e simples de ser realizado (Ramos, 2003); além de não produzirem compostos tóxicos que inibem o processo seguinte de fermentação (Dashtban; Schraft; Qin 2009).

Quando o material lignocelulósico está disponível para a hidrólise enzimática, três classes de enzimas atuam no complexo celololítico: (1) exo- $\beta$ -1,4-D-glucanases, que hidrolisam a cadeia de celulose a partir das suas extremidades liberando celobiose; (2) endo- $\beta$ -1,4-D-glucanases, que hidrolisam a cadeia celulósica internamente e aleatoriamente, e (3)  $\beta$ -1,4-D-glicosidases, que promovem a hidrólise da celobiose em glicose (Howard *et al.*, 2003; Bezerra; Dias, 2005).

A hidrólise na porção hemicelulósica da biomassa lignocelulósica requer uma quantidade maior de enzimas, visto que a hemicelulose apresenta uma natureza heterogênea. Entre os componentes hemicelulolíticos, a xilana representa o mais abundante deles,

contribuindo com mais de 70% de sua estrutura (Dashtban; Schraft; Qin 2009). A enzima endo- $\beta$ -1,4-D-xilanases hidrolisa aleatoriamente ligações glicosídicas internas da cadeia de xilana, produzindo oligossacarídeos menores. Esses xilooligossacarídeos da cadeia de xilana são por sua vez hidrolisados pelas  $\beta$ -1,4-xilosidases, produzindo a pentose xilose livre (Dashtban; Schraft; Qin 2009; Canilha *et al.*, 2010).

### 2.3 LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE

A xilose é o segundo carboidrato mais abundante na natureza, e também a pentose predominante na biomassa lignocelulósica das gramíneas (Matsushika *et al.*, 2009). Em virtude disso, a geração de bioetanol a partir dessa biomassa, depende da eficiente metabolização da pentose D-xilose pelos biocatalisadores (leveduras) (Nakamura *et al.*, 2008). Assim, a xilose torna-se uma ótima alternativa para produção de etanol combustível a partir da sua fermentação (Jeffries, 2006).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microrganismo utilizado na produção de etanol de primeira geração. Seu sucesso em fermentar eficientemente o caldo da cana-de-açúcar se deve a sua alta capacidade de fermentar os açúcares mesmo na presença de oxigênio e de tolerar: altas concentrações de etanol na fase final da fermentação, baixos níveis de pH do meio, o estresse osmótico provocado pelas altas concentrações dos açúcares e a pressão hidrostática ocasionada pelo grande volume de líquido contido nas dornas de fermentação (Lagunas, 1979, 1986; Landry *et al.*, 2006). No entanto, a produção do etanol de segunda geração depende da eficiente fermentação da xilose, e cepas selvagens de *S. cerevisiae* são incapazes de fermentar essa pentose (Stambuk *et al.*, 2008; Matsushika *et al.*, 2009).

Um dos primeiros relatos de que os fungos poderiam converter xilose a etanol veio nos anos 20, onde foi descrita *Fusarium lini* como uma levedura capaz de utilizar a xilose e acumular etanol (Gibbs *et al.*, 1953; Suihko; Enari 1981. Nos anos 80 começaram a ser descritas novas espécies capazes de fermentar a xilose, como em 1983, quando du Preez e Walt descreveram *Candida shehatae* como uma nova espécie fermentadora de xilose (du Preez; Walt, 1983).

Atualmente sabe-se que outras espécies de leveduras como *Candida succiphila*, *Candida jeffriesii*, *Candida intermedia*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis*, *Pichia tannophilus*, *Hansenula polymorpha*, *Debaryomyces hansenii*, fermentam a xilose produzindo etanol com diferentes graus de rendimento (Hähn-Hägerdal

*et al.*, 1994; Tavares *et al.*, 2000; Gárdonyi *et al.*, 2003; Ryabova *et al.*, 2003; Stambuk *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2006; Jeffries *et al.*, 2007).

Recentemente, outras duas espécies novas foram descritas como fermentadoras de xilose: *Spathaspora passalidarum*, levedura esta isolada do intestino de besouros que se alimentam de madeira (Nguyen *et al.*, 2006), e *Spathaspora arborariae*, levedura isolada a partir da madeira em decomposição de duas diferentes localidades do Brasil (Cadete *et al.*, 2009). Ambas as espécies são reconhecidas pela sua capacidade de fermentar a xilose e produzir etanol, tendo potencial para produção de biocombustível a partir de material vegetal (da Cunha-Pereira *et al.*, 2011).

Em 2011, da Cunha-Pereira e colaboradores mostraram que a levedura *Spathaspora arborariae*, além de boa fermentadora de xilose, é também tolerante a compostos inibidores gerados a partir da hidrólise da biomassa lignocelulósica. Espécies fermentadoras de xilose do clado *Spathaspora* podem ser utilizadas para produção direta de biocombustível, ou podem fornecer seus genes, enzimas e/ou transportadores para engenhar leveduras industriais que não possuam essa capacidade de fermentação da xilose (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Wohlbach *et al.*, 2011).

## 2.4 METABOLIZAÇÃO DA XILOSE

O primeiro passo para a metabolização da xilose é o transporte do açúcar através da membrana plasmática da célula (Fonseca *et al.*, 2007).

No interior da célula, a xilose é metabolizada por uma série de enzimas como ilustrado na Figura 1. Em leveduras, fungos filamentosos e bactérias, a conversão de xilose à xilulose procede através de dois passos: um de redução e outro de oxidação. Esses são mediados pelas enzimas xilose redutase (XR), que reduz a xilose em xilitol, e a xilitol desidrogenase (XDH), que oxida o xilitol à xilulose (Jin; Jeffries, 2004). Essa via de conversão à xilulose também pode ser realizada diretamente pela enzima xilose isomerase (XI), sem que haja a formação intermediária de xilitol (Jeffries, 2006). Entretanto, essa via (encontrada em bactérias e alguns fungos anaeróbios) não foi descrita em leveduras até o presente (Madhavan *et al.*, 2009). No passo seguinte, tanto em leveduras como em bactérias, a xilulose é fosforilada pela enzima xilulocinase (XK) para formar xilulose-5-fosfato. A xilulose-5-fosfato entra então na via das pentoses-fosfato (Figura 1) (descrita a seguir na seção 2.5.2).

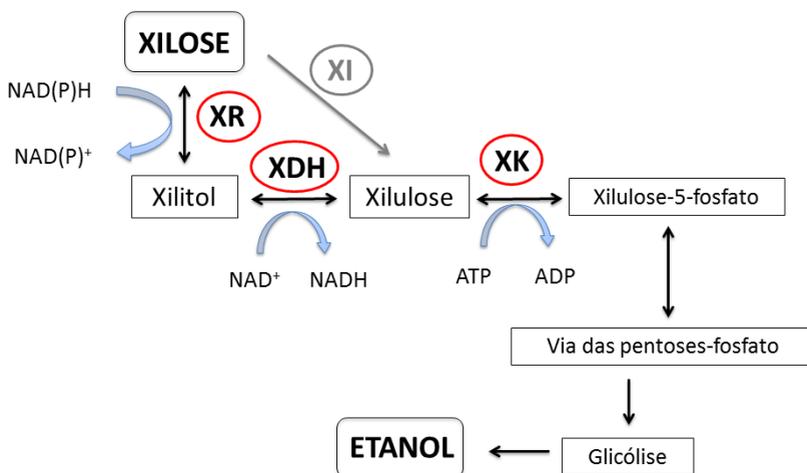


Figura 1 – Esquema simplificado do metabolismo de xilose até etanol por leveduras, fungos filamentosos e bactérias. Fonte: Alice Prompt.

A taxa de fermentação de xilose em condições anaeróbias é muito baixa, e além de uma pequena quantidade de etanol, o principal produto final da fermentação é o xilitol (Bruinenberg *et al.*, 1983a). A taxa de fermentação tem um aumento considerável, e, um maior rendimento de etanol é obtido quando é fornecido oxigênio para a fermentação. Bruinenberg *et al.*, (1983a), demonstraram que a utilização anaeróbia da xilose leva a um desequilíbrio redox, diminuindo a produção de etanol.

O acúmulo e a posterior secreção de xilitol ocorrem em virtude do desequilíbrio redox provocado pela diferença de afinidade das enzimas XR e XDH pelas suas coenzimas (vide Figura 1). Em algumas leveduras, a enzima xilose redutase exibe especificidade pelo cofator NADPH, formando  $\text{NADP}^+$  após a reação, enquanto que outras podem ter afinidade tanto pelo NADPH, quanto pelo NADH, formando  $\text{NADP}^+$  e  $\text{NAD}^+$ , respectivamente. No passo seguinte da via metabólica da xilose, a enzima xilitol desidrogenase utiliza apenas  $\text{NAD}^+$  como cofator, formando NADH após sua reação. Essa especificidade da XDH pelo  $\text{NAD}^+$  leva ao desequilíbrio redox, pois o NADH não pode ser reciclado em condições limitadas de oxigênio quando a enzima XR é específica para NADPH. Esse processo limita a fermentação da xilose pelas leveduras, pois gera um acúmulo de NADH e consequente formação de xilitol como subproduto, o que leva a uma diminuição da

produção de etanol (Kötter; Ciriacy, 1993; Lee, 1998; Eliasson *et al.*, 2000; Toivari *et al.*, 2001).

O acúmulo de NADH pode ser aliviado quando fornecido oxigênio em um nível baixo e controlado para a levedura (Skoog; Hähn-Hägerdal, 1990; van Maris *et al.*, 2007). Entretanto, esse controle torna-se inviável em fermentações de grande escala industrial, principalmente fermentações de hidrolisados lignocelulósicos (Jeffries, 2006). Na respiração aeróbia a cadeia transportadora de elétrons recebe os elétrons provenientes do NADH, aliviando seu acúmulo e reciclando o  $\text{NAD}^+$ , o que conseqüentemente, diminui o acúmulo de xilitol, pois a rota metabólica é capaz de seguir adiante. (Jin & Jeffries, 2004). A utilização de leveduras que tenham a enzima xilose redutase dependente tanto de NADPH como de NADH também pode aliviar o desequilíbrio dos cofatores, permitindo a produção de etanol em condições anaeróbias (Jeffries, 2006; Hähn-Hägerdal *et al.*, 1994). Outra alternativa para produção de etanol utilizando a xilose como substrato seria a descoberta de leveduras que possuem a enzima XI expressa; isso resolveria os problemas de equilíbrio dos cofatores e da produção de xilitol.

Embora *S. cerevisiae* não seja capaz de utilizar a xilose, vários trabalhos já demonstraram que essa levedura pode metabolizar o produto da sua isomerização, a xilulose. (Yu; Jeppsson; Hähn-Hägerdal, 1995; Jeffries; Shi, 1999; Eliasson *et al.*, 2000; Richard; Toivari; Penttilä, 2000). No entanto, o metabolismo desse isômero é bastante lento em virtude da baixa atividade da enzima xilulocinase (XK) nessa espécie (Deng; Ho, 1990). A incapacidade de *S. cerevisiae* em metabolizar a xilose se deve à baixa expressão dos genes que codificam as enzimas que promovem a isomerização da xilose a xilulose (XR e XDH), e sua posterior fosforilação pela XK (Toivari *et al.*, 2004).

A expressão heteróloga em *S. cerevisiae* de genes que codificam as enzimas XR e XDH de outras leveduras, tem se mostrado uma estratégia promissora. Os genes de *P. stipitis* que codificam essas enzimas foram integrados no genoma de *S. cerevisiae*, e foi verificado que as cepas recombinantes passaram a fermentar a xilose, apesar de ainda secretarem xilitol (Eliasson *et al.*, 2000 e Toivari *et al.*, 2001).

Outra estratégia utilizada para possibilitar a utilização de xilose por *S. cerevisiae*, é a expressão da enzima XI (Figura 1). Essa enzima permite que a xilose seja diretamente isomerizada à xilulose sem a utilização das coenzimas NAD(P)H ou  $\text{NAD}^+$ , contornando assim, o problema de desequilíbrio redox, o acúmulo de xilitol e a necessidade de oxigênio para fermentação (Matsushika *et al.*, 2009).

As leveduras fermentadoras de xilose não apresentam o mesmo desempenho fermentativo de *S. cerevisiae* em condições industriais (Stambuk *et al.*, 2008). Em um estudo recente, Hou (Hou, 2012a) demonstrou que mesmo em condições anaeróbias, a levedura *Spathaspora passalidarum* atingiu um alto grau de rendimento de produção de etanol e um rápido crescimento celular, superior à levedura fermentadora de xilose *Pichia stipitis*. Em condições aeróbias, quando posta para co-fermentar glicose e xilose, a levedura foi capaz de consumir toda a xilose após a total metabolização da glicose. Outro dado relevante desse trabalho foi que a levedura *Spathaspora passalidarum* possui uma enzima xilose redutase com afinidade maior por NADH, o que favorece a total metabolização de xilose e produção de etanol em ambiente anaeróbico. Os dados sugerem que leveduras do clado *Spathaspora* podem ser boas candidatas à fermentação em escala industrial de hidrolisados da biomassa lignocelulósica.

## 2.5 BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica é a transformação anaeróbia de açúcares em etanol e dióxido de carbono (Zamora, 2009), e pode ser demonstrada pela seguinte reação global:

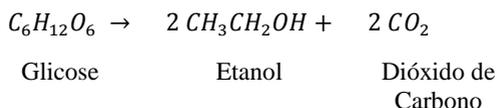


Figura 2 – Reação global da fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica por leveduras se dá através da utilização de açúcares fermentescíveis contidos em uma solução. É um processo biológico no qual a energia fornecida por reações de oxidação parcial é utilizada para o crescimento dos microrganismos e a oxidação anaeróbia dos açúcares utilizada para formação de etanol e dióxido de carbono. (Lima *et al.*, 2001).

### 2.5.1 Glicólise e fermentação alcoólica

A principal rota metabólica envolvida na fermentação alcoólica é a via glicolítica. Essa via é comum em praticamente todos os organismos procariotos e eucariotos. Nas células eucarióticas a glicólise ocorre no citoplasma (Berg; Tymoczko; Stryer, 2008).

A glicólise é uma via catabólica na qual uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas num processo que envolve onze reações químicas e liberação de energia na forma química de ATP (Barnett, 2008), como ilustrado na Figura 3.

