

JUNIOR ROMEO DEOTI

**HIDRÓLISE DE XILANA E METABOLIZAÇÃO DE XILOSE POR
LEVEDURAS ISOLADAS DA 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

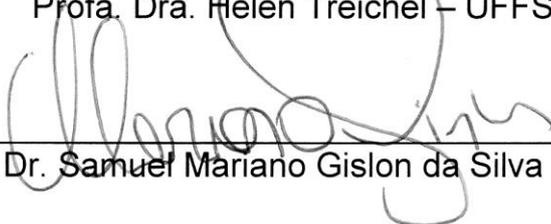
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Jr. – UFFS



Profa. Dra. Helen Treichel – UFFS



Prof. Dr. Samuel Mariano Gislon da Silva - UFFS

HIDRÓLISE DE XILANA E METABOLIZAÇÃO DE XILOSE POR LEVEDURAS ISOLADAS DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA EM DECOMPOSIÇÃO

Junior Romeo Deoti¹
Sérgio Luiz Alves Júnior^{**}

RESUMO

A hidrólise de compostos lignocelulósicos como a xilana e a metabolização da xilose, o principal produto dessa hidrólise, são fatores limitantes na produção de etanol de segunda geração. Com a finalidade de compreender melhor essas duas etapas, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar leveduras pertencentes à microbiota local. Foram analisadas 16 linhagens isoladas no *campus* da Universidade Federal da Fronteira Sul, na Unidade de Conservação da Floresta Nacional de Chapecó, no Parque da Gruta Nossa Senhora de Guadalupe e no Parque Palmital, localizados na cidade de Chapecó. Dentre as linhagens analisadas, 14 apresentaram crescimento em glicose, 13 apresentaram crescimento em xilose e 3 apresentaram crescimento em xilana. A glicose foi a fonte de carbono mais rapidamente consumida pelas células. Também foram analisadas as atividades enzimáticas de hidrólise de xilana induzidas em células crescidas em meios contendo xilana ou xilose como fonte de carbono. Os resultados demonstraram que a atividade enzimática em células crescidas em xilana é superior a daquelas crescidas em xilose, indicando que a xilose não induz a atividade enzimática, podendo atuar como repressor do gene que codifica a enzima. Além disso, os dados também apontam que a atividade das xilanases é maior na fase final do crescimento celular, sugerindo que os produtos da hidrólise enzimática são indutores mais potentes da sua expressão gênica. O presente trabalho, portanto, permitiu também a identificação de linhagens que podem contribuir para a otimização da produção de etanol 2G.

Palavras-chave: Leveduras. Biomassa Lignocelulósica. Etanol 2G. Xilana. Xilose.

INTRODUÇÃO

A produção de etanol combustível no Brasil teve início na década de 1970 com o Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Em um período de crise econômica mundial impulsionada pelo preço dos barris de petróleo, o Proálcool buscou substituir a gasolina utilizada como combustível em veículos leves pelo etanol. Com o estímulo do governo, a produção de veículos movidos a álcool chegou ao seu ápice em 1986, quando menos de um terço do total de carros fabricados no país ainda utilizava gasolina como combustível. Nos anos seguintes, entretanto, a produção de etanol sofreu forte declínio, em virtude, principalmente, da estabilização do preço do petróleo e dos problemas apresentados pelos automóveis movidos a álcool. Esse quadro só foi revertido com o início da comercialização dos carros *flex* – veículos bicomcombustíveis movidos a álcool e a gasolina – no ano de 2003, que foi impulsionada pela crescente preocupação com os problemas ambientais gerados pela utilização de combustíveis fósseis e pela busca por fontes renováveis de energia (DÁRIO, 2007).

* Acadêmico do curso de Engenharia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul

** Professor Adjunto II da Universidade Federal da Fronteira Sul

O surgimento dos motores bicombustíveis fez com que a produção de álcool combustível ganhasse novamente força no Brasil. De acordo com dados recentes da ANFAVEA (Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores), no ano de 2013, 88,50% dos veículos novos comercializados no país eram bicombustíveis. Com essa pronunciada comercialização de veículos *flex*, o Brasil ganhou papel de destaque na substituição da gasolina, combustível derivado do petróleo, pelo etanol, combustível renovável e menos poluente. O Brasil – que, na safra de 2013/2014, segundo a UNICA (União da Indústria de Cana-de-Açúcar), produziu cerca de 25,04 bilhões de litros de etanol – é o segundo maior produtor mundial, ficando apenas atrás dos Estados Unidos.

Atualmente, a produção nacional de álcool combustível (chamado de etanol de primeira geração) é proveniente da fermentação do caldo de cana-de-açúcar, ou do melaço derivado desse caldo. O caldo extraído da cana-de-açúcar é utilizado diretamente como substrato nesse processo fermentativo. É amplamente reconhecido que a sacarose representa quase a totalidade de açúcares presentes no caldo de cana. Dessa forma, o etanol produzido hoje no Brasil (de primeira geração) é proveniente da eficiente fermentação da sacarose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (WHEALS et al., 1999; ZANIN et al., 2000; PESSOA-JR et al., 2005; WU, BIRCH, 2007; STAMBUK et al., 2008).

