

ANGELA ALVES DOS SANTOS

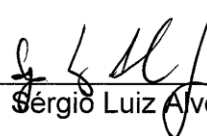
**METABOLIZAÇÃO DA CELOBIOSE POR LEVEDURAS
ISOLADAS A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM
DECOMPOSIÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção de grau de
Bacharel em Engenharia Ambiental da Universidade Federal da
Fronteira sul.

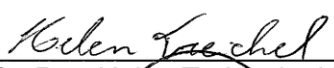
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Jr.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e
aprovado pela banca em: 04 / 12 / 2014

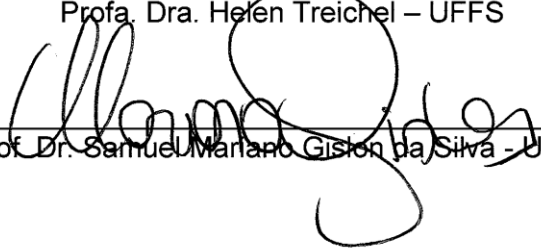
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Jr. – UFFS



Profa. Dra. Helen Treichel – UFFS



Prof. Dr. Samuel Mariano Giston da Silva – UFFS

METABOLIZAÇÃO DA CELOBIOSE POR LEVEDURAS ISOLADAS A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM DECOMPOSIÇÃO

Angela Alves dos Santos¹

Sérgio Luiz Alves Júnior²

Resumo

A metabolização da celobiose é um dos fatores limitantes para o sucesso da produção de etanol de segunda geração. Porém, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que, ainda hoje, é a mais bem adaptada às condições industriais de fermentação alcoólica, é sabidamente incapaz de utilizar esse dissacarídeo. Considerando-se que, nas matas locais, assim como em qualquer bioma similar, a biomassa lignocelulósica é decomposta com o auxílio de leveduras, que, diferentemente de *S. cerevisiae*, conseguem utilizar a celobiose, esse trabalho objetivou o isolamento e a caracterização de leveduras da microbiota local, com vistas à seleção de novas linhagens capazes de metabolizar eficientemente essa fonte de carbono. Foram analisados os perfis de crescimento celular e consumo de açúcar de 15 linhagens de leveduras, isoladas na Unidade de Conservação da Floresta Nacional de Chapecó, no *campus* da Universidade Federal da Fronteira Sul, no Parque da Gruta Nossa Senhora de Guadalupe e no Parque Palmital, todos na cidade de Chapecó. Dentre as cepas analisadas, 14 apresentaram capacidade de metabolizar a celobiose, entretanto com velocidades distintas de consumo desse açúcar. Também foram avaliadas as atividades intracelular e periplasmática da enzima celobiase em 5 linhagens. A atividade intracelular, em geral, mostrou-se superior. Os resultados sugerem também que a glicose inibe a expressão da celobiase. Assim sendo, as linhagens isoladas apresentaram características interessantes à indústria do etanol. Novos estudos podem agora estabelecer um paralelo entre a performance dessas leveduras em condições industriais e a expressão heteróloga das suas celobiasas em *S. cerevisiae*, visando encontrar a aplicação mais eficiente.

Palavras chave: Fermentação. Celobiose. Leveduras. Etanol 2G. Microbiota brasileira.

Introdução

O etanol combustível tem recebido notável atenção no Brasil desde a década de 1970. No início dos anos 70, muitos países enfrentaram uma crise econômica impulsionada pelos altos preços nos barris de petróleo; crise, esta, que atingiu principalmente os países dependentes das importações de petróleo, dentre eles, o Brasil. Contudo, com um extenso cultivo de cana-de-açúcar para a produção de sacarose, o nosso país foi privilegiado ao explorar a produção de etanol como uma alternativa à gasolina. Para isso, na época, o governo brasileiro criou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), com o objetivo de produzir grandes quantidades de etanol a partir da cana-de-açúcar e substituir a gasolina, utilizada como combustível em veículos leves, pelo etanol (GOLDEMBERG, 2006, 2008). Com esse estímulo do governo, a produção de etanol chegou ao ápice em 1986, quando menos de um terço do total de carros fabricados no país ainda utilizava gasolina como combustível. Nos anos seguintes, a produção de etanol sofreu forte declínio, principalmente devido aos

¹ Acadêmica do curso de Engenharia Ambiental, da Universidade Federal da Fronteira Sul

² Professor Adjunto II, da Universidade Federal da Fronteira Sul

problemas apresentados pelos automóveis movidos a álcool e à estabilização do preço do petróleo (ZANIN et al., 2000). Entretanto, em 2003, a produção de etanol foi novamente estimulada com a crescente preocupação ambiental causada pelo uso de combustíveis fósseis e o início da comercialização dos carros flex, os quais, de forma alternada ou conjunta, podem utilizar etanol e/ou gasolina em seus motores (GOLDEMBERG, 2008).

O surgimento dos motores bicombustíveis (flex) fez com que a produção de etanol combustível ganhasse novamente força no Brasil. Segundo dados da “*Carta da Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores*”, disponibilizada pela Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores – ANFAVEA (2013), no ano de 2013, a parcela comercializada no Brasil de veículos flex ficou em 88,5% do total de automóveis. Desse modo, o Brasil ganhou destaque mundial na substituição da gasolina, combustível derivado do petróleo, pelo etanol, combustível renovável e menos poluente. De acordo com dados recentes do “*Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar*”, disponibilizado pela Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2014), a produção brasileira de etanol na safra 2013 foi de 23,64 bilhões de litros, e é estimada em 27,17 bilhões de litros para 2014, aumento que representa um volume adicional de 3,53 bilhões de litros.

A produção atual de etanol combustível no país tem como matéria-prima o caldo da cana-de-açúcar, um material fermentável e que possui como principal componente o dissacarídeo sacarose. A estrutura da sacarose permite que esta fonte de carbono seja utilizada prontamente pelo microrganismo do processo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sem a necessidade, portanto, de hidrólise prévia do material (PEREIRA Jr.; COUTO; SANTA ANNA, 2008). Dessa forma, o etanol produzido hoje no Brasil (chamado de etanol de primeira geração) é resultado da fermentação direta da sacarose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Como consequência da grande produção brasileira de etanol de primeira geração, tem-se a crescente produção de resíduos do setor. Aproximadamente 201 milhões de toneladas de resíduos de cana-de-açúcar foram produzidos no país no ano de 2009, segundo dados do Plano Nacional de Resíduos Sólidos – (2011). Grande parte desses resíduos de cana produzidos anualmente, cerca de 85%, é queimada para produção de energia na própria usina (STAMBUK et al., 2008). Entretanto, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar são constituídos de carboidratos fermentáveis que também podem ser utilizados para a produção de etanol, neste caso, chamado de etanol de segunda geração ou etanol 2G (PESSOA Jr. et al., 2005). O Brasil pode ser muito favorecido no desenvolvimento dessa tecnologia, uma vez que a produção pode ser anexada às unidades produtoras de etanol de primeira geração, que são as próprias geradoras do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, proporcionando, dessa forma, menos investimento em infraestrutura, energia e logística. Além disso, o etanol de segunda geração pode aumentar a produção do combustível sem aumentar a área de cana-de-açúcar plantada – vantagem econômica e também ambiental (SOCCOL et al., 2010).

Através da utilização da biomassa proveniente da cana-de-açúcar pode-se alcançar uma produção bastante alta de etanol de segunda geração. Se considerarmos uma eficiência na fermentação dos carboidratos presentes nessa biomassa de 90%, o bagaço e a palha podem aumentar em mais de 50% a produção de etanol por tonelada de cana-de-açúcar plantada (ZANIN et al., 2000; STAMBUK et al., 2008). Além disso, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar são renováveis, abundantes, não demandam de terra separada para produção, não necessitam de maior utilização de água e não competem com a indústria de alimentos (SARKAR et al., 2012). No entanto, mesmo com grandes vantagens provenientes da utilização dos resíduos da cana-de-açúcar para a produção de etanol, a viabilidade industrial desse processo é afetada por custos com operação e condições de processamento (MACRELLI; GALBE; WALLBERG, 2014). Algumas empresas brasileiras de combustível,

como a Petrobrás, a Raízen e a GranBio, têm trabalhado na busca pela viabilidade, e divulgam que estão bastante próximas da produção industrial do etanol de segunda geração. Em contrapartida, para o alcance de uma eficiência cada vez maior na produção, faz-se necessária a ampliação do número de pesquisas que contribuam para a otimização desse processo, de forma a torná-lo mais viável do que a queima da biomassa para a geração de calor ou energia elétrica.