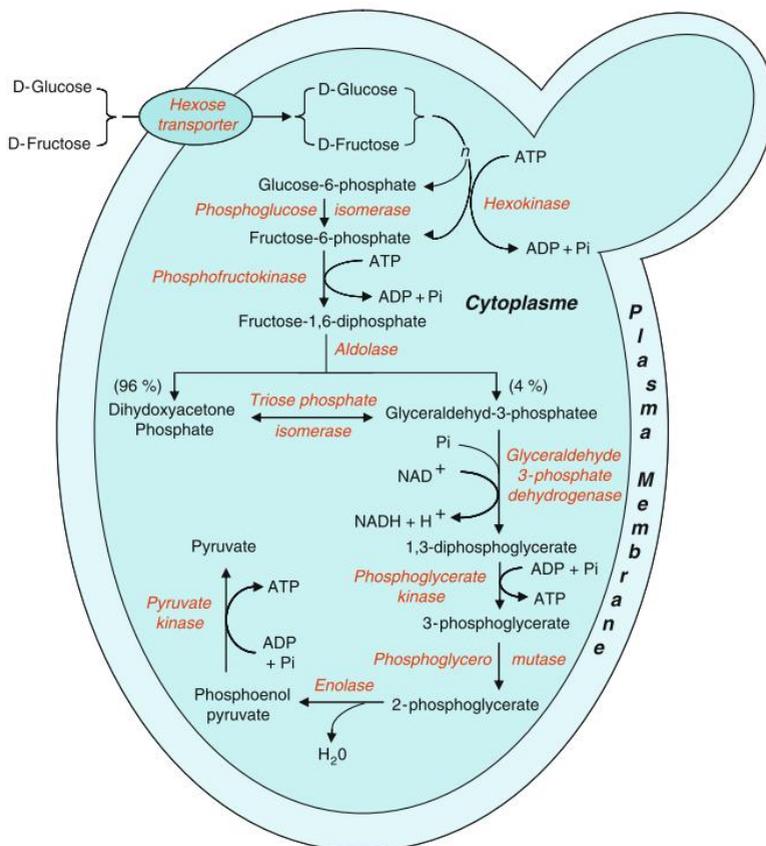


Figura 3 – Reações bioquímicas da via glicolítica em célula de levedura. Fonte: Zamora (2009).

O primeiro passo da glicólise é a fosforilação da glicose e frutose em glicose 6-fosfato mediada por uma família de enzimas hexocinas. Nessa reação uma molécula de ATP é consumida. Após essa reação, a enzima fosfoglicose isomerase converte glicose 6-fosfato em frutose 6-fosfato.

O passo seguinte é a fosforilação de frutose 6-fosfato em frutose 1-6-bifosfato mediada pela fosfofrutocinase. Esse passo também consome uma molécula de ATP. Em seguida, a enzima aldolase cliva a frutose 1-6-bifosfato e duas trioses fosfato são formadas: fosfato de dihidroxicetona e gliceraldeído 3-fosfato. O gliceraldeído 3-fosfato é então oxidado a 1,3-difosfoglicerato pela enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase. Essa reação envolve a redução de  $\text{NAD}^+$  a NADH, a fim de estabelecer o equilíbrio redox (Zamora, 2009). Em seguida, 1,3-difosfoglicerato é convertido a 3-fosfoglicerato, reação esta, catalisada pela fosfoglicerato cinase. Nessa reação é liberada uma molécula de ATP. Após essa reação, fosfoglicerol mutase converte 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato, que é, em seguida, desidratado a fosfoenolpiruvato por uma enolase. Através da enzima piruvato cinase, o fosfoenolpiruvato é convertido a piruvato, pela fosforilação de ADP em ATP. Piruvato é o produto final da glicólise (Zamora, 2009).

Na fermentação alcoólica das leveduras, o etanol é produzido a partir do piruvato formado na glicólise. Na primeira etapa ocorre a descarboxilação do piruvato pela enzima piruvato descarboxilase formando aldeído acético (ou etanal). Na segunda etapa da fermentação, o aldeído acético é reduzido a etanol pelo NADH, numa reação catalisada pela enzima álcool desidrogenase. Esse processo regenera o  $\text{NAD}^+$  consumido anteriormente durante a glicólise e fornece para a levedura um ganho de duas moléculas de ATP por cada molécula de hexose metabolizada (Barnett; Entian, 2014; Berg; Tymoczko; Stryer; 2008).

### **2.5.2 Via das pentoses fosfato**

A via das pentoses fosfato (PPP), rota bioquímica para o metabolismo da xilose, é encontrada em praticamente todos os organismos (Jeffries, 2006). A diferença principal entre o metabolismo de hexoses e pentoses, é que todas as pentoses devem passar pela via das pentoses fosfato (Hänh-Hagerdal *et al.*, 1994). Em leveduras, a via das pentoses fosfato é a principal via para formação de NADPH, coenzima necessária para a biossíntese de constituintes celulares como proteínas, lipídeos, DNA e RNA (Bruinenberg *et al.*, 1983b; Kruger; von Schaewen, 2003).

A via das pentoses fosfato pode ser dividida em duas fases: (1) a oxidativa, em que a hexose D-glicose 6-fosfato oxida-se a pentose D-ribulose 5-fosfato gerando NADPH e  $\text{CO}_2$ . E, (2) a fase não oxidativa, onde oses de três, quatro, cinco, seis e sete carbonos se interconvertem

em uma série de reações: D-ribulose 5P em D-ribose 5P, D-xilulose 5P, D-cedo-heptulose 7P, D-eritrose 4P, D-frutose 6P e D-gliceraldeído 3P (Jeffries, 2006; Berg; Tymoczko; Stryer; 2008). É através da xilulose 5-fosfato que a pentose D-xilose entra na PPP (Jeffries, 2006), como mostrado na Figura 1, e em mais detalhes na Figura 4.

A PPP se conecta à via glicolítica quando ocorre a formação de gliceraldeído 3P e cedo-heptulose 7P. Em seguida, esses dois compostos reagem formando frutose 6P e eritrose 4P. O excesso de pentoses formadas na PPP pode ser completamente transformado em intermediários da via glicolítica (Berg; Tymoczko; Stryer; 2008).

Tendo em vista o que foi dito até o momento, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização de novas espécies de leveduras fermentadoras de xilose e hidrolisados enzimáticos de bagaço da cana-de-açúcar, contribuindo assim, para a produção de etanol de segunda geração.



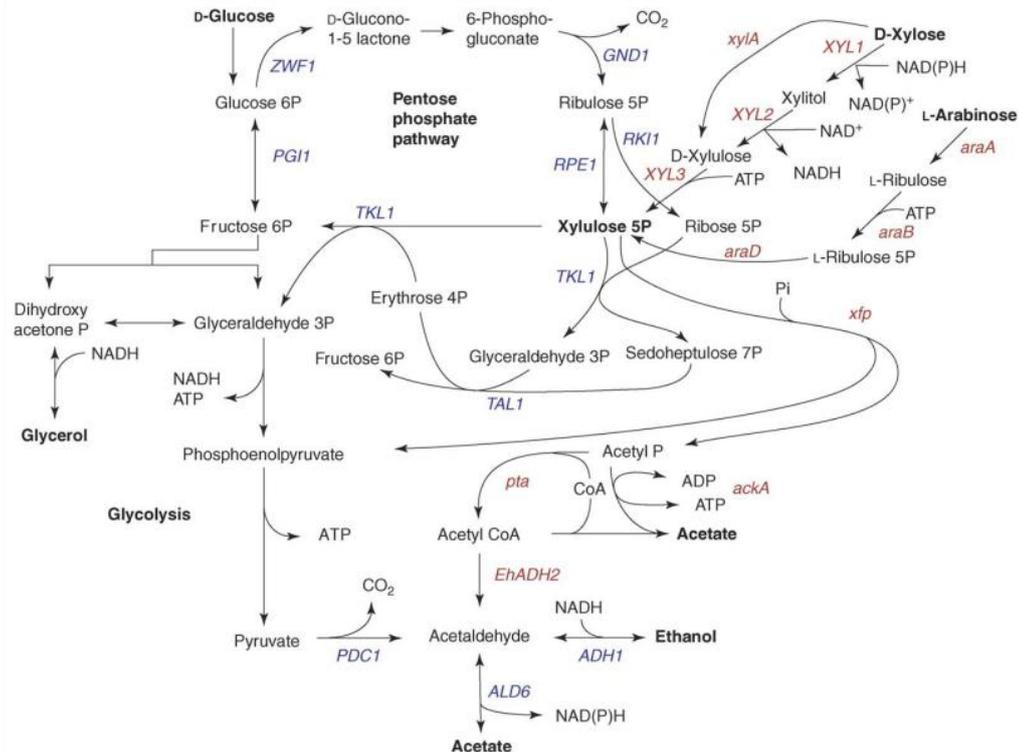


Figura 4 – Representação esquemática das vias de metabolização de hexoses e pentoses em leveduras. A ligação entre a via glicolítica e a via das pentoses-fosfato. Fonte: Jeffries (2006).



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como principal objetivo contribuir para o processo de produção de etanol combustível de segunda geração, através da caracterização de linhagens de leveduras do gênero *Spathaspora* isoladas da biodiversidade brasileira capazes de fermentar a pentose D-xilose.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver um método de análise em microescala (com placas de 96 poços) do crescimento e fermentação de açúcares por leveduras.
- Identificar linhagens de leveduras encontradas em madeira em decomposição que apresentem alta capacidade de consumo e fermentação de xilose.
- Avaliar os parâmetros cinéticos de crescimento e fermentação das leveduras em meio contendo glicose ou xilose.
- Avaliar o desempenho fermentativo das linhagens selecionadas durante fermentações em batelada simples em meios contendo glicose e xilose.
- Avaliar o desempenho fermentativo das linhagens selecionadas durante fermentações em batelada simples com hidrolisados enzimáticos de bagaço da cana-de-açúcar.
- Analisar a expressão gênica através de RT-PCR quantitativo de genes que codificam possíveis enzimas da via de metabolização da xilose (xilose redutase, xilulocinase e genes de transportadores ativos de xilose).



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 LEVEDURAS

Foram utilizados doze exemplares (HMD 1.1, HMD 1.3, HDM 2.1, HMD 10.2, HMD 14.1, HMD 16.2, XMD 16.2, HMD 19.3, XMD 23.2, HMD 23.3 e HMD 25.1) de leveduras isoladas de madeira em decomposição da região da Floresta Amazônica do Estado do Amazonas e região da Serra do Cipó do Estado de Minas Gerais. Todos esses exemplares foram cedidos pelo professor Dr. Carlos A. Rosa do departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais. A outra levedura estudada foi a linhagem HMD 19.1A<sup>T</sup> da espécie fermentadora de xilose *Spathaspora arborariae* (Cadete *et al.*, 2009).

Além destas leveduras, outras trinta cepas isoladas também de madeira em decomposição foram analisadas, sendo 14 linhagens (NSG 2.10.1a, NSG 2.10.1b, NSG 2.10.1c, NSG 2.4.1a, NSG 2.5.1a, NSG 2.5.2a, NSG 2.6.1a, NSG 2.6.2a, NSG 2.7.1a, NSG 2.7.2a, NSG 2.8.1a, NSG 2.9.1a, NSG 2.9.2a, e NSG 3.1.1a) coletadas nas redondezas da Gruta Nossa Senhora do Guadalupe, e 16 linhagens (Pal.2.1A, Pal.2.1B, Pal.2.2A, Pal.2.2B, Pal.4.1A, Pal.4.1B, Pal.4.2A, Pal.4.2B, Pal.4.3, Pal.5.1A, Pal.5.1B, Pal.5.2A, Pal.5.2B, Pal.5.3, Pal.5.4A, e Pal.5.4B) coletadas no Parque Palmital, ambos na cidade de Chapecó (SC). Estas leveduras foram cedidas gentilmente pelo professor Dr. Sérgio Luiz Alves Júnior da Universidade da Fronteira Sul, Campus de Chapecó.

### 4.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS LEVEDURAS

Para o cultivo das leveduras, foram utilizados meios líquidos ricos (YP) contendo 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 20 g L<sup>-1</sup> de bacto-peptona suplementados com 20 g L<sup>-1</sup> da fonte de carbono de interesse (glicose, xilose, arabinose, celobiose, sacarose, maltose ou galactose). Todos os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para 5,0 com ácido clorídrico.

As células de leveduras foram previamente cultivadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio líquido rico e 20 g L<sup>-1</sup> da fonte de carbono de interesse por 48 h. A seguir, as células foram inoculadas através de uma diluição de 100 vezes em frascos Erlenmeyer contendo 1/5 do seu volume de meio líquido de interesse e incubadas em um agitador orbital (Incubator Shaker Innova 44) a 28 °C e 160 r.p.m.

Em tempos pré-determinados, foram retiradas alíquotas dos frascos Erlenmeyers para quantificação do crescimento celular através da turbidez da amostra medida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 570 nm ( $DO_{570nm}$ ). Após centrifugação (3000 g por 2 minutos), o consumo dos açúcares e produção de etanol e/ou xilitol foi determinado através dos sobrenadantes das culturas como descrito a seguir (item 4.4).

Alternativamente, as células foram inoculadas em placas de 96 poços com 100  $\mu$ L de meio rico YP e 20 g  $L^{-1}$  da fonte de carbono de interesse por poço. Para evitar a contaminação e/ou evaporação dos meios, as placas de 96 poços foram seladas com “AccuClear Sealing Film for qPCR” (E & K Scientific), e portanto as condições de crescimento podem ser consideradas limitadas por oxigênio (ou micro aeróbias). As leveduras foram incubadas a 28 °C e 160 r.p.m por até 60 h em uma leitora multifuncional (Tecan Echisto Infinite M200 PRO), sendo a absorbância a 570 nm ( $DO_{570nm}$ ) determinada a cada 15 min. Ao final do crescimento celular as placas foram centrifugadas a 3000 g por 2 minutos para posterior quantificação do etanol produzido no sobrenadante dos meios (item 4.4.3).

## **4.3 ENSAIOS FERMENTATIVOS**

### **4.3.1 Fermentações em batelada com mistura de glicose e xilose**

Para o ensaio de fermentação em batelada, as leveduras foram pré-crescidas em meio líquido rico YP contendo 20 g  $L^{-1}$  xilose como fonte de carbono, até atingirem o início da fase exponencial ( $DO_{570nm} \pm 3$ ). Em seguida, as células foram centrifugadas (3500 g por 3 minutos), lavadas duas vezes com água destilada fria e suspensas em água a 4 °C de modo de atingirem uma  $DO_{570nm}$  de  $\pm 80$ . Em seguida, a suspensão celular foi misturada em frascos tipo Erlenmeyer com meio líquido rico YP duas vezes concentrado de forma a atingir uma concentração de 20 g  $L^{-1}$  de glicose e 20 g  $L^{-1}$  xilose. Durante tempos pré-determinados alíquotas do meio de fermentação foram removidas e processadas como descrito no item 4.4 para determinar o crescimento celular, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol.

### **4.3.2 Fermentações em batelada com hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar**

As leveduras utilizadas nas fermentações em batelada com hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar foram crescidas e processadas nas mesmas condições como as descritas acima. Após a centrifugação e concentração das células, as mesmas foram diretamente misturadas com os hidrolisados de forma a ter uma concentração final de células com uma  $DO_{570nm}$  de  $\pm 40$ . Os hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar foram obtidos através do pré-tratamento do bagaço por cozimento (200 °C por 7 min à pressão média de 15 atmosferas), seguido da hidrólise enzimática com enzimas obtidas dos fungos *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Aspergillus awamori*. A carga enzimática utilizada foi de 10 BGU/mL (mmol/min.mL) e 1 FPU/mL ( $\mu$ mol/min.mL) em tampão 50 mM citrato de sódio, pH 4,8. As hidrólises foram realizadas em frascos Erlenmeyer por 48 h a 50 °C sob agitação constante de 200 r.p.m. (Gonçalves, 2010).

## **4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **4.4.1 Determinação de glicose**

A concentração de glicose foi determinada com um kit comercial (BioDiagnostica-LaborClin), de acordo com as instruções do fabricante. Nesse ensaio, 10  $\mu$ L de cada amostra reagiram com 1 mL do reagente de cor (contendo as enzimas glicose oxidase e peroxidase) durante incubação a 37°C por 10 min. Em seguida, a quantidade de quinonimina (produto de coloração avermelhada) produzida na reação foi analisada a 505 nm em espectrofotômetro, o que permitiu a determinação da concentração de glicose em cada amostra através da correlação com a absorbância apresentada pela solução padrão (contendo 1 g de glicose L<sup>-1</sup>).

### **4.4.2 Determinação de xilose**

A concentração de xilose foi determinada como descrito por Miller (1959) com ácido 3,5-dinitrosalicílico (0,04 M de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 0,5 M NaOH, 0,7 M de tartarato de sódio e potássio e 0,04 M de fenol). Após incubação de 10 min a 100 °C a absorbância das

amostras foi determinada por espectrofotometria a 540 nm e correlacionada com uma curva padrão de 1-10 g de xilose L<sup>-1</sup>.

#### 4.4.3 Determinação de etanol

O etanol produzido foi quantificado enzimaticamente pela reação com a álcool oxidase e peroxidase, através de metodologias adaptadas dos protocolos descritos por Salgado *et al.*, (2000) e Rodionov; Keppen; Sukhacheva (2002). Para essa quantificação, 10 µL de amostra foram incubados em placas de 96 poços (de fundo plano) com 200 µL do reagente enzimático contendo 0,5 U/mL de álcool oxidase, 4 U/mL de peroxidase, 14 mM de 4-aminoantipirina e 60 mM de fenol em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,5). Após incubação, a absorbância foi medida a 505 nm em uma leitora multifuncional (Tecan Echisto Infinite M200 PRO). A concentração de etanol foi calculada pela correlação do valor de absorbância apresentada para cada amostra com equação de reta extraída de uma curva padrão construída com soluções padrão de etanol (1 - 10 g L<sup>-1</sup>).

#### 4.4.4 Cromatografia líquida de alta pressão

Alternativamente, as concentrações de açúcares e produtos da fermentação foram determinadas através de cromatografia líquida (HPLC da Jasco) nas seguintes condições: coluna HyperREZ XP ácido orgânico (Thermo Scientific), fase móvel com 5 mM de ácido sulfúrico, taxa de fluxo de 0,3 mL min<sup>-1</sup> durante 25 minutos, temperatura da coluna de 20 °C e detecção do índice de refração (IR -2031 plus, Jasco). As curvas de calibração foram estabelecidas utilizando três concentrações diferentes: na faixa de 5 a 20 g L<sup>-1</sup> para os açúcares glicose e xilose; e na faixa de 2,5 a 10 g L<sup>-1</sup> para xilitol, etanol e glicerol.

### 4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS DE RT-PCR QUANTITATIVO

Para verificação da expressão de diferentes genes envolvidos na metabolização da xilose, incluindo genes com homologia à xilose redutase (XR, **Error! Reference source not found.**), xilulocinase (XK, **Error! Reference source not found.**) e dois co-transportadores xilose-H<sup>+</sup> (**Error! Reference source not found.** e **Error! Reference source not found.**) presentes no genoma de *Spathaspora arborariae*, foram utilizados os

oligonucleotídeos descritos na Tabela 1. Células da cepa *S. arborariae* HMD 19.1a foram cultivadas em meios ricos YP acrescidos de 20 g L<sup>-1</sup> de glicose ou xilose. Ao atingirem a fase exponencial de crescimento as células foram coletadas por centrifugação (5.000 g, 4 min) para extração do RNA. O RNA total das células foi extraído utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Após a quantificação do RNA em espectrofotômetro (A<sub>260</sub> nm), 1 µg do mesmo foi tratado com DNase e utilizado para síntese de cDNA através do kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen) como descrito pelo fabricante.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados na análise da expressão gênica.

Oligonucleotídeos	Sequências (5´- 3´)
RT – XK – F1	GGATCTTGTC AACAGCATGG
RT – XK – R1	CAAGAAAGT GCCCCTGTAA
RT – XR2 – F3	ATCAAAGGGCCAGTCAACAC
RT – XR2 – R3	CCAACAATCACCACATTGGA
RT – t1 – F4	GCAACACCTTCATTAGTGG
RT – t1 – R4	CCTCCAGAAGTATATCCAC
RT – t4 – F5	GGTGGTGGTGCTTTATGG
RT – t4 – R5	GGATTGGTACTTGTGGCG
ACT1 – F	GCCTTGGACTTCGAACAAGA
ACT1 – R	TCCTTCTGTTTTGGGTTTGG

Para a realização do qRT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), foi utilizado o QuantiFast Sybr Green PCR kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os pares de oligonucleotídeos (vide Tabela 1) RT-XK-F1 e RT-XK-R1; RT-XR2-F3 e RT-XR2-R3; RT-t1-F4 e 1IR e RT-t4-F5 e 4IR, foram utilizados, respectivamente, para analisar a expressão dos genes Xyl-XK, Xyl-R, Xyl-Transp1 e Xyl-Transp4. Para cada amostra foi utilizado 20 µl de uma mistura contendo: 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix 10 µL, cDNA 3 µL, água livre de RNase 5 µL, Primer A 1 µL, Primer B 1 µL (solução estoque de Primers de 100 µM

em tampão Tris-HCl). As reações qRT-PCR foram realizadas no equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen) e os dados gerados a partir dessas reações foram analisados pelo *software* do próprio equipamento. Os valores da expressão representam uma quantificação relativa obtida através do quociente da quantidade de mRNA transcrito a partir de cada gene das células cultivadas em meio rico com xilose pela quantidade de mRNA transcrito a partir de cada gene das células quando cultivadas em meio rico com glicose como fonte de carbono. O gene calibrador utilizado no método foi o gene *ACT1* de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica para actina.

A fim de verificar a presença dos genes *ACT1* e genes homólogos a Xilose redutase e Xilulocinase na levedura *S. arborariae* HMD 19.1a, foi realizado um PCR de verificação dos oligonucleotídeos ACT1-F e ACT1-R, RT-XR2-F3 e RT-XR2-R3 e RT-XK-F1 e RT-XK-R1, respectivamente. Para o ensaio, as células de *S. arborariae* HMD 19.1a foram cultivadas em meio rico YP acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de xilose para extração do DNA. O DNA da levedura foi extraído utilizando o kit de extração YeaStar Genomic DNA Kit<sup>TM</sup> (Zymo Research). Para verificação dos oligonucleotídeos, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose 2% em TBE 0,5x (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, ácido bórico 50 mM, EDTA 1 mM) corado com 0,5 µg de Brometo de Etídio/ mL. A mistura para o PCR foi composta de 10,9 µL de água milliQ, 5 µL tampão 5x GoTaq Buffer, 0,8 µL DNTP, 0,8 µL Primer F, 0,8 µL Primer R, 1,5 µL DNA e 0,2 µL da enzima Taq DNA Polimerase.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foram analisadas 42 linhagens de leveduras isoladas de madeira em decomposição em diferentes ecossistemas brasileiros, buscando identificar linhagens e/ou novas espécies de leveduras capazes de fermentar a pentose D-xilose. Inicialmente desenvolvemos um método de análise em microescala (com placas de 96 poços, Marešová; Sychrová, 2007) do crescimento e fermentação de açúcares por leveduras. Pelo formato da placa (8 x 12 poços), é possível analisar o crescimento simultâneo de, por exemplo, 12 linhagens de levedura em 7 diferentes fontes de carbono de interesse (mais um poço usado como controle negativo, sem fonte de carbono), utilizando ainda pequenos volumes (100 µL) dos meios de cultivo. Foram escolhidos os açúcares glicose, xilose, arabinose, celobiose, sacarose, maltose e galactose, e como as placas foram seladas, o crescimento ocorreu em condições micro aeróbias. O etanol produzido após o término do cultivo das leveduras nos diferentes meios foi dosado enzimaticamente como descrito no item 4.4.3. Paralelamente, em colaboração com o Dr. Carlos A. Rosa do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, as mesmas linhagens passaram por análises moleculares (sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 e D1/D2 variáveis da subunidade maior do RNA ribossomal) e fisiológicas para serem taxonomicamente identificadas.

Nenhum dos isolados coletados no Parque Palmital da cidade de Chapecó (Pal.2.1A, Pal.2.1B, Pal.2.2A, Pal.2.2B, Pal.4.1A, Pal.4.1B, Pal.4.2A, Pal.4.2B, Pal.4.3, Pal.5.1A, Pal.5.1B, Pal.5.2A, Pal.5.2B, Pal.5.3, Pal.5.4A, e Pal.5.4B) apresentou crescimento nas condições testadas nas placas, indicando que provavelmente estas leveduras são incapazes de crescer em condições limitadas em oxigênio (micro aeróbias). De fato, estas leveduras foram identificadas como pertencentes à espécie *Cryptococcus flavescens*, também chamada de *Cryptococcus laurentii*, uma levedura capaz de crescer em xilose e outros açúcares, mas que não é capaz de fermentar nem a glicose (Lodder; van Rij, 1952).

A Figura 5 mostra o crescimento celular e produção de etanol de quatro linhagens “NSG” (NSG2.5.2a, NSG2.7.2a, NSG2.10.1B e NSG2.9.1a) isoladas nas redondezas da Gruta de Nossa Senhora de Guadalupe (Chapecó/SC). Conforme mostrado na Figura 5, todas as cepas apresentaram um mesmo padrão de crescimento e produção de etanol, com os diferentes açúcares (fermentaram a glicose, xilose, maltose e galactose),

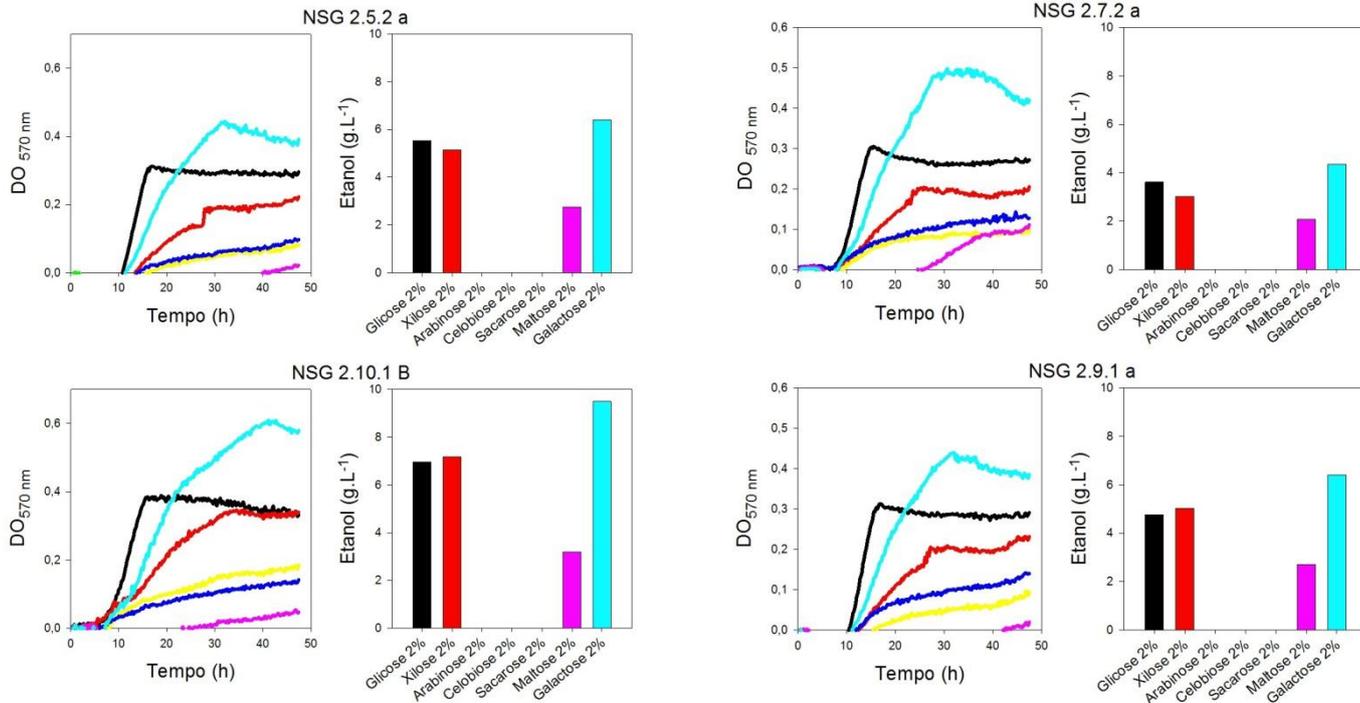


Figura 5 – Crescimento ( $DO_{570nm}$ ) e produção de etanol pelas leveduras NSG2.5.2a, NSG2.7.2a, NSG2.10.1B e NSG2.9.1a em meio rico YP contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose (preto), xilose (vermelho), arabinose (verde), celobiose (amarelo), sacarose (azul escuro), maltose (rosa), e galactose (azul claro). Os valores de  $DO_{570nm}$  apresentados correspondem aos obtidos após a subtração das absorvâncias registradas no poço sem fonte de carbono.

chegando uma das linhagens a produzir 7,1 g de etanol L<sup>-1</sup> a partir da xilose. Todas estas linhagens apresentadas na Figura 5 foram posteriormente identificadas como pertencentes à espécie *Candida shehatae* uma levedura já descrita como eficiente fermentadora de xilose (du Preez; Walt, 1983). Apenas uma linhagem isolada na Gruta Nossa Senhora do Guadalupe (NSG3.1.1.1A) não é *C. shehatae*, e foi identificada como uma levedura próxima à espécie *Candida solani*. Entretanto, este isolado também não cresceu nas condições testadas na placa.