O etanol de segunda geração é dependente, portanto, da fermentação dos carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica. Essa matéria-prima é formada por polissacarídeos de celulose e hemicelulose, que estão associados a uma estrutura macromolecular, a lignina (PEREIRA Jr.; COUTO; SANTA ANNA, 2008). A lignina é um polímero de natureza hidrofóbica e muito complexo, que, através de suas fortes ligações químicas com a celulose e a hemicelulose, desempenha um papel de proteção na estrutura da biomassa contra o ataque de microrganismos. A hemicelulose e a celulose são polissacarídeos: o primeiro, um polímero heterogêneo e muito ramificado, é formado por pentoses (xilose e arabinose) e por hexoses (manose, glicose e galactose), e o segundo, a celulose, o principal constituinte da parede celular vegetal, é um polímero linear formado por monômeros de glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4, que formam cadeias poliméricas longas que podem chegar a 12.000 unidades de glicose (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005; SARKAR et al., 2012). Na celulose, a quebra das suas cadeias longas resulta em cadeias curtas, conhecidas como celodextrinas, que são denominadas de acordo com o número de glicoses que as compõe: celobiose (duas glicoses), celotriose (três glicoses), celotetrose (quatro glicoses), celopentose (cinco glicoses) (ZHANG; DONALDSON; MA, 2012). Cada repetição das unidades de glicose, na composição da celulose, é estruturada por rotação de 180° para com as moléculas vizinhas, sendo a sua estrutura básica repetitiva a celobiose (ZHANG; LYND, 2004).

Para que esses carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica estejam acessíveis à fermentação, são necessários dois processos, que juntos compreendem a chamada sacarificação. O primeiro consiste na desestruturação da lignocelulose e o segundo compreende a hidrólise da celulose e da hemicelulose. Estas etapas podem ser realizadas separadamente da fermentação ou através da sacarificação e fermentação simultânea (*SSF-Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Uma das características da SSF é que os açúcares liberados pela hidrólise são simultaneamente consumidos, integrando os processos em um único reator, diminuindo a probabilidade de contaminação por outros microrganismos e, também, os custos do processo (GALBE; ZACCHI, 2002; OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008; KOPPRAM; OLSSON, 2014). No entanto, a SSF apresenta também uma desvantagem: alguns subprodutos gerados com a degradação da lignina podem ser inibidores para a fermentação subsequente, dificultando a utilização, pelas leveduras, dos açúcares provenientes do processo de hidrólise (LI; WENG; CHAPPLE, 2008).

As reações químicas que envolvem a hidrólise da celulose e da hemicelulose podem ser realizadas com métodos químicos ou através de enzimas como catalisadores. Os métodos químicos normalmente envolvem a utilização de ácidos, o que tem demonstrado corrosão dos equipamentos do processo e a formação de produtos tóxicos que podem inibir a fermentação posterior (STAMBUK et al., 2008). Devido a isso, o método enzimático possui um potencial de rendimento maior, apresentando a vantagem da especificidade enzimática e a reduzida formação de produtos tóxicos (GALBE; ZACCHI, 2002). Na hidrólise enzimática da celulose, existe a ação sinérgica de três enzimas principais de um grupo maior denominado celulase: as exoglucanases, que agem nas extremidades do polissacarídeo celulose, liberando glicose ou celobiose como produtos principais; as endoglucanases, que agem internamente na celulose, liberando oligossacarídeos de vários comprimentos; e as β -glicosídeos (conhecidas como celobiasas), que agem nas celodextrinas e celobiose, liberando glicose (LYND et al.,

2002). Após a hidrólise da celulose, as leveduras podem então fermentar a glicose gerada, convertendo-a ao produto esperado: etanol.

As enzimas celulases (endoglucanases, exoglucanases e celobiases) atualmente utilizadas na degradação da celulose são produzidas principalmente por fungos filamentosos (CHI et al., 2009). Uma das enzimas mais importantes nesse processo é a celobiase (que catalisa a hidrólise de uma molécula de celobiose em duas moléculas de glicose), de modo que a taxa em que a celulose é convertida em glicose depende da atividade dessa enzima. Isso acontece porque a celobiose produzida durante a hidrólise enzimática é inibitória tanto para as enzimas endoglucanases quanto para as exoglucanases, fato que acaba retardando o processo de sacarificação, e, conseqüentemente, a fermentação dos carboidratos finais (DEKKER, 1986; CHI et al., 2009). No entanto, a produção das celobiases pelos fungos filamentosos tem se mostrado insuficiente para a quantidade de celobiose formada na hidrólise da celulose, tal que forma-se um acúmulo desse dissacarídeo no processo, o que, como visto, influencia no ritmo da sacarificação (CHI et al., 2009). Além disso, a atividade da enzima em questão também pode ser inibida pelo produto de sua hidrólise, a glicose, outro fator determinante no sistema da hidrólise celulolítica (SKORY; FREER; BOTHAST, 1996). Dessa forma, a metabolização eficiente da celobiose durante a produção de etanol de segunda geração é um dos fatores limitantes desse processo.

Evidentemente, para uma eficiente produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, são necessárias leveduras capazes de fermentar bem em condições industriais. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, principal microrganismo utilizado na produção de etanol de primeira geração, possui singularidades que a tornaram a mais utilizada nesse tipo de processo, conseguindo sobreviver e se adaptar às condições adversas do meio fermentativo industrial, tais como elevados níveis de etanol, baixo pH e a pressão osmótica devido à elevada concentração de carboidrato – fatores que eliminam outros microrganismos (LANDRY et al., 2006). Além disso, essa levedura se destaca também por estar entre as melhores fermentadoras de glicose, principal componente da biomassa lignocelulósica, e por fermentar mesmo estando na presença de oxigênio, quando está submetida a concentrações altas de glicose (MÉRICO et al., 2006). Devido a todas essas características, *S. cerevisiae* vem sendo escolhida também para a produção de etanol de segunda geração. No entanto, embora essa levedura seja capaz de fermentar eficientemente a glicose, a produção do etanol de segunda geração pode ser limitada pela metabolização da celobiose, uma vez que as células de *S. cerevisiae* são incapazes de hidrolisar esse dissacarídeo (LEE et al., 2013).

Em contrapartida, diferentemente da *Saccharomyces cerevisiae*, existem leveduras que são capazes de hidrolisar a celobiose. A primeira levedura isolada capaz de utilizar celobiose e celodextrinas como fonte de carbono e produzir etanol foi *Candida wickerhamii* (FREER, 1993; MOURO, 2012). Em estudos realizados com essa levedura, as suas enzimas celobiase apresentaram tolerância à inibição pela glicose, o produto de sua hidrólise (SKORY; FREER; BOTHAST, 1996). Outras leveduras do grupo *Candida* (*Candida molischiana* e *Candida guilliermondii*) também demonstraram a metabolização de celodextrinas (FREER, 1993; MOURO, 2012). Mais recentemente, a levedura *Debaryomyces pseudopolymorphus* foi identificada como sendo uma produtora de celobiase e demonstrou resistência a alguns compostos inibidores (BARBOSA et al., 2010). Em outro estudo recente, leveduras da espécie *Cryptococcus laurentii* foram isoladas no bioma Cerrado e na região da Amazônia e produziram níveis de celobiase bastante significativos (SOUZA et al., 2013).

Embora leveduras como essas utilizem a celobiose como fonte de carbono e algumas produzam etanol a partir desse açúcar, as especialidades e a performance da levedura *Saccharomyces cerevisiae* diante de processos industriais tornaram-na o alvo de muitos trabalhos na área de etanol de segunda geração. Vários pesquisadores têm trabalhado com a

modificação genética dessa levedura – através da expressão heteróloga de genes envolvidos na metabolização da celobiose – e têm demonstrado que isso pode ser uma alternativa para a viabilização dessa produção (BENOLIEL et al., 2010; HA et al., 2010; WILDE et al., 2012; TANG et al., 2013; LEE et al., 2013). Entretanto, recentemente, um trabalho demonstrou que a levedura *Dekkera bruxellensis* possui potencial para fermentar hidrolisados lignocelulósicos e produzir etanol em níveis semelhantes ao de *S. cerevisiae*, além de se mostrar também adaptada aos subprodutos inibitórios encontrados nesses hidrolisados (BLOMQVIST et al., 2011). Em outra pesquisa, mais recente, foi verificado que *D. bruxellensis* é capaz de produzir etanol a partir de celobiose e de fermentar esse dissacarídeo mesmo em condições similares às encontradas nos meios industriais. Essa característica aponta, portanto, *D. bruxellensis* como uma levedura com potencial para a produção de etanol lignocelulósico (REIS et al., 2014).

Diante do avanço nas pesquisas na área do etanol de segunda geração, da sua importância econômica e ambiental e das singularidades brasileiras em relação aos resíduos de cana-de-açúcar, a produção em grande escala desse combustível representa um grande potencial para o Brasil. No entanto, um dos fatores importantes para a eficiência desse processo, como já citado, é a taxa de conversão da celulose, o polissacarídeo presente em maior quantidade na biomassa, em glicose, o açúcar fermentescível principal a ser convertido em etanol. Uma vez que essa taxa é fortemente influenciada pela quantidade de celobiose no meio – que se acumula devido à insuficiente quantidade de celobiasas provenientes dos fungos filamentosos – torna-se interessante que as enzimas celobiasas estejam presentes diretamente nas leveduras do processo fermentativo, tornando-as aptas a hidrolisar a celobiose, o que poderia diminuir a quantidade desse dissacarídeo no meio e, conseqüentemente, manter um ritmo entre hidrólise e fermentação. Além disso, é importante que essas enzimas celobiasas, além de terem alta atividade, não sejam inibidas pela glicose, o que também contribui na eficiência da hidrólise e fermentação. Nesse contexto, o presente trabalho se propôs a isolar leveduras da microbiota brasileira, a partir de biomassa lignocelulósica em decomposição, no intuito de descobrir novas espécies capazes de metabolizar a celobiose e, também, avaliar a atividade das enzimas celobiasas dessas leveduras, analisando o efeito inibidor diante da glicose – importantes fatores na busca pela otimização da produção de etanol de segunda geração.

Metodologia

Isolamento de leveduras e linhagens utilizadas

As leveduras foram isoladas a partir de amostras de matéria vegetal em decomposição, obtidas no *Campus* Chapecó da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) e na Unidade de Conservação da Floresta Nacional de Chapecó, conforme protocolo descrito por CADETE et al. (2009). Restos de tecido vegetal caídos na serapilheira coletados no campo foram transportados, até o laboratório, em sacos plásticos estéreis, dentro de recipientes com isolamento térmico. Um grama de cada amostra foi separado e inoculado em frasco Erlenmeyer com 25 mL de meio de cultura líquido contendo 6,7 g.L⁻¹ de base nitrogenada, 0,2 g.L⁻¹ de cloranfenicol e 10 g.L⁻¹ de celobiose, xilose ou xilana (o período compreendido entre a coleta e o inóculo não excedeu duas horas). Cada frasco foi incubado a 25°C por 3-10 dias sob agitação constante de 160 rpm. Quando detectado crescimento celular, por turbidez, em cada amostra, uma alçada de células foi retirada deste meio líquido e estriada por esgotamento em placas de Petri, contendo 6,7 g.L⁻¹ de base nitrogenada, 10 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de ágar. As placas foram incubadas a 25°C, e as leveduras foram selecionadas com base na morfologia das colônias e na análise microscópica das células. Desses isolados, foram analisadas as linhagens: FLONA-CE-3.2, FLONA-CE-3.6, FLONA-XA-2.2, FLONA-XA-3.4, FLONA-XI-1.1, FLONA-XI-3.1, UFFS-CE-3.10, UFFS-XA-1.6, UFFS-XA-3.1 e UFFS-

XI-2.3. Além dessas leveduras, foram utilizadas também 5 linhagens (NSG-2.5.1a, NSG-2.6.2a, NSG-2.10.1a, PALMITAL-4.1a e PALMITAL-5.3) que já pertenciam a este grupo de pesquisa e que foram isoladas a partir de amostras coletadas na Gruta Nossa Senhora de Guadalupe e no Parque Palmital, ambos na cidade de Chapecó, no ano de 2011.

Determinação de crescimento celular e consumo de glicose e celobiose

Para a verificação dos perfis de crescimento celular e consumo de glicose e celobiose, as leveduras isoladas foram, primeiramente, pré-cultivadas por 48 h em frascos Erlenmeyer com 1/5 do volume de meio líquido rico, contendo 10 g.L^{-1} de extrato de levedura, 20 g.L^{-1} de peptona e 20 g.L^{-1} de glicose como fonte de carbono. Em seguida, as leveduras do pré-cultivo foram inoculadas (1/100 do volume final) em novos frascos Erlenmeyer com meios líquidos mínimos contendo $6,7 \text{ g.L}^{-1}$ de base nitrogenada e 20 g.L^{-1} de glicose ou celobiose como fontes de carbono. Todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,0. As culturas foram sempre incubadas a 28°C sob agitação de 160 rpm.

Ao longo desses cultivos, em tempos pré-determinados, foram retiradas amostras de cada meio de cultura para a determinação do crescimento celular e do consumo de açúcares (glicose ou celobiose) (conforme ALVES Jr., 2010). Enquanto uma alíquota de cada uma dessas amostras foi utilizada para determinar a concentração celular através da medida da densidade óptica ($\text{DO}_{570\text{nm}}$) em espectrofotômetro, outra foi centrifugada (5 minutos a 2191g) para que seu sobrenadante fosse utilizado para a determinação da concentração de glicose e celobiose no meio.

A glicose foi determinada através de um kit enzimático comercial de acordo com as instruções do fabricante (ANALISA). Para essa análise, $10,0 \mu\text{L}$ de cada amostra reagiram com $1,0 \text{ mL}$ do reagente de cor desse kit (composto pelas enzimas glicose oxidase e peroxidase) sob incubação de 10 min a 37°C . Em seguida, a quinonimina (produto de cor avermelhada) produzida na reação foi estimada a 490 nm, permitindo a determinação da concentração de glicose em cada amostra através da correlação com a absorbância apresentada pela solução padrão ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$).

A dosagem de celobiose foi realizada através de uma adaptação do método colorimétrico de DNS – descrito por MILLER (1959) – para microplacas de 96 poços (de fundo plano). Em cada poço das microplacas, foram adicionados $25 \mu\text{L}$ de amostra (diluídas conforme necessidade, de modo que suas leituras estivessem dentro da curva de calibração) e $25 \mu\text{L}$ de reativo DNS (10 g.L^{-1} de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 300 g.L^{-1} de tartarato duplo de sódio e potássio em $0,4 \text{ M NaOH}$). As curvas de calibração, com seis concentrações, na faixa de 0 a $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de celobiose, foram montadas em todas as microplacas lidas. Depois de pipetados as amostras e o reativo, as microplacas foram seladas com filme plástico (T796400, E&K Scientific), incubadas em banho fervente por 5 minutos e, subsequentemente, resfriadas no gelo. Depois disso, o filme plástico foi retirado para que $330 \mu\text{L}$ de água fossem adicionados a cada poço. As microplacas, por fim, foram levadas ao leitor de microplacas e as amostras foram lidas a 490 nm (com um feixe emitido por vez no centro de cada poço). As concentrações, em g.L^{-1} de celobiose, foram calculadas com base na equação de reta gerada a partir da curva de calibração, utilizando as medidas de absorbância obtidas diretamente em planilhas do Microsoft® Excel.

Determinação da atividade celobiase

A atividade de hidrólise periplasmática de celobiose das leveduras isoladas foi determinada em células crescidas até o início da sua fase exponencial de crescimento ($\text{DO}_{570\text{nm}} \sim 3,5$) em meios mínimos contendo alternadamente glicose ou celobiose como fontes

de carbono, seguindo protocolo adaptado de DÁRIO (2012) e MOURO (2012). Para isso, as células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com água a 4°C e ressuspensas de modo a atingirem a concentração de 20 g.L⁻¹. Volumes de 100,0 µL dessa suspensão foram transferidos para cinco microtubos, no intuito de fazer amostras em triplicata e controles negativos em duplicata – antes de prosseguir com o experimento, os microtubos que serviram de controle negativo foram fervidos a 100°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 100,0 µL de Reagente 1 (150 mM de fluoreto de sódio em tampão succinato-Tris 0,15 M, pH 5,0) a cada microtubo, com subsequente incubação a 30°C por 30 minutos. Depois disso, 100,0 µL de Reagente 2 (300 mM de celobiose) foram adicionados aos tubos que, subsequentemente, foram incubados por 10 minutos a 30°C. Após a incubação, os tubos foram rapidamente fervidos por 10 minutos e, em seguida, resfriados em banho de gelo. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2191g e os sobrenadantes utilizados para quantificar a concentração de glicose formada, o que serviu para calcular a atividade de hidrólise almejada. A glicose, obtida a partir da atividade celobiase periplasmática, foi determinada através de um kit enzimático comercial, conforme descrito na seção anterior.