Os gráficos apresentados nas Figura 6 e 7 mostram as curvas de crescimento e produção de etanol em diferentes açúcares por quatro isolados de madeira em decomposição da região amazônica do Brasil (vide Cadete *et al.*, 2012), linhagens HMD19.3, XMD16.2, XMD23.2 e HMD25.1. A cepa HMD19.3 (Figura 6) apresentou um baixo crescimento celular quando comparada às outras três leveduras analisadas e a produção de etanol também foi baixa em torno de 1,0 a 1,5 g de etanol L<sup>-1</sup> a partir da glicose, maltose e galactose. A linhagem XMD16.2 (Figura 6) cresceu melhor nas diferentes fontes de carbono, e além de fermentar de forma semelhante glicose, maltose e galactose, produziu um pouco de etanol a partir da xilose. No caso das linhagens XMD23.2 e HMD25.1 (Figura 7) observou-se fermentação apenas de glicose, mas traços de etanol foram produzidos a partir de xilose e maltose.

É importante salientar que serão necessários mais estudos para aperfeiçoar os ensaios de crescimento e fermentação em microescala, incluindo uma otimização no tempo da coleta do meio para a dosagem de etanol uma vez que muitas leveduras consomem este álcool após a fonte de carbono ter acabado. De qualquer forma, e considerando que as análises moleculares (Figura 8) e fisiológicas indicavam que as linhagens mostradas nas Figura 6 e 7 eram novas espécies do gênero *Spathaspora* (incluindo também a linhagem HMD23.3), estas leveduras foram melhor caracterizadas quanto a sua capacidade de consumir e fermentar a xilose.

Estas linhagens classificadas como novas espécies de leveduras *Spathaspora* fermentadoras de xilose receberam os nomes de *Spathaspora brasiliensis* (linhagem HMD19.3), *Spathaspora suhii* (linhagem XMD16.2), *Spathaspora roraimanensis* (linhagem XMD23.2), e *Spathaspora xylofermentans* (linhagens HMD23.3 e HMD25.1). Além destas novas espécies de levedura, foram também analisadas outros isolados da espécie *Spathaspora passalidarum* (linhagens HMD10.2 e HMD14.2) também coletados em madeira em decomposição da região amazônica do Brasil (Cadete *et al.*, 2012).

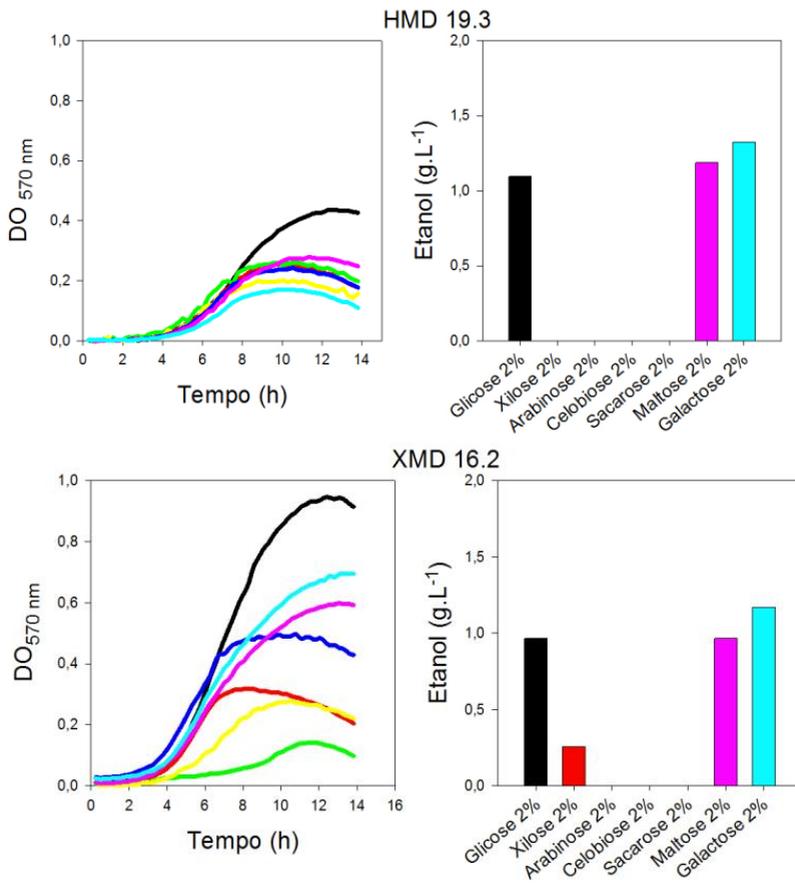


Figura 6 - Crescimento ( $DO_{570nm}$ ) e produção de etanol pelas leveduras HMD19.3 e XMD16.2 em meio rico YP contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose (preto), xilose (vermelho), arabinose (verde), celbiose (amarelo), sacarose (azul escuro), maltose (rosa), e galactose (azul claro). Os valores de  $DO_{570nm}$  apresentados correspondem aos obtidos após a subtração das absorvâncias registradas no poço sem fonte de carbono.

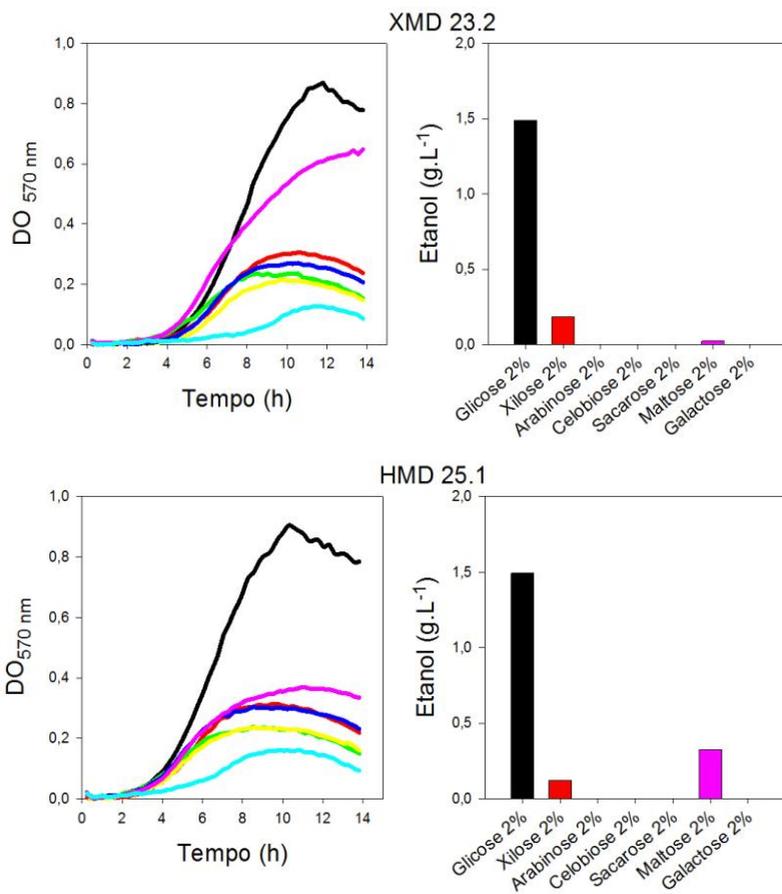


Figura 7 – Crescimento ( $DO_{570nm}$ ) e produção de etanol pelas leveduras XMD23.2 e HMD25.1 em meio rico YP contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose (preto), xilose (vermelho), arabinose (verde), celobiose (amarelo), sacarose (azul escuro), maltose (rosa) e galactose (azul claro). Os valores de  $DO_{570nm}$  apresentados correspondem aos obtidos após a subtração das absorvâncias registradas no poço sem fonte de carbono.

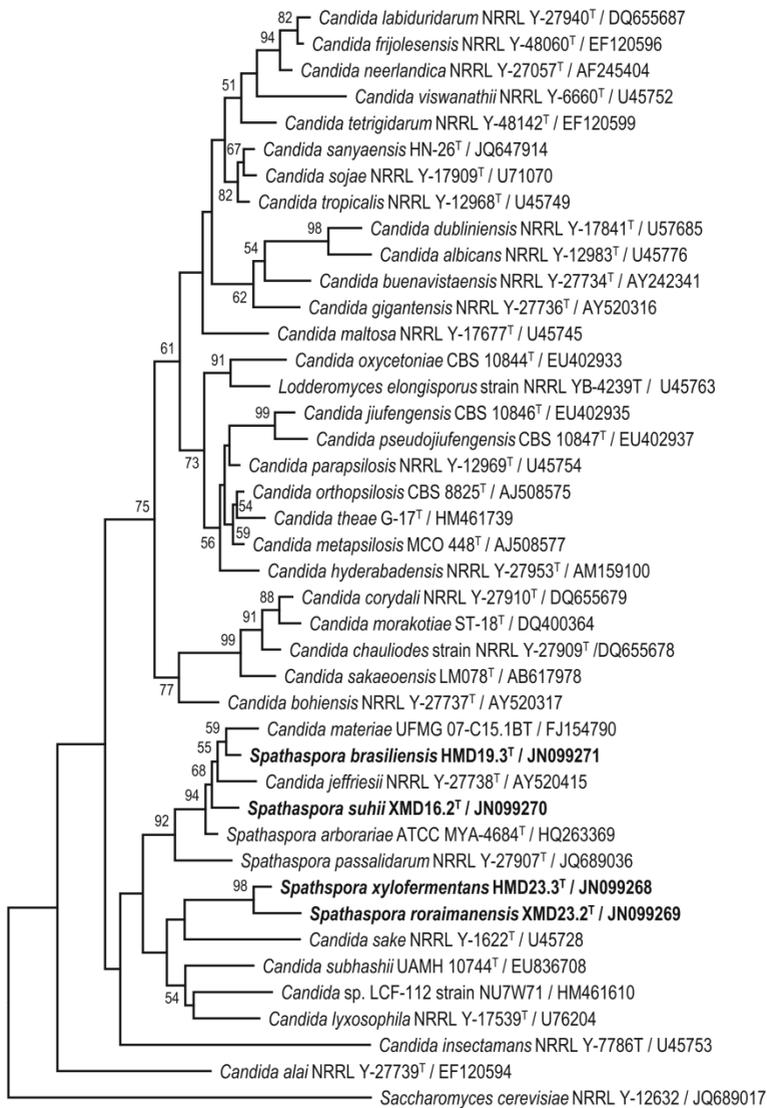


Figura 8 - Posição filogenética das novas espécies de *Spathaspora* (em negrito) determinado pelas sequencias da região D1/D2 LSU do RNA ribossomal, utilizando o programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Fonte: Cadete *et al.*, (2013).

Para uma análise mais detalhada dos parâmetros fermentativos (crescimento celular, consumo de açúcar e produção de etanol), as leveduras do clado *Spathaspora* foram crescidas em frascos Erlenmeyer contendo meio rico YP contendo duas fontes de carbono separadamente: glicose ou xilose (ambas com uma concentração de 20 g L<sup>-1</sup>). A Figura 9 mostra os resultados obtidos com *Spathaspora brasiliensis*, *Spathaspora suhii*, e *Spathaspora roraimanensis*, enquanto que na Figura 10 são mostrados os resultados obtidos com duas linhagens de *Spathaspora xylofermentans*, e na Figura 11 com duas linhagens da espécie *Spathaspora passalidarum*.

A análise da utilização de glicose e xilose pelas diferentes espécies do gênero *Spathaspora* durante o crescimento aeróbico mostrou que todas elas são capazes de produzir etanol a partir de ambos os açúcares, porém com diferentes rendimentos (Figura 9, 10 e 11 e Tabela 2). Com exceção da levedura *S. xylofermentans* HMD25.1, todas as outras leveduras *Spathaspora* analisadas apresentaram um maior rendimento na produção de etanol quando cultivadas em xilose como fonte de carbono, em comparação com o crescimento em glicose (Tabela 2). Entretanto, os baixos rendimentos na produção de etanol pelas leveduras *S. brasiliensis*, *S. suhii*, e *S. roraimanensis* indicam que, da mesma forma do que várias outras leveduras (Stambuk *et al.* 2003; Suh; Blackwel, 2004; Merico *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2009; Boonmak *et al.* 2011; Rozpędowska *et al.* 2011), estas novas espécies de *Spathaspora* preferem consumir os açúcares de forma oxidativa. Consistente com esta observação são as altas concentrações celulares obtidas particularmente com *S. brasiliensis* e com *S. suhii* quando crescida em glicose (Figura 9).

Tabela 2 – Rendimento (g de etanol g<sup>-1</sup> de açúcar) fermentativo durante o crescimento em glicose ou xilose pelas leveduras *Spathaspora*.

Cepa	Y <sub>Etanol/glicose</sub>	Y <sub>Etanol/xilose</sub>
<i>Spathaspora brasiliensis</i> HMD19.3	0,08 ± 0,01	0,15 ± 0,04
<i>Spathaspora suhii</i> XMD16.2	0,11 ± 0,03	0,18 ± 0,05
<i>Spathaspora roraimanensis</i> XMD23.2	0,14 ± 0,04	0,29 ± 0,05
<i>Spathaspora xylofermentans</i> HMD25.1	0,36 ± 0,03	0,33 ± 0,04
<i>Spathaspora passalidarum</i> HMD14.2*	0,22	0,33
<i>Spathaspora arborariae</i> HMD19.1a*	0,35	0,37

Os dados apresentados equivalem à média e desvio padrão de dois experimentos independentes, com exceção daqueles marcados com “\*” (um único experimento).

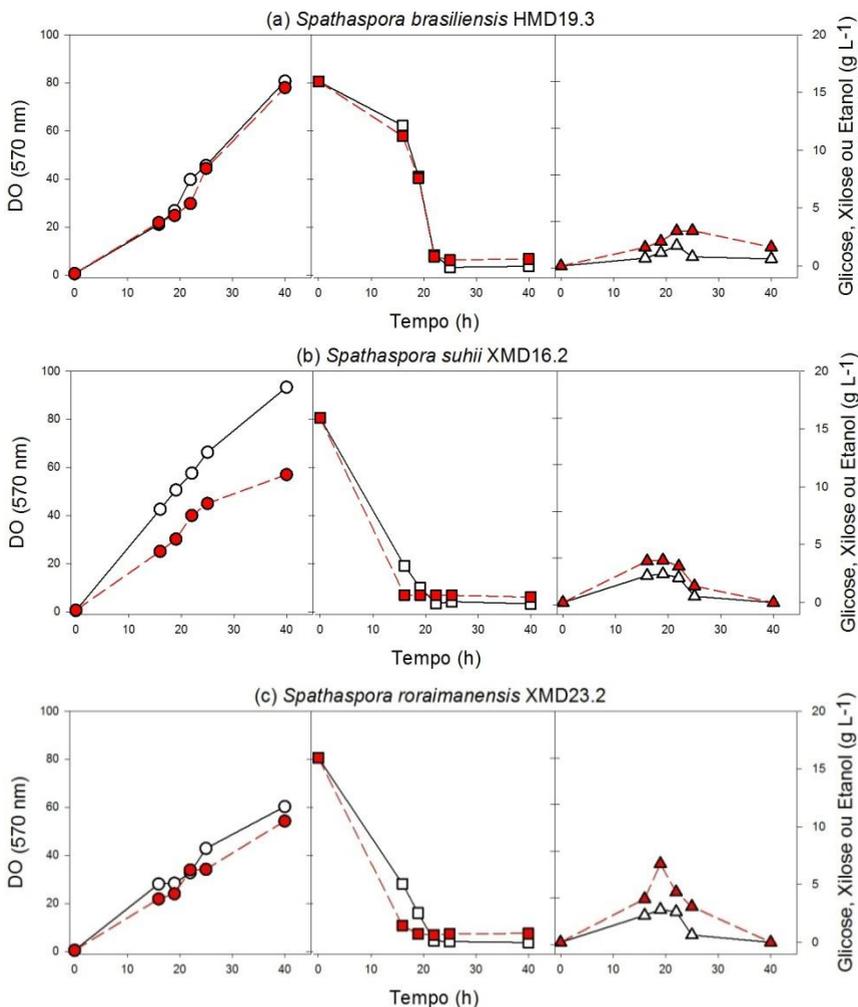


Figura 9 - Crescimento das leveduras (a) *S. brasiliensis* HMD19.3, (b) *S. suhii* XMD16.2 e (c) *S. roraimanensis* XMD23.2 em meios ricos YP contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose (símbolos abertos) ou xilose (símbolos fechados). Os gráficos representam o crescimento celular (painéis à esquerda), o consumo dos açúcares (painéis centrais), e produção de etanol (painéis à direita) pelas leveduras a 28 °C e 160 r.p.m.