Para a determinação da atividade celobiase intracelular, as células coletadas no início da fase exponencial de crescimento ($DO_{570nm} \sim 3,5$), em meios mínimos com glicose ou celobiose como fonte de carbono, foram inicialmente permeabilizadas, conforme descrito por DÁRIO (2012) e MOURO (2012). Para isso, aproximadamente 2 mg de células foram lavadas em 0,5 mL de tampão MOPS-NaOH 0,1 M, pH 6,8 (tampão A), e posteriormente ressuspensas em 200,0 µL do mesmo tampão contendo 200 g.L⁻¹ de glicerol, 1,0 mM de EDTA, e 1,0 mM DTT (tampão B). Em seguida, foram adicionados, a essa suspensão, 12,0 µL de uma solução de tolueno/etanol/Triton X-100 10% (1:4:1; v/v) e as células foram vigorosamente agitadas durante 1 min. Após a permeabilização, as células foram lavadas duas vezes com tampão B e ressuspensas em 1,0 mL do tampão A. Dessa suspensão de células permeabilizadas, 50,0 µL foram adicionados a 50,0 µL de uma solução 0,2 M de celobiose em tampão A. Em seguida, cada uma dessas amostras foi incubada a 30° C durante 10 min, fervidas a 100° C por 10 min e posteriormente centrifugadas. Logo após, os sobrenadantes foram utilizados para determinar colorimetricamente a glicose liberada pela quebra da celobiose. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e foram utilizados controles (em duplicata) com células previamente fervidas. A unidade das atividade enzimáticas foi determinada em nmols de glicose liberada por miligrama de células a cada minuto de reação.

Resultados e discussão

A primeira parte do trabalho consistiu no isolamento de leveduras a partir de amostras de matéria vegetal em decomposição, coletadas em diferentes locais da cidade de Chapecó. Cada linhagem isolada foi denominada de acordo com uma sigla que seguiu uma ordem pré-estabelecida. Para todos os isolados, a sigla inicial do código da linhagem representa o local onde a amostra foi coletada. A segunda sigla representa o carboidrato contido no meio de cultura em que a amostra de biomassa em decomposição foi inoculada para o isolamento: neste caso, a sigla CE representa leveduras isoladas em meios contendo celobiose como fonte de carbono; a sigla XA representa leveduras isoladas em meios contendo xilana como fonte de carbono; e, a sigla XI representa leveduras isoladas em meios contendo xilose como fonte de carbono. Por fim, os números nas siglas representam, respectivamente, a amostra de biomassa coletada em cada local e o número da colônia de levedura isolada.

Na Tabela 1 são apresentadas algumas informações sobre as coletas realizadas. Foram obtidos 60 isolados a partir de amostras de biomassa vegetal em decomposição coletadas na UFFS e na Floresta Nacional de Chapecó. Para o início da caracterização bioquímica, os

isolados foram randomicamente selecionados, e, destes, foram analisadas 15 diferentes cepas de leveduras, em virtude da falta de tempo para a análise de todos os isolados.

Tabela 1 – Informações sobre as coletas realizadas e as linhagens isoladas.

Código inicial da linhagem	Data da Coleta das amostras	Local da Coleta
UFFS	05/07/2014	Universidade Federal da Fronteira Sul
FLONA	15/08/2014	Unidade de Conservação da Floresta Nacional
NSG	12/09/2011	Parque Nossa Senhora de Guadalupe
PALMITAL	21/10/2011	Parque Palmital

Crescimento celular e consumo de glicose e celobiose

Após a fase de isolamento, foram realizadas análises dos perfis de crescimento celular e consumo de glicose e celobiose das linhagens de leveduras isoladas. Como pode ser visualizado nas Figuras 1 a 4, apenas uma das linhagens analisada (PALMITAL-5.3) mostrou-se incapaz de metabolizar a celobiose. As demais linhagens, entretanto, foram capazes de crescer utilizando esse dissacarídeo como fonte de carbono, embora o tenham consumido com velocidades diferentes. É notável também que, com exceção das linhagens FLONA-CE-3.2 e FLONA-XI-1.1, que consumiram por completo a celobiose presente no meio dentro de tempo de incubação determinado, as demais cepas aparentemente precisariam de mais tempo para que o carboidrato em questão fosse completamente consumido pelas células. Em contrapartida, alguns autores também já verificaram que, independentemente do tempo de incubação, alguns carboidratos podem não ser completamente consumidos se as células forem crescidas em meios mínimos (DA CRUZ; CILLI; ERNANDES, 2002; ALVES Jr. et al., 2007).

Observando os gráficos de crescimento celular (gráficos A e C das Figuras 1 a 4), vê-se pouca diferença entre os perfis das leveduras quando crescidas em meios contendo glicose ou quando crescidas em meios contendo celobiose como fontes de carbono. Por outro lado, a diferença é mais pronunciada ao serem comparados os perfis de consumo desses dois carboidratos. Analisando os gráficos de consumo de açúcares (gráficos B e D das Figuras 1 a 4), é possível verificar que as linhagens, de maneira geral, apresentam maior rapidez no consumo da glicose em comparação com a celobiose. De fato, com exceção da linhagem PALMITAL-5.3 (que não apresentou crescimento em nenhuma das fontes de carbono), todas as demais consumiram completamente a glicose em no máximo 40 h de crescimento – e sete delas em até 20 h. Estudos realizados por SANTOS et al. (2011) e MOURO (2012) também revelaram algumas leveduras que consumiram a celobiose um pouco mais lentamente do que a glicose.

A despeito de um menor ou mais lento consumo de celobiose em comparação com a glicose, algumas cepas (UFFS-CE-3.10, UFFS-XA-3.1, FLONA-CE-3.2 e FLONA-XI-1.1), entretanto, apresentaram maior crescimento celular em meios contendo celobiose do que em meios contendo glicose. Esses resultados demonstram que, embora não se tenha feito análise de produção de etanol, muito provavelmente as linhagens em questão, quando crescidas em meios com celobiose, metabolizaram esse dissacarídeo aerobicamente, tendo uma produção maior de biomassa com uma menor utilização de carboidrato – ou seja, priorizaram a respiração celular à fermentação. Isso é condizente com estudos prévios, que demonstraram

que, quando açúcares são consumidos lentamente, o metabolismo das leveduras é essencialmente respiratório (POSTMA et al, 1989; DUVAL et al., 2010).

Figura 1 – Perfis de crescimento celular (A, C) e consumo de glicose e celobiose (B, D) apresentados por leveduras crescidas em meios sintéticos contendo 2% de glicose (A, B) ou celobiose (C, D) como fonte de carbono. As leveduras apresentadas nesta figura foram isoladas no *Campus* Chapecó da Universidade Federal da Fronteira Sul.

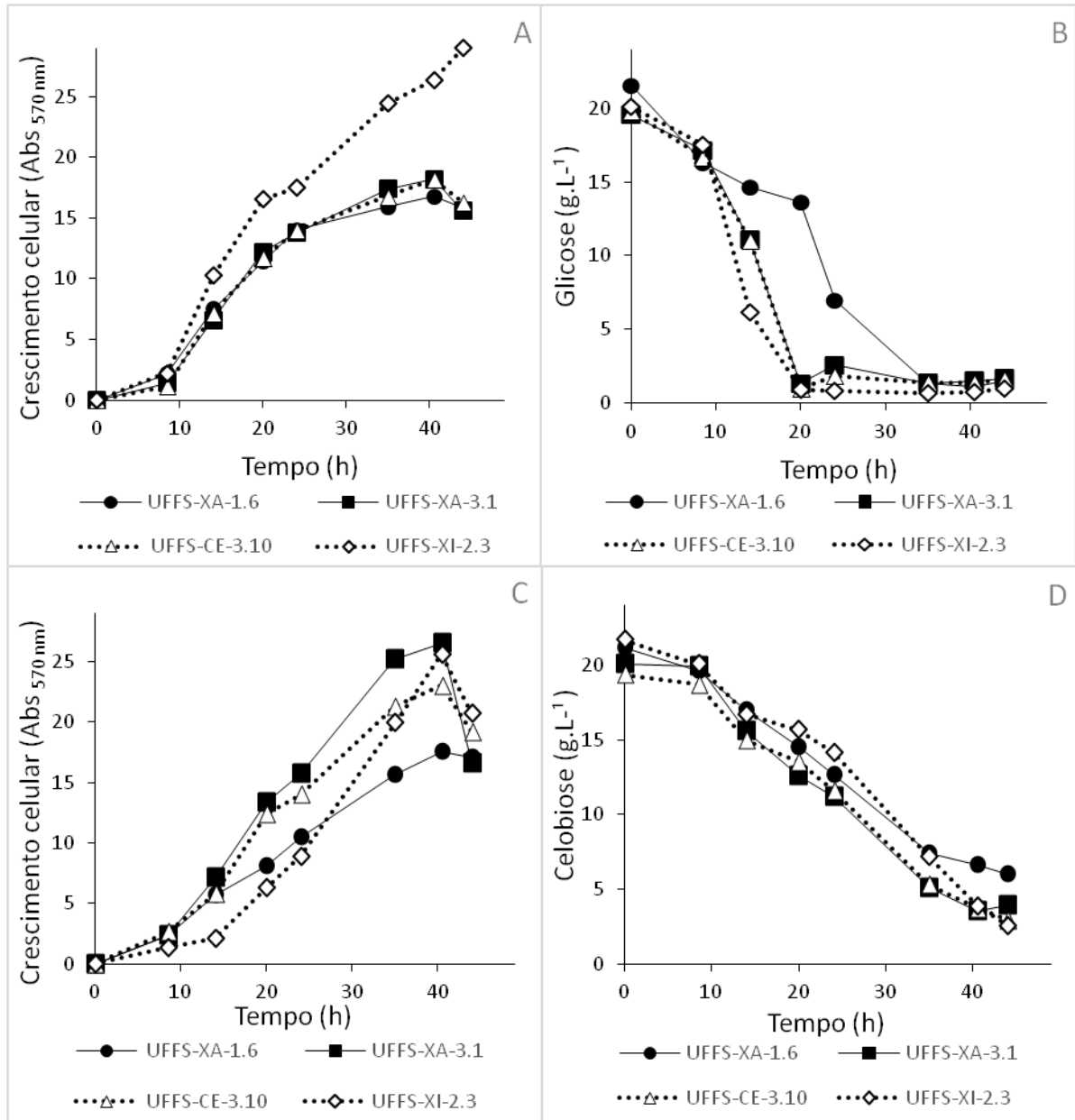


Figura 2 – Perfis de crescimento celular (A, C) e consumo de glicose e celobiose (B, D) apresentados por leveduras crescidas em meios sintéticos contendo 2% de glicose (A, B) ou celobiose (C, D) como fonte de carbono. As leveduras apresentadas nesta figura foram isoladas na Unidade de Conservação da Floresta Nacional de Chapecó.

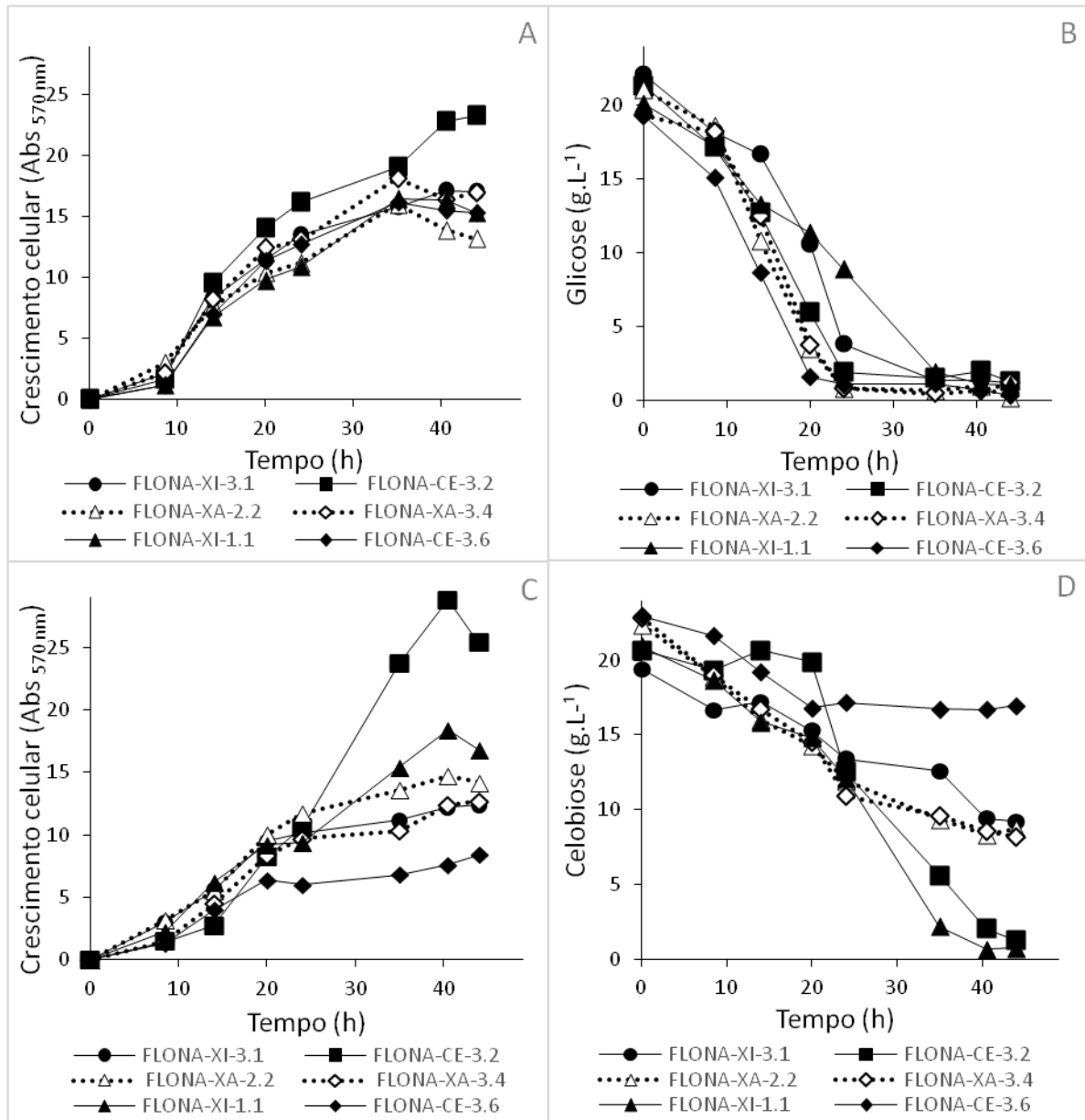


Figura 3 – Perfis de crescimento celular (A, C) e consumo de glicose e celobiose (B, D) apresentados por leveduras crescidas em meios sintéticos contendo 2% de glicose (A, B) ou celobiose (C, D) como fonte de carbono. As leveduras apresentadas nesta figura foram isoladas no Parque da Gruta Nossa Senhora de Guadalupe da Cidade de Chapecó.