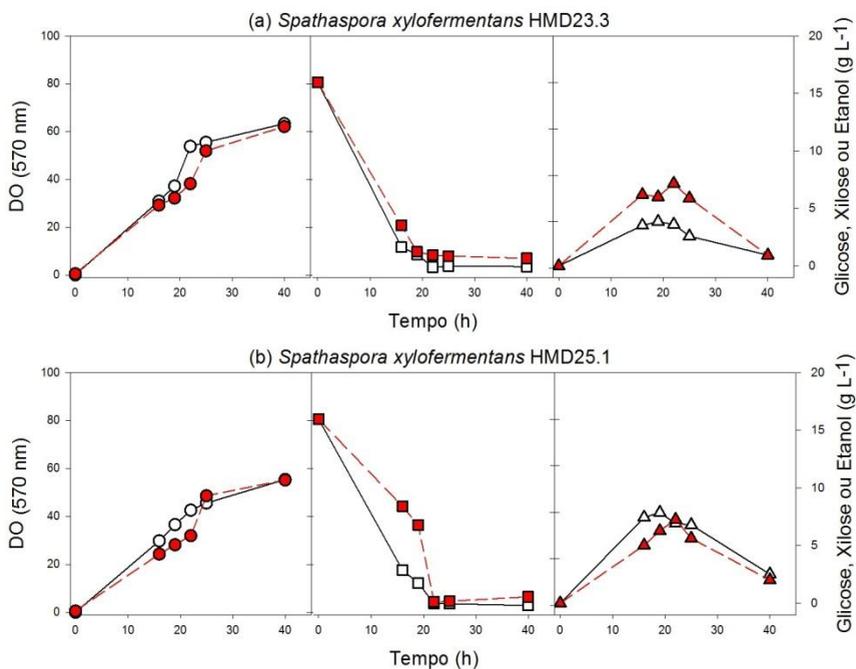


Figura 10 - Crescimento das leveduras (a) *S. xylofermentans* HMD23.3 e (b) HMD25.1 em meios ricos YP contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose (símbolos abertos) ou xilose (símbolos fechados). Os gráficos representam o crescimento celular (painéis à esquerda), o consumo dos açúcares (painéis centrais), e produção de etanol (painéis à direita) pelas leveduras a 28°C e 160 r.p.m.

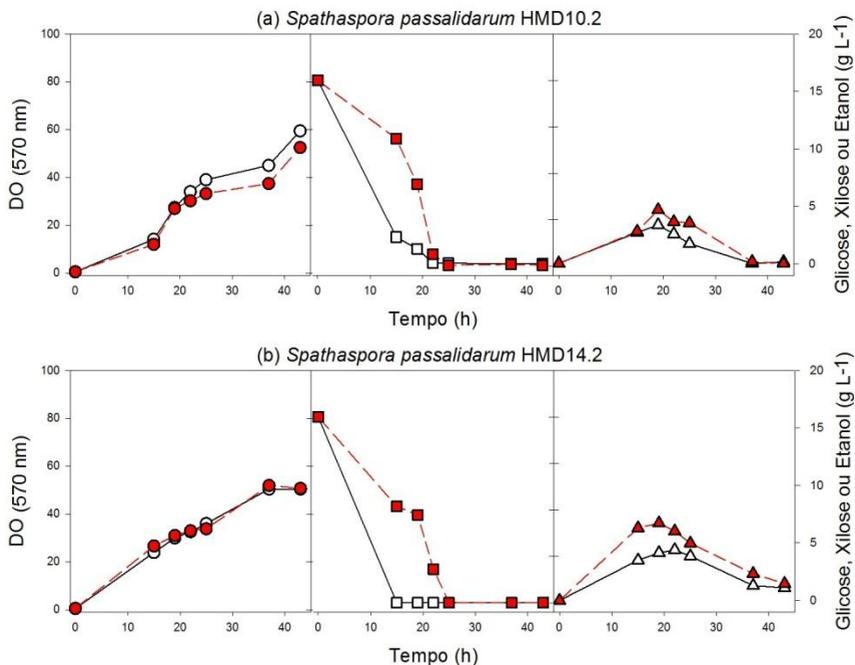


Figura 11 - Crescimento das leveduras (a) *S. passalidarum* HMD10.2 e (b) HMD14.2 em meios ricos YP contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose (símbolos abertos) ou xilose (símbolos fechados). Os gráficos representam o crescimento celular (painéis à esquerda), o consumo dos açúcares (painéis centrais), e produção de etanol (painéis à direita) pelas leveduras a 28°C e 160 r.p.m.

As leveduras *S. xylofermentans* HMD25.1 e HMD23.3 apresentaram um bom rendimento de etanol com ambos os açúcares testados (Figura 10, e Tabela 2), resultado condizente com o reportado para outras leveduras fermentadoras de xilose do gênero *Spathaspora* (Cadete *et al.*, 2009; da Cunha-Pereira *et al.*, 2011; Hou 2012; Long *et al.*, 2012; Mouro, 2012). A seguir foi verificado se as novas espécies fermentadoras de xilose do gênero *Spathaspora* podem contribuir para a produção de bioetanol a partir de co-fermentações xilose/glicose, e fermentação de hidrolisados enzimáticos de biomassa lignocelulósica (bagaço de cana-de-açúcar).

Tendo em vista que para ocorrer à fermentação da biomassa lignocelulósica os microrganismos devem ser capazes de fermentar diversos açúcares, foi realizado inicialmente um ensaio de fermentação em batelada com altas concentrações celulares em meios ricos YP contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e 20 g L<sup>-1</sup> de xilose. O consumo dos substratos e produção de etanol, xilitol e glicerol determinado por HPLC como descrito em Materiais e Métodos (4.4.4). Na Figura 12 estão mostrados os resultados obtidos com as leveduras *S. brasiliensis* HMD19.3, *S. suhii* XMD16.2, e *S. roraimanensis* XMD23.2. Nessas 3 leveduras o consumo de glicose ocorreu primeiro, e a xilose só passou a ser consumida após a glicose ter sido fermentada pelas células; resultados condizentes com aqueles já descritos para outras leveduras fermentadoras de xilose, incluindo *S. arborariae* (Panchal *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2002; Stambuk *et al.*, 2003; Cadete *et al.*, 2009).

Em consonância com os dados obtidos durante o crescimento, estas três leveduras *Spathaspora* também diferiram em relação aos produtos da fermentação: a levedura *S. brasiliensis* HMD19.3 foi a que menos produziu etanol, mas produziu a maior quantidade de xilitol entre as linhagens (Figura 12a). Este xilitol foi produzido apenas durante o consumo da xilose, sugerindo que a via de produção de etanol é desviada para produção de xilitol, e provavelmente uma consequência direta do desbalanço de cofatores entre a xilose redutase (geralmente NADPH dependente) e xilitol desidrogenase (geralmente NAD<sup>+</sup> dependente). Já a levedura *S. suhii* XMD16.2 produziu praticamente a mesma quantidade de etanol e xilitol durante a co-fermentação de xilose/glicose (Figura 12b), enquanto que a linhagem de *S. roraimanensis* XMD23.2 claramente produziu mais etanol do que xilitol (Figura 12c). Nas três co-fermentações de xilose/glicose por *S. brasiliensis*, *S. suhii* e *S. roraimanensis*, a produção de glicerol manteve-se constante até o final, com concentrações que não ultrapassaram 1,5 a 2,0 g de glicerol L<sup>-1</sup>.

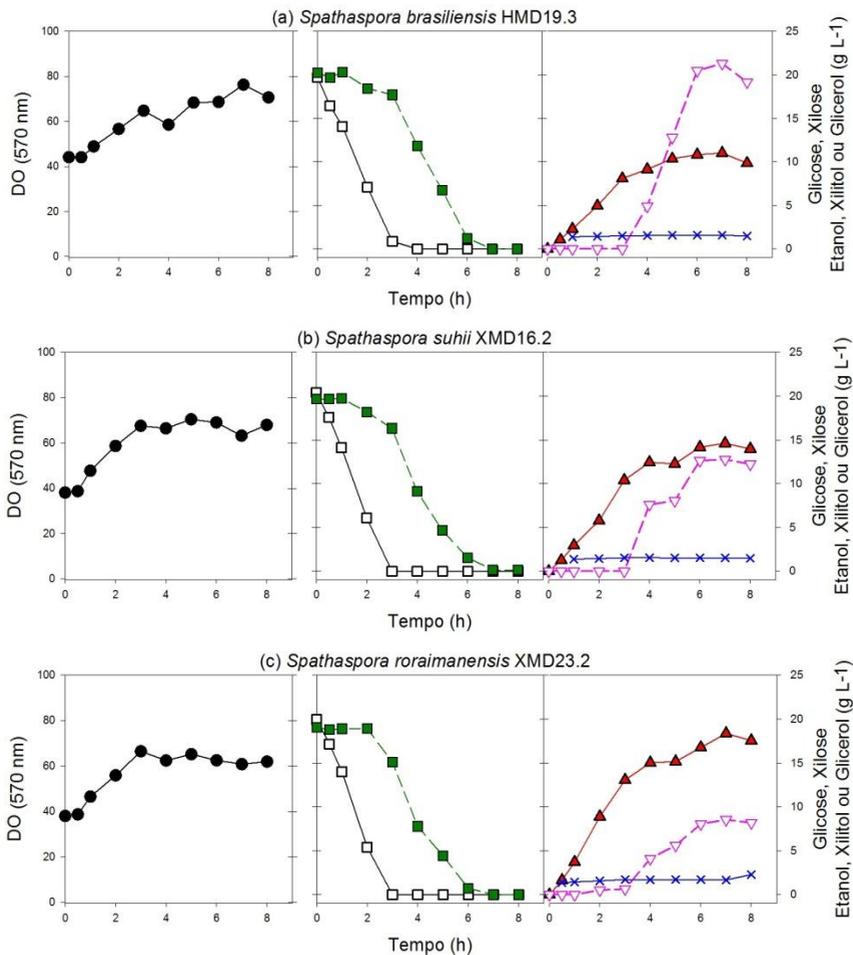


Figura 12 - Análise da fermentação em batelada simples das cepas (a) *Spathaspora brasiliensis* HMD19.3, (b) *Spathaspora suhii* XMD16.2 e (c) *Spathaspora roraimanensis* XMD23.2. Os gráficos da esquerda representam o crescimento celular em YPDX 2% (círculo fechado). Os gráficos centrais mostram o consumo de glicose (quadrado aberto) e xilose (quadrado fechado). Os gráficos da direita mostram a produção de etanol (triângulo para cima fechado), xilitol (triângulo para baixo aberto) e glicerol (cruz) em YPDX 2%.

Resultados distintos foram obtidos com as linhagens de *S. xylofermentans* (Figura 13), uma vez que estas leveduras aparentemente sofrem uma maior repressão pela glicose e tardam mais para consumir a xilose (após terem consumido a glicose) durante as co-fermentações de xilose/glicose. Por exemplo, enquanto que as leveduras *S. brasiliensis*, *S. suhii* e *S. roraimanensis* consumiram a glicose em torno 3 h e a xilose em torno 6 h, a levedura *S. xylofermentans* HMD23.3 tardou praticamente 8 h para consumir toda a xilose (embora consumiu a glicose em 2,5-3 h), e a linhagem HMD25.1 não consumiu a xilose completamente, permanecendo ainda no meio YP cerca de 8 g L<sup>-1</sup> de xilose após 8 h de fermentação. Outra característica diferente desta espécie de *Spathaspora* é a quase total ausência de produção de xilitol, ou uma produção tão baixa ( $\leq 2,5$  g L<sup>-1</sup>) quanto àquela observada para o glicerol (Figura 13).

Tendo em vista os resultados acima, onde as cinco novas linhagens do gênero *Spathaspora* se revelaram boas fermentadoras de xilose e glicose, foi realizado um experimento de fermentação em batelada onde o substrato foi o hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar (Gonçalves, 2010). Em todas as análises foi observado que o hidrolisado “B” apresentou maior concentração de xilose e glicose do que o hidrolisado “A” (Figura 14 - 18).

As Figura 14, 15 e 16 revelam as análises fermentativas das espécies *S. brasiliensis*, *S. suhii* e *S. roraimanensis*, em dois tipos de hidrolisados, respectivamente. As Figura 17 e 18 mostram as fermentações nos dois tipos de hidrolisados das leveduras HMD23.3 e HMD25.1 da espécie *S. xylofermentans*, respectivamente. Todas as leveduras consumiram a glicose mais rapidamente no hidrolisado “B” quando comparado ao consumo no hidrolisado “A”.

Corroborando com os resultados anteriores a *S. brasiliensis* foi a levedura que teve o menor rendimento na produção de etanol, apresentando uma produção máxima de 4 g L<sup>-1</sup> a partir do hidrolisado “B” (Figura 14b). A levedura consome a xilose mais lentamente do que a glicose em ambos os hidrolisados, e ao fim de 8 h de fermentação, ainda restava xilose no meio hidrolisado “B”. Assim como nos resultados anteriores, a levedura *S. suhii* (Figura 15) e a levedura *S. roraimanensis* (Figura 16) produziram mais etanol do que a levedura *S. brasiliensis*, apresentando em torno de 6 g de etanol L<sup>-1</sup> a *S. suhii* (Figura 15a) e 8 g de etanol L<sup>-1</sup> a levedura *S. roraimanensis* (Figura 16a).