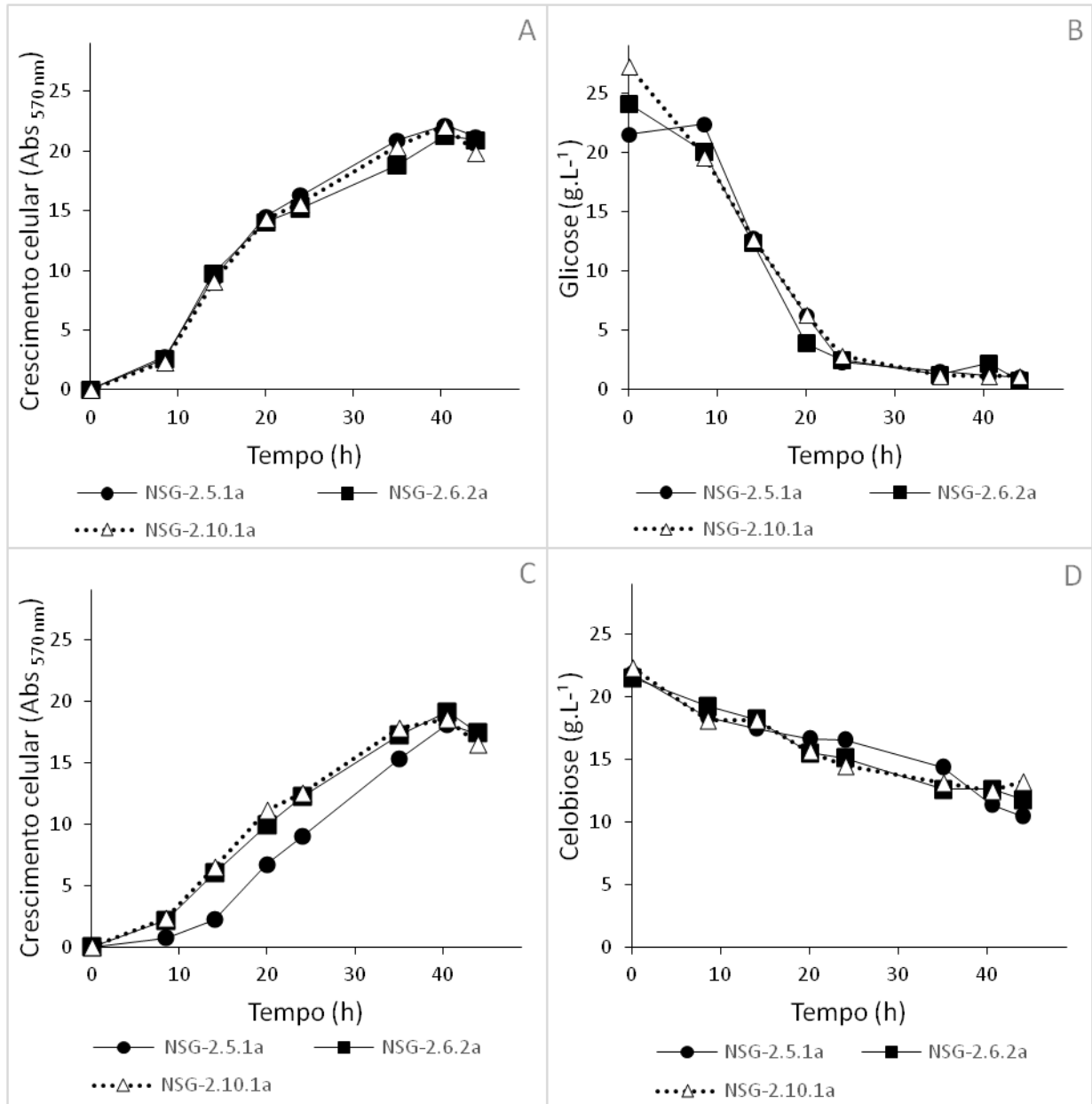
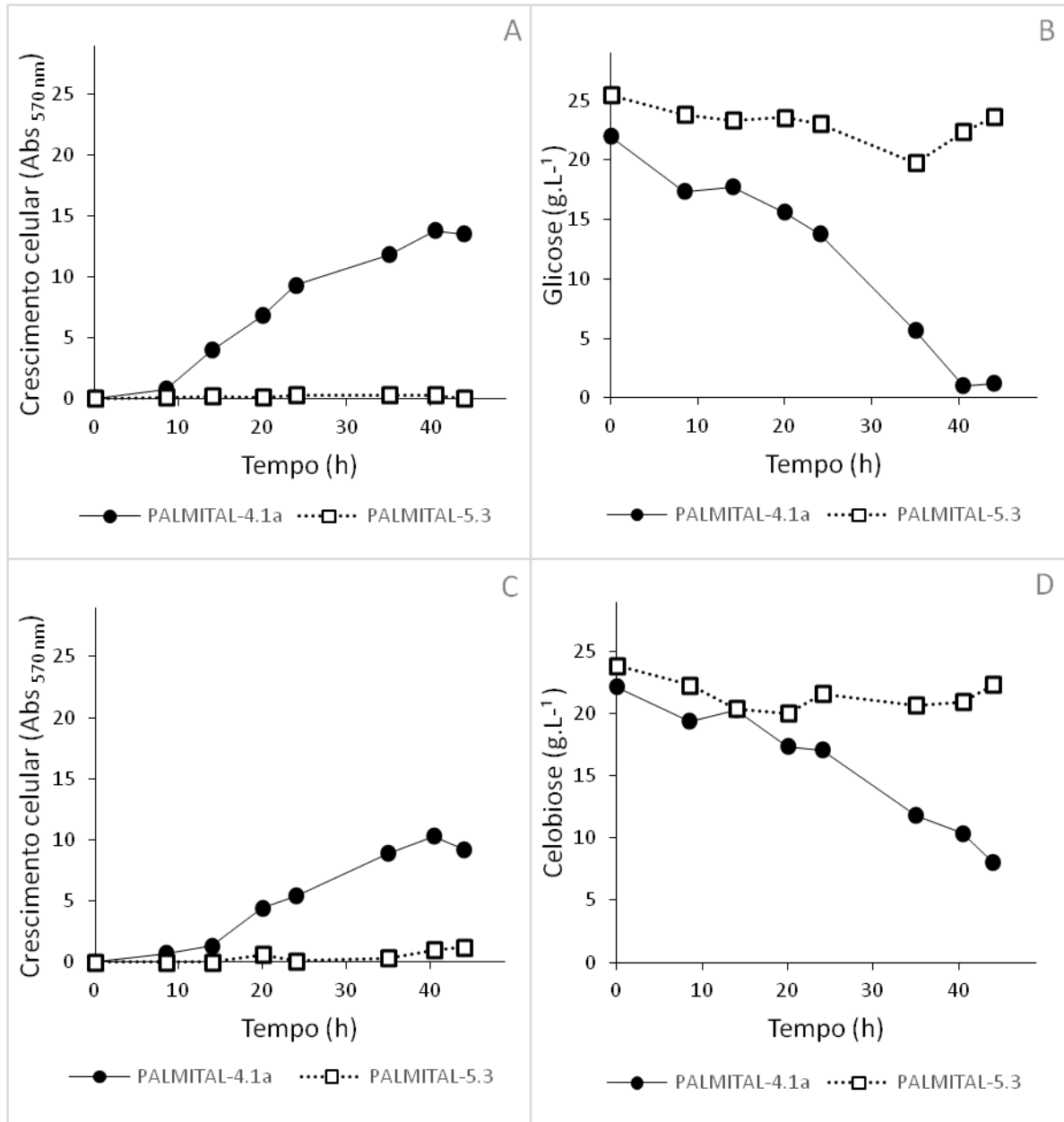


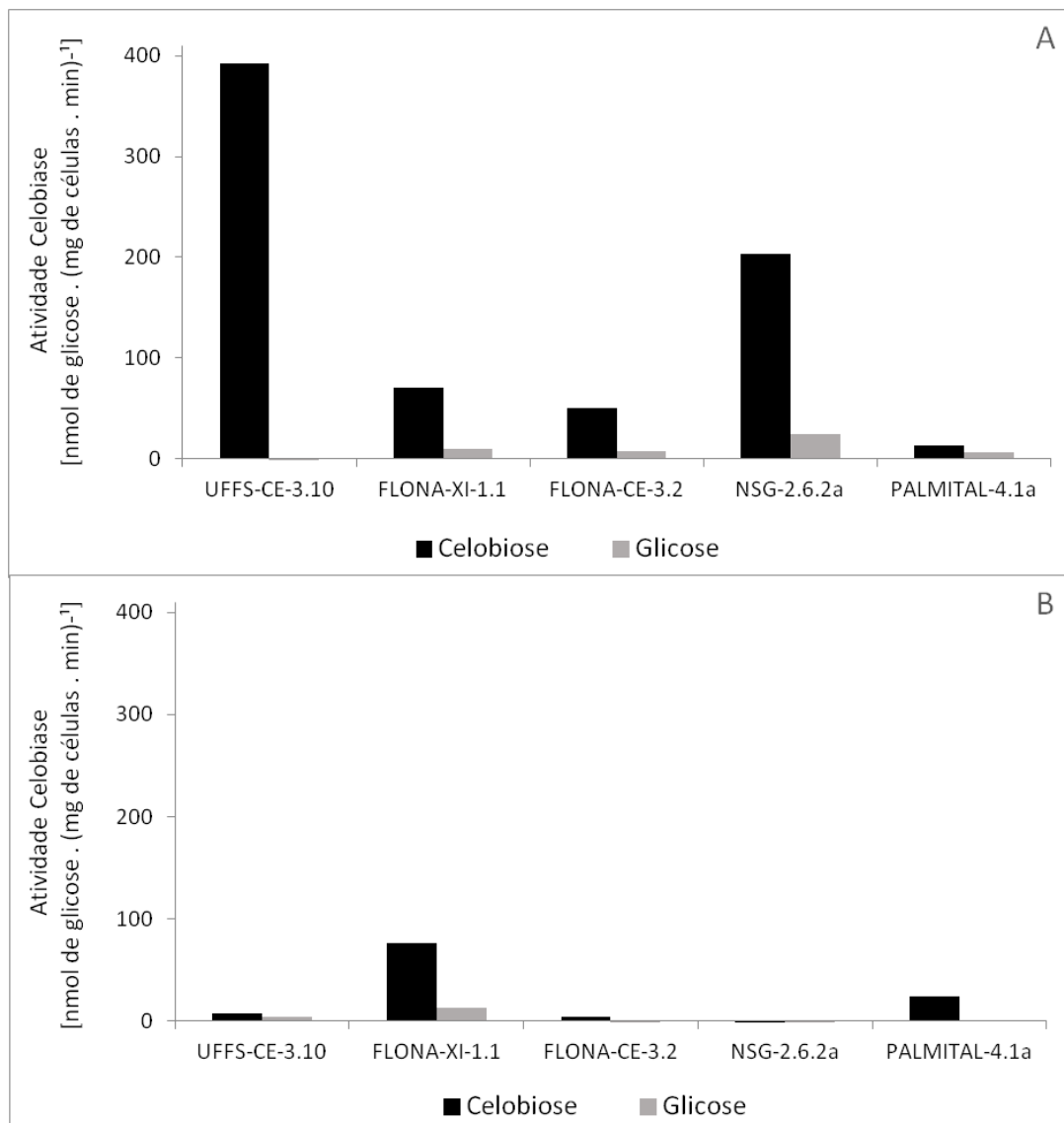
Figura 4 – Perfis de crescimento celular (A, C) e consumo de glicose e celobiose (B, D) apresentados por leveduras crescidas em meios sintéticos contendo 2% de glicose (A, B) ou celobiose (C, D) como fonte de carbono. As leveduras apresentadas nesta figura foram isoladas no Parque Palmital da Cidade de Chapecó.



Atividade da enzima celobiase

Após as análises de crescimento celular e consumo de glicose e celobiose, 5 linhagens de leveduras foram submetidas a testes de atividade da enzima celobiase (responsável pela hidrólise da celobiose). Essas análises correspondem a medidas de atividade intracelular e periplasmática (conforme descrito na seção Metodologia) dadas em nmols de glicose liberada por miligrama de células a cada minuto. Os resultados destas análises estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Atividade celobiase apresentada por leveduras crescidas em meios sintéticos contendo 2% de celobiose (barra preta) ou 2% de glicose (barra cinza) como fonte de carbono. A atividade celobiase intracelular está representada no gráfico A, enquanto que a atividade celobiase periplasmática está representada no gráfico B.



Observando os gráficos da Figura 5, nota-se que as linhagens analisadas – UFFS-CE-3.10, FLONA-XI-1.1, FLONA-CE-3.2, NSG-2.6.2a e PALMITAL-4.1a – tiveram a expressão da celobiase inibida (ou pelo menos não a tiveram induzida) pela glicose, haja vista a pronunciada diferença entre os níveis de atividade dessa enzima, quando comparadas

células crescidas em celobiose e glicose. Embora SAHA e BOTHAST (1996) tenham descrito leveduras capazes de expressar a enzima celobiase mesmo em células crescidas em diferentes fontes de carbono (glicose, xilose, arabinose, celobiose, sacarose e maltose), a glicose sabidamente promove a repressão catabólica de uma série de enzimas envolvidas no metabolismo de diferentes carboidratos (SANTANGELO, 2006; LIU et al., 2012; ALVES Jr.; THEVELEIN; STAMBUK, 2014).

De maneira geral, os resultados também demonstram maior atividade intracelular da enzima celobiase do que atividade periplasmática, o que corrobora dados já publicados por SANTOS et al. (2011) e MOURO (2012), que verificaram uma escassa atividade periplasmática dessa enzima nas leveduras analisadas em seus trabalhos. No entanto, os dados apontam também, para duas das linhagens testadas, FLONA-XI-1.1 e PALMITAL-4.1a, atividades periplasmáticas de mesmo nível que as intracelulares.

Ainda, é possível observar através das análises que as linhagens NSG-2.6.2a e UFFS-CE-3.10 apresentaram atividades enzimáticas duas a quatro vezes maiores, respectivamente, do que as outras três cepas testadas. Para a cepa UFFS-CE-3.10, é possível que essa atividade elevada tenha contribuído para o consumo praticamente completo da celobiose durante o seu crescimento celular (Figura 1). Por outro lado, as linhagens FLONA-CE-3.2 e FLONA-XI-1.1, embora tenham sido as únicas que consumiram por completo a celobiose durante o cultivo (Figura 2), apresentaram baixa atividade celobiase se comparada à atividade das outras duas linhagens citadas (Figura 5). Somando-se a isso o fato de que a linhagem NSG-2.6.2a tenha apresentado o dobro da atividade celobiase intracelular e mesmo assim tenha consumido apenas metade da celobiose disponível no meio durante seu crescimento (Figura 3), os resultados indicam que o transporte de celobiose através da membrana plasmática das células possa ser um fator também limitante para a metabolização do dissacarídeo em questão, uma vez que células que apresentaram alta atividade celobiase intracelular foram incapazes de consumir toda a celobiose presente no meio de cultivo. De fato, é amplamente reconhecido que, em muitos casos, o transporte de um carboidrato pode ser limitante para uma fermentação eficiente (REIJENGA et al, 2001; ZASTROW et al, 2001; ROSSELL et al., 2002).

Por fim, vale ressaltar também que a cepa NSG-2.6.2a, além de ter apresentado alta atividade celobiase, aparentemente sofreu menos os efeitos da inibição provocada pela glicose. Essa característica é bastante desejada em um sistema de hidrólise celulolítica, na preparação do mosto a ser fermentado para a produção de etanol 2G (SKORY; FREER; BOTHAST, 1996). Assim, as linhagens em questão poderiam ser melhor investigadas para uma possível aplicação de suas enzimas celobiasas diretamente na hidrólise da celobiose ou, até mesmo, na identificação dos genes que codificam as enzimas celobiasas destas leveduras para expressão heteróloga em *S. cerevisie*.

Conclusões

Através das análises realizadas, pode-se afirmar que os isolados apresentados neste trabalho certamente servirão para estudos que estejam buscando desvendar os genes que proporcionam a metabolização da celobiose em espécies de leveduras isoladas da microbiota brasileira. Com isso, proporcionou-se também a possibilidade de otimização do processo de produção de etanol de segunda geração. Vale ressaltar que, como perspectiva futura, seria interessante a identificação taxonômica das espécies de leveduras analisadas neste projeto, com vistas à ampliação do conhecimento sobre a microbiota da região oeste de Santa Catarina.

CELLOBIOSE METABOLIZATION BY YEASTS ISOLATED FROM ROTTING WOOD

Abstract

The metabolization of cellobiose is one of the limiting factors for a successful production of second-generation ethanol; however, *Saccharomyces cerevisiae*, which continues to be the most well-adapted yeast to the alcoholic fermentation industry, is known to be unable to use this disaccharide. Taking into account that, in local forests, as well as in any similar biome, lignocellulosic biomass is decomposed by microorganisms such as yeasts, which, unlike *S. cerevisiae*, can utilize cellobiose, this work aimed the isolation and characterization of yeast from the local microbiota, in order to select new strains which were able to efficiently metabolize this carbon source. We analyzed the profiles of cell growth and sugar consumption of 15 yeast strains, isolated from Conservation Unit of the National Forest Chapecó, from the campus of Universidade Federal da Fronteira Sul, from the park around the Grotto of Our Lady of Guadalupe and from Palmital Park – all of them, located in the City of Chapecó. Among the strains analyzed, 14 showed ability to metabolize cellobiose, although with different rates of sugar consumption. The periplasmic and intracellular activity of the enzyme cellobiase in 5 strains were also evaluated. The intracellular activity was in general higher than the periplasmic. The results also suggest that glucose inhibits the expression of cellobiase. Thus, the isolated strains showed interesting features for the ethanol industry. Further studies can now provide a parallel between the performance of these yeasts in industrial conditions and a heterologous expression of its celobiases in *S. cerevisiae*, in order to find the most efficient application.

Keywords: Fermentation. Cellobiose. Yeasts. 2G Ethanol. Brazilian microbiota.

REFERÊNCIAS

- ALVES Jr., S.L. **Genômica do metabolismo de maltotriose em *Saccharomyces cerevisiae*: o papel determinante do gene AGT1**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-29042010-105556/publico/SergioLuizAlvesJr_Doutorado.pdf>. Acesso em: 12 Abr. 2014.
- ALVES Jr., S.L. et al. Maltose and Maltotriose Active Transport and Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. v.65, p.99-104, 2007. Disponível em: <<http://www.asbcnet.org/publications/journal/vol/abstracts/ASBCJ-2007-0411-01.htm>>. Acesso em: 15 Nov. 2014.
- ALVES Jr., S.L.; THEVELEIN, J. M.; STAMBUK, B. U. Expression of *saccharomyces cerevisiae* α -glucoside transporters under different growth conditions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.31, p.1-8, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjce/v31n1/01.pdf>>. Acesso em: 15 Nov. 2014.
- ANFAVEA – Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores. **Carta da ANFAVEA 2013**. Disponível em: <<http://www.anfavea.com.br/cartas/Carta330.pdf>> Acesso em: 24 Abril 2014.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**. v.29, p.719-739, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102600>>. Acesso em: 25 Abr. 2014.
- BARBOSA, A.M. et al. Extracellular beta-glucosidase production by the yeast *Debaryomyces pseudopolymorphus* UCLM-NS7A: optimization using response surface methodology. **New Biotechnology**. v.27, p.374-381, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493976>>. Acesso em: 30 Abr. 2014.
- BENOLIEL, B. et al. Expression of a Glucose-tolerant β -glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v.160, p.2036-2044, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12010-009-8732-7>>. Acesso em: 30 Abr. 2014.
- BLOMQVIST, J. et al. Fermentation of lignocellulosic hydrolysate by the alternative industrial ethanol yeast *Dekkera bruxellensis*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 51, p.73-78, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535044>>. Acesso em: 28 Maio 2014.
- CADETE, R. M. et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**. v.9, p.1338-1342, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1984011>>. Acesso em: 10 Maio 2014.
- CHI, Z. et al. *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. **Biotechnology Advances**. v.27, p.423-431, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19328842>>. Acesso em: 17 Maio 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar**. Safra 2013/2014. Agosto 2013. Segundo levantamento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_-_abril_2013_1o_lev.pdf>. Acesso em: 18 Abr. 2014.