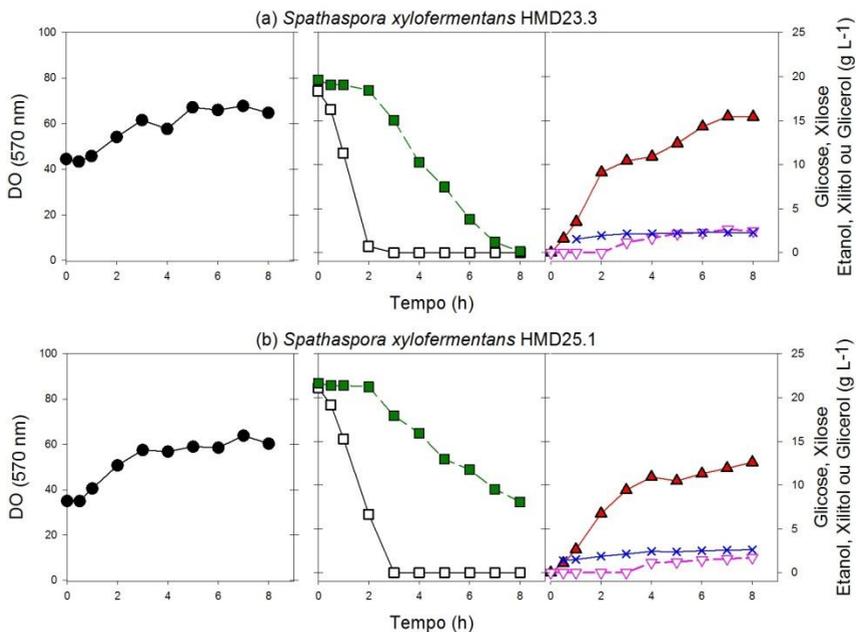


Figura 13 - Análise da fermentação em batelada simples das cepas (a) *Spathaspora xylofermentans* HMD23.3 e (b) *Spathaspora xylofermentans* HMD25.1. Os gráficos da esquerda representam o crescimento celular em YPDX 2% (círculo fechado). Os gráficos centrais mostram o consumo de glicose (quadrado aberto) e xilose (quadrado fechado). Os gráficos da direita mostram a produção de etanol (triângulo para cima fechado), xilitol (triângulo para baixo aberto) e glicerol (cruz) em YPDX 2%.

As Figura 18 e 17 mostram o estudo das fermentações em batelada com hidrolisados das cepas HMD25.1 e HMD23.3 da espécie *Spathaspora xylofermentans*, respectivamente. As duas leveduras consumiram a xilose mais lentamente nos dois substratos, como podemos observar nos quatro gráficos (Figura 18 e 17), onde a xilose se esgotou no final das 8 h de fermentação. Em relação ao produto, verificou-se que a cepa *S. xylofermentans* HMD25.1 teve produção de 6,2 g de etanol L<sup>-1</sup> em 8 h de fermentação (Figura 18b). A levedura *S. xylofermentans* HMD23.3, também apresentou um bom rendimento na produção de etanol, atingindo uma produção máxima de 7,5 g L<sup>-1</sup> de etanol em 6 h de fermentação (Figura 17b).

Assim como já demonstrado por da Cunha *et al.*, (2011), esses resultados de fermentação com hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar sugerem que, a partir de estudos mais aprofundados, as novas espécies de leveduras fermentadoras de xilose possam ser futuramente utilizadas para produção de bioetanol diretamente a partir da biomassa lignocelulósica.

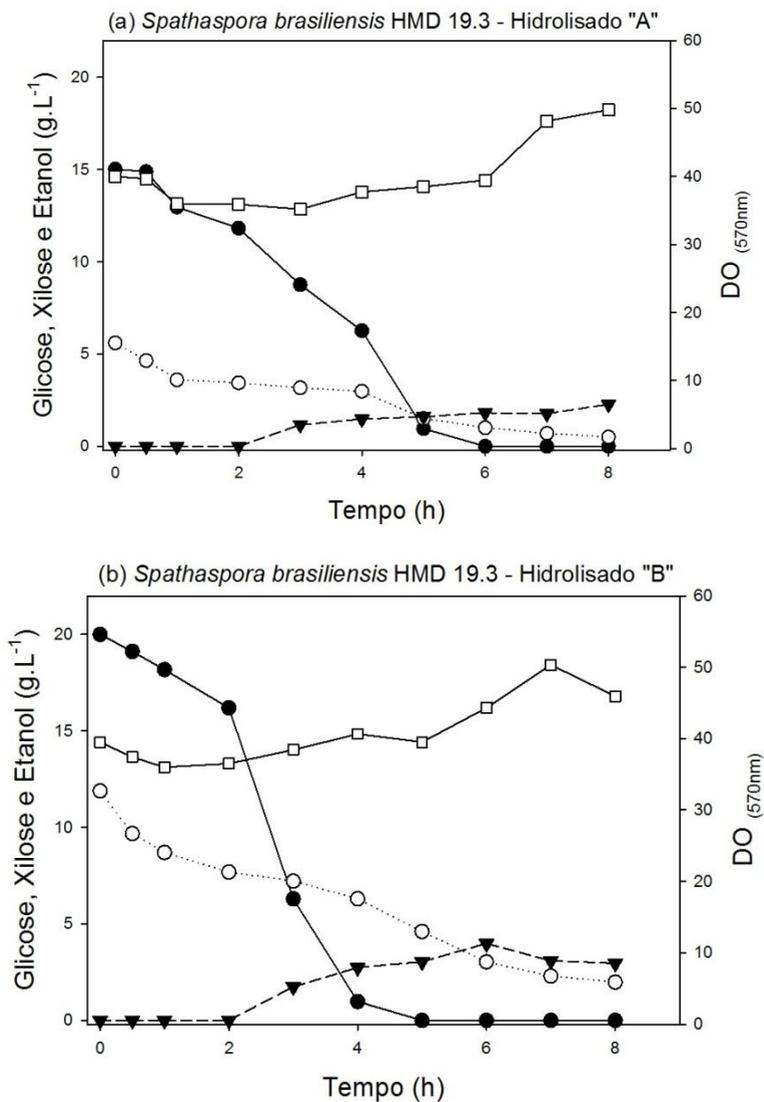


Figura 14 – Fermentação em batelada com hidrolisados de cana-de-açúcar da levedura *Spathaspora brasiliensis* HMD 19.3 utilizando hidrolisado “A” (a) e hidrolisado “B” (b) como substrato. A imagem mostra o crescimento celular (quadrado aberto), consumo de glicose (círculo fechado), consumo de xilose (círculo aberto) e produção de etanol (triângulo fechado).

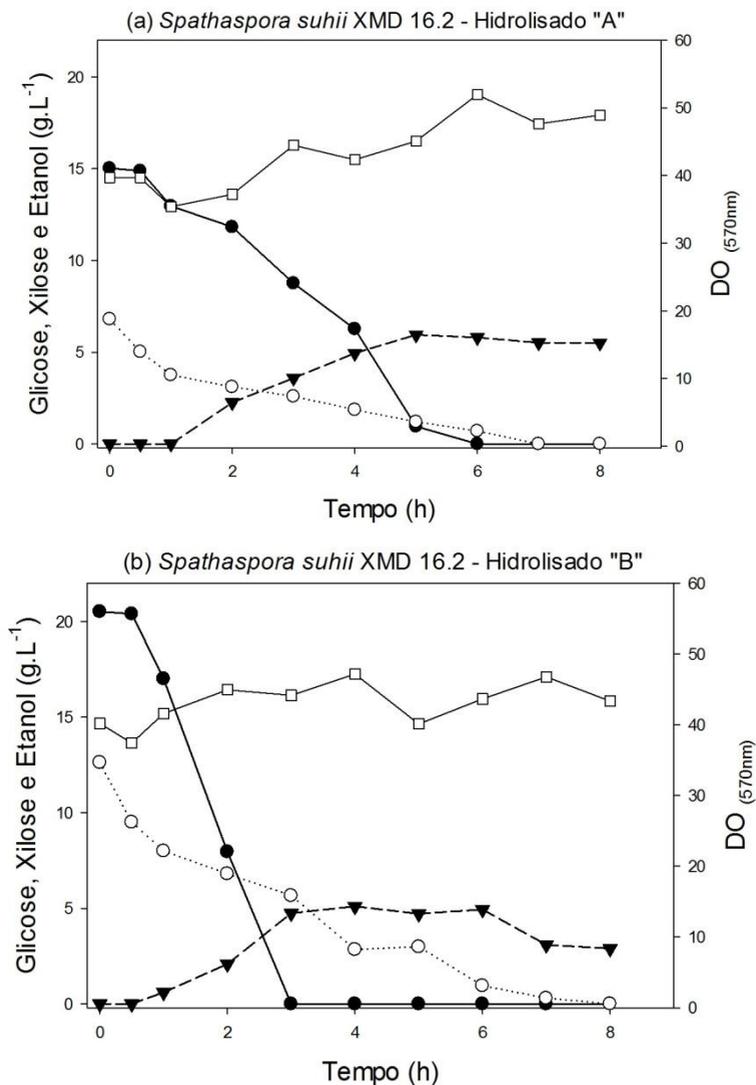


Figura 15 - Fermentação em batelada com hidrolisados de cana-de-açúcar da levedura *Spathaspora suhii* XMD 16.2 utilizando hidrolisado "A" (a) e hidrolisado "B" (b) como substrato. A imagem mostra o crescimento celular (quadrado aberto), consumo de glicose (círculo fechado), consumo de xilose (círculo aberto) e produção de etanol (triângulo fechado).

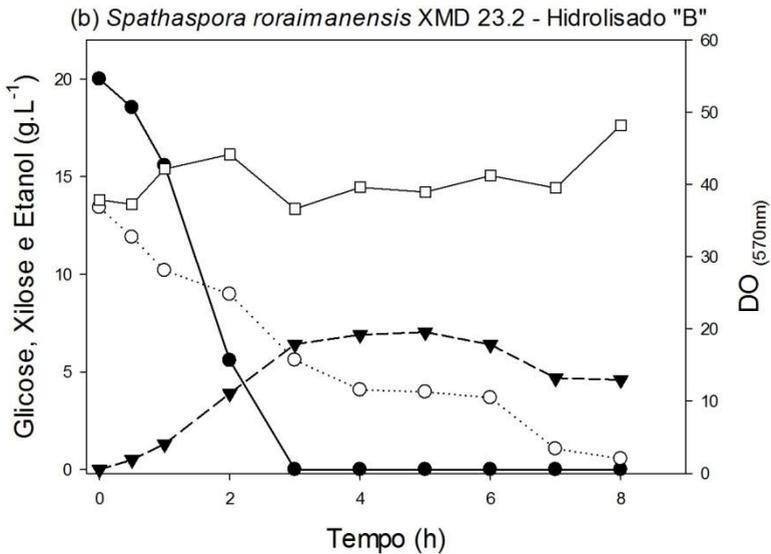
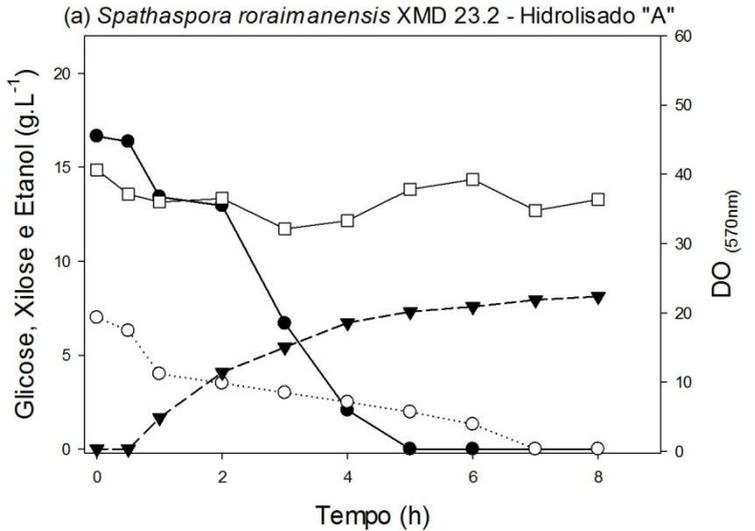


Figura 16 - Fermentação em batelada com hidrolisados de cana-de-açúcar da levedura *Spathaspora roraimanensis* XMD 23.2 utilizando hidrolisado "A" (a) e hidrolisado "B" (b) como substrato. A imagem mostra o crescimento celular (quadrado aberto), consumo de glicose (círculo fechado), consumo de xilose (círculo aberto) e produção de etanol (triângulo fechado).

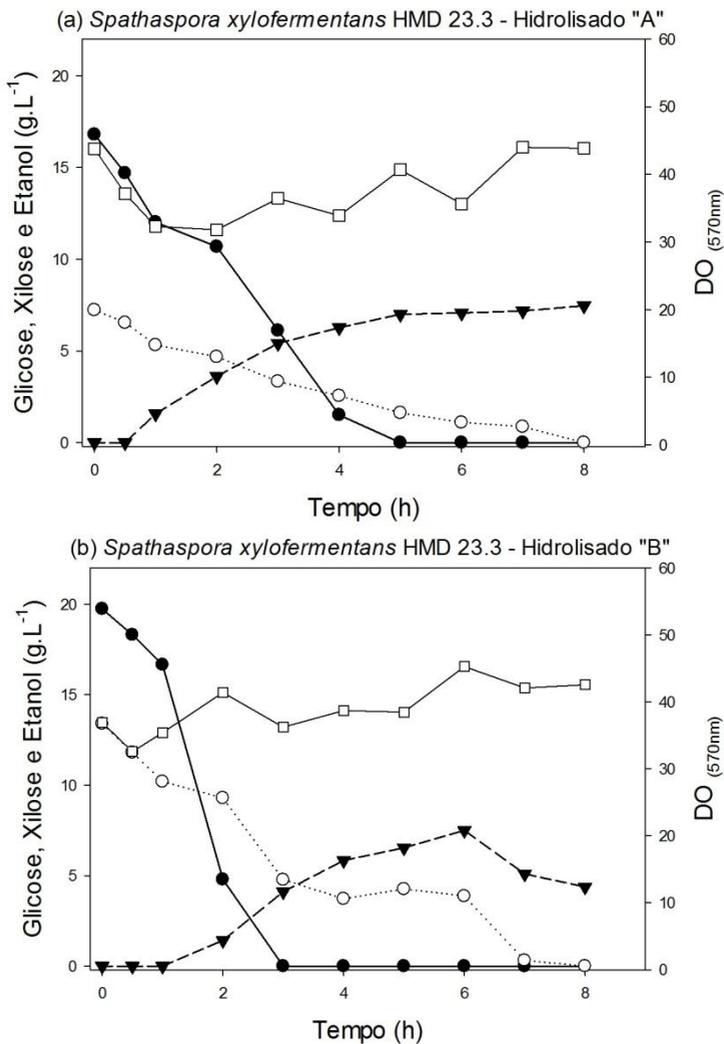


Figura 17 - Fermentação em batelada com hidrolisados de cana-de-açúcar da levedura *Spathaspora xylofermentans* HMD 23.3 utilizando hidrolisado "A" (a) e hidrolisado "B" (b) como substrato. A imagem mostra o crescimento celular (quadrado aberto), consumo de glicose (círculo fechado), consumo de xilose (círculo aberto) e produção de etanol (triângulo fechado).