DA CRUZ, S. H.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 108, p. 54-61, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.20500416.2002.tb00124.x/abstract>>. Acesso em: 15 Nov. 2014.

DARIO, M.G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-04062012-114632/publico/MarceloGoulartDario_Doutorado.pdf>. Acesso em: 24 Abr. 2014.

DEKKER, R.F.H. Kinetic, Inhibition, and Stability Properties of a Commercial β -D-Glucosidase (Cellobiase) Preparation from *Aspergillus niger* and Its Suitability in the Hydrolysis of Lignocellulose. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 28, p.1438-1442, 1986. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18561233>>.Acesso em: 11 Maio 2014.

DUVAL, E.H. et al. Microarray karyotyping of maltose-fermenting *Saccharomyces* yeasts with differing maltotriose utilization profiles reveals copy number variation in genes involved in maltose and maltotriose utilization. **Journal of Applied Microbiology**. v.109, p.289-259, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20070441>>. Acesso em: 15 Nov. 2014.

FREER, S.N. Kinetic characterization of a beta-glucosidase from a yeast, *Candida wickerhamii*. **The Journal of Biological Chemistry**. v.268, p.9337-9342, 1993. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/268/13/9337.long>>. Acesso em: 10 Abr. 2014.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.59, p.618-628, 2002. Disponível em: <http://cepac.cheme.cmu.edu/pasi2008/slides/stuart/library/reading/Review_production_ethanol_from_softwood.pdf>. Acesso em: 02 Maio 2014.

GOLDEMBERG, J. The ethanol program in Brazil. **Environmental Research Letters**. v.1, 2006. Disponível em: < <http://iopscience.iop.org/1748-9326/1/1/014008/fulltext/> >. Acesso em: 04 Abr.2014.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**. v.1, p.6, 2008. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/pdf/1754-6834-1-6.pdf> >. Acesso em: 04 Abr. 2014.

HA, S.-J. et al. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.108, p.504-509, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3021080/>>. Acesso em: 16 Maio 2014.

KOPPRAM, R.; OLSSON, L. Combined substrate, enzyme and yeast feed in simultaneous saccharification and fermentation allow bioethanol production from pretreated spruce biomass at high solids loadings. **Biotechnology for Biofuels**. v.7, p.54, 2014. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/7/1/54>>. Acesso em: 01 Maio 2014.

LANDRY, C.R. et al. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**. v.15, p.575-591, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16499686>>. Acesso em: 30 Abr. 2014.

LEE, W.-H. et al. Simultaneous saccharification and fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without supplementing extracellular β -glucosidase. **Journal of Biotechnology**. v.167, p.316-322, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23835155>>. Acesso em: 01 Maio 2014.

LI, X.; WENG, J.-K.; CHAPPLE, C. Improvement of biomass through lignin modification. **The Plant Journal**. v.54, p.569-581, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476864>>. Acesso em: 28 Maio 2014.

LIU, Z.L. et al. A new β -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**. v.104, p.410-416, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133603>>. Acesso em: 11 Nov. 2014.

LYND, R.L. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.66, p.506-577, 2002. Disponível em: <<http://mmbr.asm.org/content/66/3/506.long>>. Acesso em: 30 Abr. 2014.

MACRELLI, S; GALBE, M.; WALLBERG, O. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. **Biotechnology for Biofuels**. v.7, p.26, 2014. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/7/1/26>>. Acesso em: 08 Abr. 2014.

MÉRICO, A. et al. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS Journal**. v.274, p.976-989, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17239085>>. Acesso em: 30 Abr. 2014.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v.31, p.426-429, 1959. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: 10 Jun. 2014.

MOURO, A. **Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/100622>>. Acesso em: 28 Mar. 2014.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**. v.1, p.7, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1186%2F1754-6834-1-7>>. Acesso em: 01 Maio 2014.

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of Lignocellulosic Composition for Fuel Ethanol Production within the Context of Biorefinery. In: **Series on Biotechnology**. v.2, 45p. 2008. Disponível em: <<http://www.ladebio.org.br/download/series-em-biotecnologia-vol-ii-lignocellulosic-biomass.pdf>>. Acesso em: 26 Abr.2014.

PESSOA Jr., A. et al. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.121-124, p.59-70, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917587>>. Acesso em: 17 Abr. 2014.

Plano Nacional de Resíduos Sólidos – versão preliminar. **Ministério do Meio Ambiente**. 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/253/_publicacao/253_publicacao02022012041757.pdf>. Acesso em: 27 Abr. 2014.

POSTMA, E. et al. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 468-477, 1989. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184133/>>. Acesso em: 15 Nov. 2014.

REIJENGA, K. A. et al. Control of glycolytic dynamics by hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biophys J** v.80, p.626-634, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159431>>. Acesso em: 15 Nov. 2014.

REIS, A. L. S. et al. Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. **SpringerPlus**. v.3, p.38, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1186%2F2193-1801-3-38>>Acesso em: 16 Maio 2014.

ROSSELL, C.E.V. Saccharification of sugarcane bagasse for ethanol production using the Organosolv process. Journal. **Sugar Industry/Zuckerindustrie** v.131, p.105-109, 2006. Disponível em:<<http://www.cabdirect.org/abstracts/20063038214.html>>.Acesso em:15 Nov. 2014.

SAHA, B.C.; BOTHAST, R.J. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.62, p.3165-3170, 1996. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/62/9/3165.short>>. Acesso em: 13 Nov. 2014.

SANTANGELO, G.M. Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.70, p.253–282, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16524925>>. Acesso em 15 Nov. 2014.

SANTOS, R.O. et al. *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v.99, p.635-642, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21136162>>. Acesso em: 15 Nov. 2014.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**. v.37, p.19-27, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096014812X#>>.Acesso em: 24 Abr. 2014.

SKORY, C.D.; FREER, S.N.; BOTHAST, R.J. Expression and secretion of the *Candida wickerhamii* extracellular β -glucosidase gene, *bglB*, in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**. v.30, p.417-422, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8929394>>. Acesso em: 10 Maio 2014.

SOCOL, C.R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**. v. 101, p.4820-4825, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20022746>>. Acesso em: 30 Abr. 2014.

SOUZA, A.C. et al. Sugarcane Bagasse Hydrolysis Using Yeast Cellulolytic Enzymes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.23, p.1403-1412, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23851270>>. Acesso em: 15 Maio 2014.

STAMBUK, B.U. et al. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of scientific and industrial research**. v. 67, p.918-926, 2008. Disponível em: <<http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/2420>>. Acesso em: 04 Abr. 2014.

TANG, H. et al. High β -Glucosidase Secretion in *Saccharomyces cerevisiae* Improves the Efficiency of Cellulase Hydrolysis and Ethanol Production in Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.23, p.1577-1585, 2013. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2392840>>.Acesso em: 03 Maio 2014.

WILDE, C. et al. Expression of a library of fungal β -glucosidases in *Saccharomyces cerevisiae* for the development of a biomass fermenting strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.95, p.647-659, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22218767>>. Acesso em: 21 Maio 2014.

ZANIN, G. M. et al. Brazilian Bioethanol Program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.84–86, p.1147-1161, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10849865>>. Acesso em: 04 Abr.2014.

ZASTROW, C.R. et al. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v.27, p.34-38, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598808>>. Acesso em: 15 Nov. 2014.

ZHANG, Y.-H.P.; LYND, L.R. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. **Biotechnology and Bioengineering**. v.88, p.797-824, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.20282/abstract>>. Acesso em: 25 Abr. 2014.

ZHANG, Z.; DONALDSON, A.A.; MA, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advances**. v.30, p.913-919, 2012. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306162>>. Acesso em: 25 Abr. 2014.