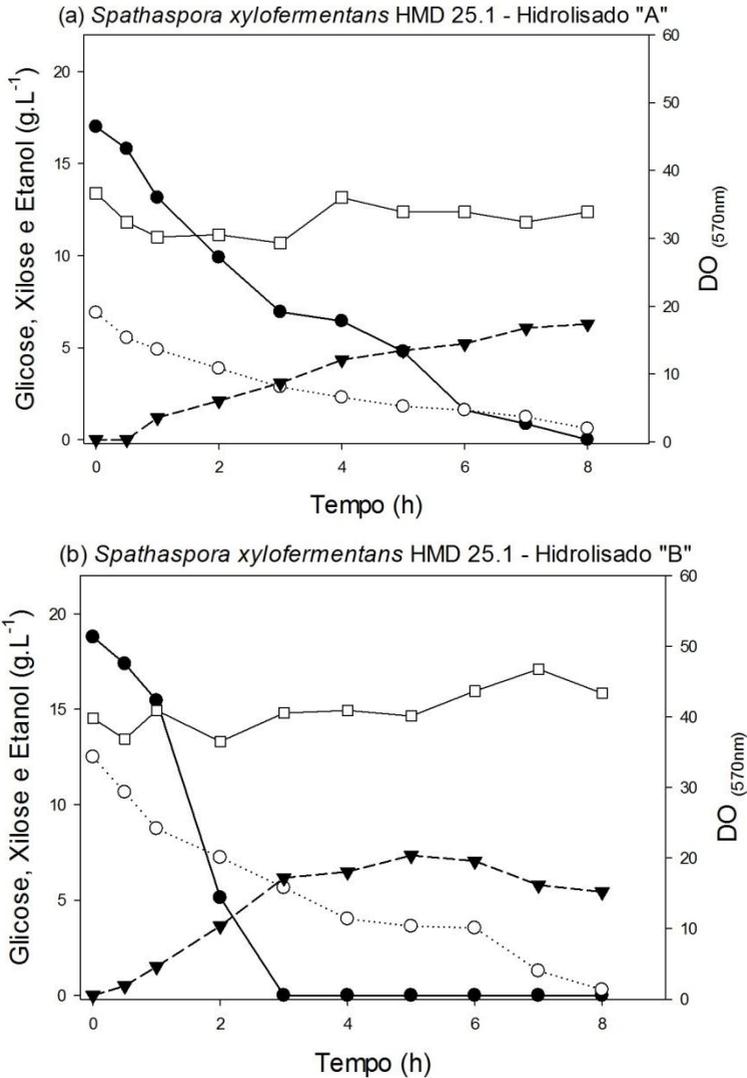


Figura 18 - Fermentação em batelada com hidrolisados de cana-de-açúcar da levedura *Spathaspora xylofermentans* HMD 25.1 utilizando hidrolisado "A" (a) e hidrolisado "B" (b) como substrato. A imagem mostra o crescimento celular (quadrado aberto), consumo de glicose (círculo fechado), consumo de xilose (círculo aberto) e produção de etanol (triângulo fechado).

Considerando que as leveduras *Spathaspora* constituem um grupo de microrganismos com interessantes propriedades biotecnológicas (Wohlbach *et al.*, 2011), capazes de fermentar a xilose e outros açúcares presentes nos hidrolisados lignocelulósicos (vide acima), recentemente o nosso grupo de pesquisa, em colaboração com pesquisadores do Laboratório de Bioinformática Aplicada, Embrapa Informática Agropecuária (Campinas, SP), e do Departamento de Matemática Aplicada, Laboratório Nacional de Computação Científica (Petrópolis, RJ), realizou o sequenciamento do genoma da levedura *Spathaspora arborariae*, uma espécie de levedura que fermenta a xilose eficientemente (vide Tabela 2; Cadete *et al.*, 2009).

Utilizando a técnica de pirosequenciamento (Margulies *et al.*, 2005) da plataforma 454 (Roche), foram obtidas 915.700 leituras totalizando 291.670.584 nucleotídeos a partir do DNA genômico da linhagem *S. arborariae* HMD19.1a. A seguir, essas sequências foram montadas em 439 “contigs”, que posteriormente foram agrupadas em 41 “scaffolds” totalizando um genoma final de 12.708.019 pares de bases, correspondentes aos 8 cromossomas dessa levedura. Utilizando o programa GeneMark-hmm (Borodovsky & Lomsadze, 2011), foi possível anotar a presença de 6.595 genes preditos com tamanho maior do que 100 nucleotídeos no genoma de *S. arborariae*, dos quais 5.569 (84,4%) apresentaram sequências homólogas a outros genes já depositados no NCBI (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) utilizando-se o programa BLAST+ (Camacho *et al.*, 2009).

A partir dos dados do sequenciamento do genoma foram identificadas quatro sequências correspondentes a genes que codificam possíveis enzimas e proteínas envolvidas na metabolização de xilose: uma xilose redutase (Xyl-XR, **Error! Reference source not found.**), uma xilulocinase (Xyl-XK, **Error! Reference source not found.**), e dois genes de transportadores (possíveis co-transportadores xilose-H<sup>+</sup>), o Transportador 1 (Xyl-Transp1, **Error! Reference source not found.**) e o Transportador 4 (Xyl-Transp4, **Error! Reference source not found.**). Como pode ser observado na Figura 19, estes dois genes apresentam homologia a outros transportadores de açúcares presentes em leveduras e fungos. Uma análise semelhante com as sequências da Xyl-XR e Xyl-XK revelou homologia destes genes com xilose redutases e xilocinases de leveduras e fungos, respectivamente (dados não mostrados). No intuito de contribuir para a caracterização destes genes, foi verificado a seguir, através de qRT-PCR, se a expressão dos mesmos era induzida por xilose, como

seria esperado para genes envolvidos na metabolização desta fonte de carbono.

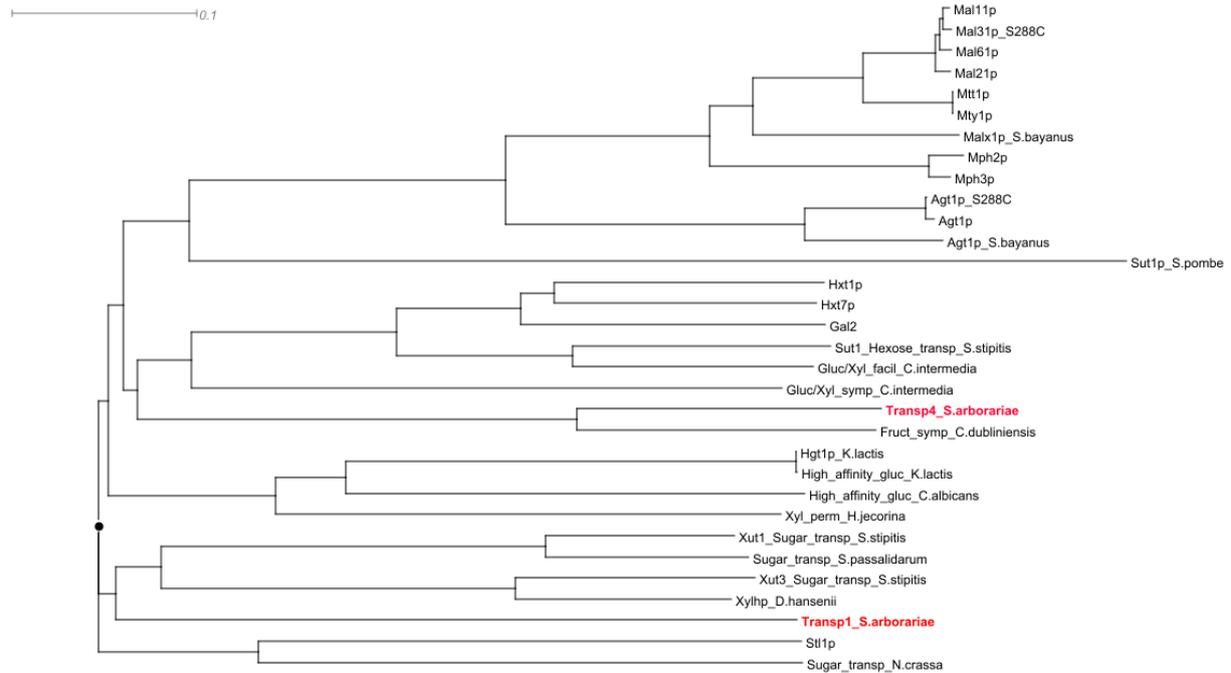


Figura 19 - Filograma mostrando a relação dos dois transportadores (Transp1 e Transp4) presentes no genoma de *S. arborariae* (em vermelho) com outros transportadores de leveduras e fungos. Os transportadores sem indicação de espécie são aqueles já caracterizados em *S. cerevisiae*. Figura construída com o programa Dendroscope 2.3 (Huson et al. 2007).

Inicialmente foi necessário verificar se os oligonucleotídeos escolhidos para analisar a expressão dos genes (Tabela 1, e **Error! Reference source not found.**-4) permitem amplificar fragmentos de DNA com os tamanhos esperados, o que mostraria também que a montagem da sequência do genoma está correta. Utilizando o par de iniciadores RT-XR2-F3 e RT-XR2-R3 (para Xyl-XR), RT-XK-F1 e RT-XK-R1 (para Xyl-XK), e ACT1-F e ACT1-R (para o gene da actina, usado como gene calibrador no qRT-PCR), permitiu amplificar fragmentos de DNA de 100 a 135 pares de bases, confirmando a funcionalidade dos oligonucleotídeos com a sequência do genoma da levedura *S. arborariae*.

A seguir células da levedura *S. arborariae* HMD19.1a foram cultivadas em meios ricos YP contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose ou xilose como fonte de carbono. Ao atingir o meio da fase exponencial de crescimento, as células foram coletadas por centrifugação e utilizadas para extração do RNA mensageiro, síntese do cDNA e análise da expressão por qRT-PCR como descrito em Materiais e Métodos (seção 4.5). Os resultados mostrados na Figura 20 indicam que a expressão relativa dos genes analisados foram maiores nas células cultivadas em xilose, quando comparada à expressão nas células cultivadas em glicose, sugerindo que a expressão destes genes é induzida por xilose. A expressão relativa do gene que codifica a enzima xilose redutase (Xyl-XR) apresentou uma expressão 7 vezes maior, e os dos genes do transportador 1 (Xyl-Transp1) e transportador 4 (Xyl-Transp4) de 7 a 8 vezes maior nas células crescidas em xilose, em comparação a expressão dos mesmos genes nas células crescidas em glicose. A maior expressão relativa (28 vezes maior) foi a do gene que codifica a enzima xilulocinase (Xyl-XK).

Estes resultados sugerem que futuros experimentos, incluindo a clonagem e expressão destes genes na levedura industrial *S. cerevisiae*, possa contribuir para uma maior eficiência na fermentação de pentoses para a produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica.

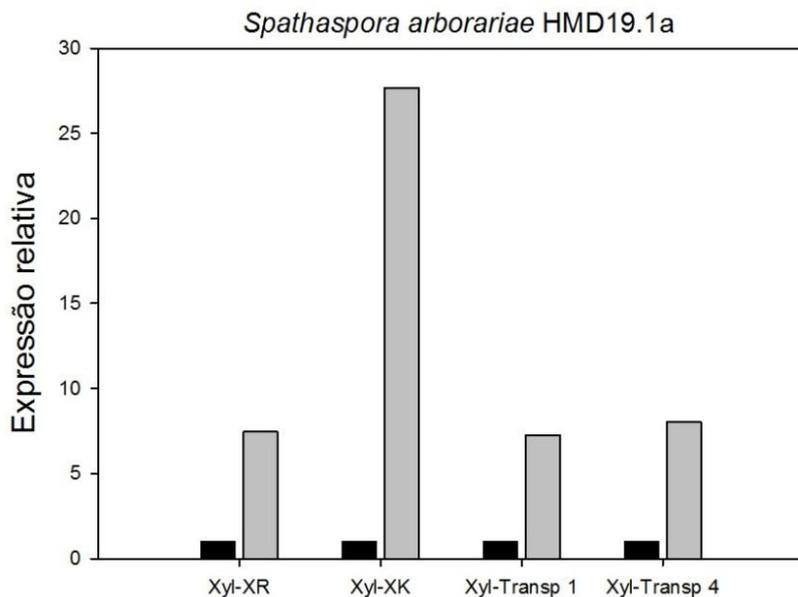


Figura 20 - Expressão relativa dos genes das enzimas xilose redutase (Xyl-XR), xilulocinase (Xyl-XK) e dos genes do transportador 1 (Xyl-Transp1) e transportador 4 (Xyl-Transp4) em células da levedura *S. arborariae* HMD19.1a crescidas em glicose (barras pretas) ou xilose (barras cinza) como fonte de carbono.



## 6 CONCLUSÕES

- O método de análise em microescala possibilitou analisar o crescimento e fermentação simultâneo de até 12 leveduras em 7 diferentes fontes de carbono por ensaio e, apesar da necessidade de melhoramento das condições do ensaio, ele se revelou um método rápido para identificação de leveduras fermentadoras do açúcar de interesse.
- As espécies isoladas da região de Chapecó/SC classificadas como “Palmital” não apresentaram aumento de biomassa, tampouco produção de etanol. Posteriormente elas foram identificadas como *Cryptococcus flavescens*, espécie não fermentadora.
- As demais leveduras coletadas na mesma região classificadas como “NSG” apresentaram um mesmo padrão de crescimento com produção de etanol em glicose, xilose, maltose e galactose. Essas leveduras foram identificadas como pertencentes à espécie *Candida shehatae*, espécie já conhecida como fermentadora de xilose.
- Durante o ensaio em microescala cinco leveduras apresentaram um padrão em comum de crescimento e produção de etanol, com pequenas produções de etanol a partir de xilose. Essas leveduras foram descritas como novas espécies fermentadoras de xilose, sendo classificadas como *Spathaspora brasiliensis* (linhagem HMD19.3), *S. suhii* (linhagem XMD16.2), *S. roraimanensis* (linhagem XMD23.2) e *S. xylofermentans* (linhagens HMD23.3 e HMD25.1).
- Em ensaios de crescimento em glicose ou xilose, as cinco novas espécies *Spathaspora* fermentaram a xilose com maior eficiência do que a glicose.

- Em fermentações em batelada com misturas de glicose e xilose (co-fermentação) ou ainda, em fermentações em batelada de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar, as leveduras apresentaram diferentes graus de rendimentos de etanol.
- As espécies já conhecidas *S. arborariae* e *S. passalidarum* e as novas espécies *S. roraimanensis* e *S. xylofermentans* apresentaram os melhores rendimentos na produção de etanol durante as fermentações com xilose.
- Entre as novas espécies *Spathaspora*, nos ensaios de co-fermentação glicose/xilose e em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, a levedura *S. brasiliensis* HMD19.3 e *S. suhii* XMD16.2 apresentaram os menores rendimentos na produção de etanol.
- Em relação às expressões relativas dos genes presentes no genoma de *S. arborariae* possivelmente envolvidos no metabolismo de xilose, os resultados apresentaram maior expressão de genes que codificam para as enzimas xilose redutase, xilulocinase e genes de dois transportadores de açúcar nas células cultivadas em xilose.
- Os resultados sobre a expressão relativa dos genes presentes do genoma de *Spathaspora arborariae* confirmaram que a expressão dos genes que codificam para xilose redutase, xilulocinase e de dois transportadores de açúcar é induzida por xilose. Esses resultados sugerem que esses genes possam ser alvos interessantes para futuros experimentos, através de engenharia genômica, para otimizar a produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica.

**BIBLIOGRAFIA**

Anderson, W. F., & Akin, D. E. (2008). Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35, 355-366.

ANFAVEA. (2012). *ANFAVEA*. Acesso em 27 de Outubro de 2012, disponível em Anuário da Indústria Automobilística Brasileira 2012: <http://www.anfavea.com.br/anuario2012/anuarioanfavea2012.zip>

Aristidou, A., & Penttilä, M. (2000). Metabolic engineering applications to renewable resource. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 187-198.

Barbosa, A. C., Cadete, R. M., Gomes, F. C., Lachance, M.-A., & Rosa, C. A. (2009). *Candida materiae* sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood in the Atlantic Rain Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2104-2106.

Barnett, J. A. (2003). A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. *Yeast*, 20, 509-543.

Barnett, J. A., & Entian, K.-D. (2005). A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast*, 22, 835-894.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2008). *Bioquímica* (6ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.

Bezerra, R. M., & Dias, A. A. (2005). Enzymatic Kinetic of Cellulose Hydrolysis: Inhibition by Ethanol and Cellobiose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 126, 49-59.

Boonmak, C., Limtong, S., Sindamorakot, S., Am-In, S., Yongmanitchai, W., Suzuki, K., Kawasaki, H. (2011). *Candida xylanilytica* sp. nov., a xylan-degrading yeast species isolated from Thailand. ***International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology***, 61, 1230-1234.

Borodovsky, M., & Lomsadze, A. (2011). Eukaryotic gene prediction using GeneMark.hmm-E and GeneMark-ES.

Bruinenberg, P. M., de Bot, P. H., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. (1983a). The Role of Redox Balances in the Anaerobic Fermentation of Xylose by Yeasts. ***European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology***, 18(287-292).

Bruinenberg, P. M., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. (1983b). A Theoretical Analysis of NADPH Production and Consumption in Yeasts. ***Journal of General Microbiology***, 129, 953-964.

Cadete, R. M., Melo, M. A., Dussán, K. J., Rodrigues, R. C., Silva, S. S., Zilli, J. E., Rosa, C. A. (2012). Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeast Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. ***Plos One***, 7, 1-11.

Cadete, R. M., Melo, M. A., Zilli, J. E., Vital, M. J., Mouro, A., Prompt, A. H., Rosa, C. A. (2013). *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel D -xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. ***Antonie van Leeuwenhoek***, 103, 421-431.

Cadete, R. M., Santos, R. O., Melo, M. A., Mouro, A., Golçalves, D. L., Stambuk, B. U., Rosa, C. A. (2009). *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, 9, 1338-1342.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. (2009). BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, 10, 421.

Canilha, L., Milagres, A. M., Silva, S. S., Almeida e Silva, J. B., Felipe, M. G., Rocha, G. J., Carvalho, W. (2010). Sacarificação da Biomassa lignocelulósica através da pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. **Revista Analytica**, 44, 48-53.

Claasen, P., van Lier, J., Lopes Contreras, A., van Niel, E., Sijtsma, L., Stams, A., Weusthuis, E. (1999). Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. **Applied Microbiology Biotechnology**, 52, 741-755.

CONAB. (2012). **Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB)**. Acesso em 27 de Outubro de 2012, disponível em Acompanhamento da Safra Brasileira, Cana-de-Açúcar. Safra 2011/2012. Terceiro Levantamento. Dezembro de 2011.: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_12\\_08\\_11\\_00\\_54\\_08.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf)

da Cunha-Pereira, F., Hickert, L. R., Sehnem, N. T., de Souza-Cruz, P. B., Rosa, C. A., & Ayub, M. Z. (2011). Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, 102, 4218-4225.

Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009). Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 5, 578-595.

Deng, X. X., & Ho, N. W. (1990). Xylulokinase Activity in Various Yeasts Including *Saccharomyces cerevisiae* Containing the Cloned Xylulokinase Gene. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24/25, 193-199.

du Preez, J. C., & van der Walt, J. C. (1983). Fermentation of D-xylose to Ethanol by a strain of *Candida shehatae*. *Biotechnology Letters*, 5, 357-362.

EIA. (2012). *Annual Energy Review 2011*. Acesso em 27 de Outubro de 2012, disponível em U.S. Energy Information Administration (EIA): <http://www.eia.gov/totalenergy/data/annual/pdf/aer.pdf>

Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3381-3386.

Filho, A. V. (2012). *Conselho Nacional de Política Energética - CNPE*. Acesso em Agosto de 2012, disponível em MME - Ministério de Minas e Energia: [www.mme.gov.br](http://www.mme.gov.br)

Fonseca, C., Romão, R., de Sousa, H. R., Hahn-Hägerdal, B., & Spencer-Martins, I. (2007). L-Arabinose transport and catabolism in yeast. *FEBS Journal*, 274, 3589–3600.

Gárdonyi, M., Österberg, M., Rodrigues, C., Spencer-Martins, I., & Hahn-Hägerdal, B. (2003). High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. *FEMS Yeast Research*, 3, 45-52.

Gibbs, M., Cochrane, V. W., Paege, L., & Wolin, H. (1953). Fermentation of D-Xylose-1-C44 by *Fusarium lini* Bolle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 237-242.

Goldemberg, J. (2006). The ethanol program in Brazil. *Environmental Research Letters*, 1, 1-5.

Goldemberg, J. (2008). The Brazilian biofuels industry. *Biotechnology for Biofuels*, 1(6), 1-7.

Gonçalves, A. R., Benar, P., Costa, S. M., Ruzene, D. S., Moryta, R. Y., Luz, S. M., & Ferretti, L. P. (2005). Integrated Processes for Use of Pulps and Lignins Obtained from Sugarcane Bagasse and Straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124, 821-826.

Gonçalves, D. L. (2010). *Produção de álcool combustível a partir de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar por leveduras industriais e leveduras fermentadoras de xilose*. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Gray, K. A., Zhao, L., & Emptage, M. (2006). Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 141-146.

Hähn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K., & Prior, B. A. (1994). Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 933-943.

Hähn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 937-953.

Higuchi, T. (1990). Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood ScienceTechnology*, 24, 23-63.

Himmel, M. E., Ding, S.-Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science*, 315, 804-807.

Hou, X. (2012a). Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 94, 205-214.

Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E. L., & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2, 602-619.

Huson, D., Richter, D., Rausch, C., DeZulian, T., Franz, M., & Rupp, R. (2007). Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics*, 8, 460.

Jeffries, T. W. (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 320-326.

Jeffries, T. W., & Shi, N.-Q. (1999). Genetic Engineering for Improved Xylose Fermentation by Yeasts. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 65, 118-161.

Jeffries, T. W., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., Laplaza, J. M., Aerts, A., Salamov, A., Richardson, P. M. (2007). Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*, 25, 319-326.

Jin, Y.-S., & Jeffries, T. W. (2004). Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 6, 229-238.

Jorgensen, H., Kristensen, J. B., & Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1, 119-134.

Kötter, P., & Ciriacy, M. (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 776-783.

Kruger, N. J., & von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 236-246.

Lagunas, R. (1979). Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 23, 139-146.

Lagunas, R. (1986). Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2, 221-228.

Landry, C. R., Townsend, J. P., Hartl, D. L., & Cavalieri, D. (2006). Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Ecology*, 15, 575-591.

Le Digabel, F., & Avérous, L. (2006). Effects of lignin content on the properties of lignocellulose-based biocomposites. *Carbohydrate Polymers*, 66, 537-545.

Lee, H. (1998). The Structure and Function of Yeast Xylose (Aldose) Reductases. *Yeast*, 14, 977-984.

Lima, U. d., Aquarone, E., Borzani, W., & Schmidell, W. (2001). *Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e Enzimáticos* (Vol. 3). São Paulo: Edgar Blücher.

Lodder, J., & van Rij, K. N. (1952). *The Yeasts: a Taxonomic Study*.

Long, T. M., Su, Y.-K., Headman, J., Higbee, A., Willis, L. B., & Jeffries, T. W. (2012). Cofermentation of Glucose, Xylose, and Cellobiose by the Beetle-Associated Yeast *Spathaspora passalidarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5492-5500.

Madhavan, A., Tamalampudi, S., Ushida, K., Kanai, D., Katahira, S., Srivastava, A., Kondo, A. (2009). Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 1067-1078.

Marešová, L., & Sychrová, H. (2007). Applications of a microplate reader in yeast physiology research. *BioTechniques*, 43, 667-672.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W., Attiya, S., Bader, J., Bemben, L., Chen, Z. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376-380.

Matsushika, A., Inoue, H., Kodaki, T., & Sawayama, S. (2009). Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 37-53.

Merico, A., Sulo, P., Piskur, J., & Compagno, C. (2007). Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *The FEBS journal*, *274*, 976-989.

Mouro, A. (2012). *Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira*. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Naik, S., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010b). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*, 578-597.

Nakamura, N., Yamada, R., Katahira, S., Tanaka, T., Fukuda, H., & Kondo, A. (2008). Effective xylose/cellobiose co-fermentation and ethanol production by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of B-glucosidase on its cell surface. *Enzyme and Microbial Technology*, *43*, 233-236.

Nguyen, N. H., Suh, S.-O., Marshall, C. J., & Blackwell, M. (2006). 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*, *110*, 1232-1241.

Panchal, C. J., Bast, L., Russell, I., & Stewart, G. G. (1998). Repression of xylose utilization by glucose in xylose-fermenting yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*, *34*, 1316-1320.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., & Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, *5*, 53-63.

Pessoa-Jr, A., Conceição, I. R., Menossi, M., dos santos, P. R., Ortega Filho, S., & Penna, T. V. (2005). Perspectives on Bioenergy and Biotechnology in Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124, 59-70.

Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26, 863-871.

RFA. (2012). *World Fuel Ethanol Production*. Acesso em 27 de Outubro de 2012, disponível em Renewable Fuels Association (RFA): [ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production](http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production)

Richard, P., Toivari, M. H., & Penttilä, M. (2000). The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism. *FEMS Microbiology Letters*, 190, 39-43.

Rivers, D. B., & Emert, G. H. (1987). Lignocellulose pretreatment: a comparison of wet and dry ball attrition. *Biotechnology Letters*, 9, 365-368.

Rodionov, Y. V., Keppen, O. I., & Sukhacheva, M. V. (2002). A Photometric Assay for Ethanol. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38, 395-396.

Rozpedowska, E., Galafassi, S., Johansson, L., Hagman, A., Piskur, J., & Compagno, C. (2011). *Candida albicans* - a pre-whole genome duplication yeast - is predominantly aerobic and a poor ethanol producer. *FEMS Yeast Research*, 11, 285-291.

Ryabova, O. B., Chmil, O. M., & Sibirny, A. A. (2003). Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research*, 4, 157-164.

- Sagar, A. D., & Kartha, S. (2007). Bioenergy and Sustainable Development? *Annual Review of Environment and Resources*, 32, 131-167.
- Salgado, A. M., Folly, R., Valdman, B., Cos, O., & Valero, F. (2000). Colorimetric method for the determination of ethanol by Flow Injection Analysis. *Biotechnology Letters*, 22, 327-330.
- Sánchez, S., Bravo, V., Castro, E., Moya, A. J., & Camacho, F. (2002). The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77, 641-648.
- Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S., & Aikat, K. (July de 2011). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37, 19-23.
- Skoog, K., & Hähn-Hägerdal, B. (1990). Effect of Oxygenation on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3389-3394.
- Solomon, B. D. (2010). Biofuels and sustainability. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1185, 119-134.
- Stambuk, B. U., Eleutherio, E. C., Florez-Prado, M. L., Souto-Maior, A., & Bon, E. P. (2008). Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67, 918-926.
- Stambuk, B. U., Franden, M. A., Singh, A., & Zhang, M. (2003). D-Xylose Transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105-108, 255-263.

Suh, S.-O., & Blackwell, M. (2004). Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. *FEMS Yeast Research*, 5, 87-95.

Suihko, M. L., & Enari, T. M. (1981). The production of ethanol from d-glucose and d-xylose by different *Fusarium* strains. *Biotechnology Letters*, 3, 723-728.

Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1-11.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.

Tavares, J. M., Duarte, L. C., Amaral-Collaco, M. T., & Gírio, F. M. (2000). The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 743-747.

Toivari, M. H., Aristidou, A., Ruohonen, L., & Penttilä, M. (2001). Conversion of Xylose to Ethanol by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of Xylulokinase (XKS1) and Oxygen Availability. *Metabolic Engineering*, 3, 236-249.

Toivari, M. H., Salusjärvi, L., Ruohonen, L., & Penttilä, M. (2004). Endogenous Xylose Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3681-3686.

Winkler, A. A., van Maris, A. J., Kuyper, M., de Laat, W. T., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (April de 2007). Development of Efficient Xylose

Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: Xylose Isomerase as a Key Component. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 108, 179-204.

Wohlbach, D. J., Kuo, A., Sato, T. K., Potts, K. M., Salamov, A. A., LaButti, K. M., . . . Gasch, A. P. (2011). Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 13212–13217.

Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzapple, M., Ladisch, M. R., & Lee, Y. Y. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96, 1959-1966.

Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86, 1781-1788.

Yu, S., Jeppsson, H., & Hahn-Hägerdal, B. (1995). Xylulose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 314-320.

Zaldivar, J., Nielsen, J., & Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 17-34.

Zamora, F. (2009). Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In: V. Moreno-Arribas, & C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* (Vol. Capítulo 1, pp. 3-26).

Zanin, G. M., Santana, C. C., Bon, E. P., Giordano, R. C., DE Moraes, F. F., Andrietta, S. R., Fontana, J. D. (2000). Brazilian Bioethanol Program. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 1147-1161.