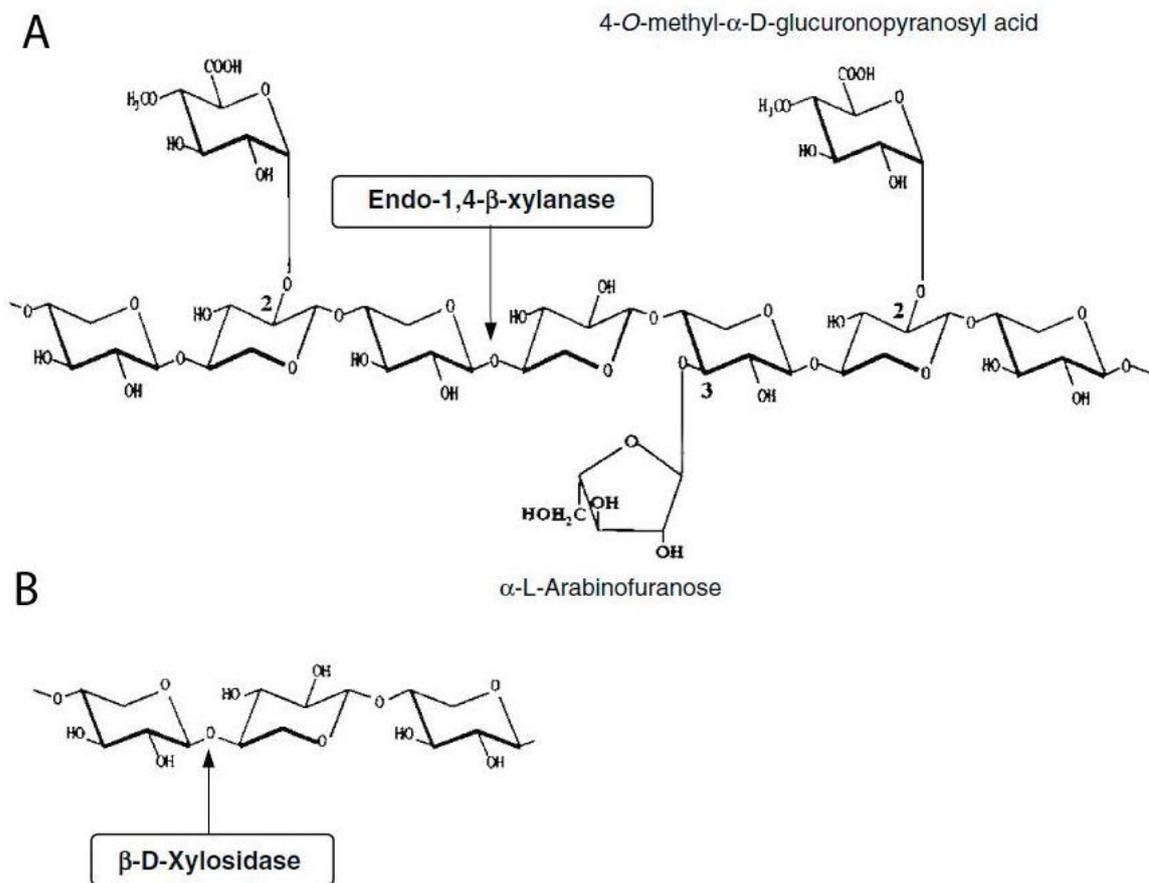
Como consequência da produção de etanol de primeira geração, 75 milhões de toneladas de bagaço de cana são gerados anualmente no país. Atualmente, 85% desse bagaço são utilizados para a geração de calor e/ou energia elétrica para a própria usina (STAMBUK et al., 2008). Sabe-se, no entanto, que o bagaço gerado pode ter outro destino: a produção de etanol de segunda geração (também chamado de etanol 2G ou etanol lignocelulósico). Países como Suécia, Estados Unidos e Japão têm investido fortemente em pesquisas que viabilizem a produção de etanol 2G a partir de diferentes fontes de biomassa lignocelulósica. O Brasil, por sua vez, de maneira singular, pode fazer o uso da biomassa subaproveitada presente no bagaço e na palha da cana-de-açúcar para aumentar sua produção de etanol sem que haja um aumento da área de plantio dessa gramínea. Em virtude da grande quantidade de açúcares fermentáveis que os constituem, tanto o bagaço quanto a palha provenientes da cana-de-açúcar podem promover um aumento de mais de 50% na quantidade de etanol obtida por tonelada de cana, considerando que os açúcares da biomassa em questão possam ser completamente viabilizados para uma fermentação com grau de eficiência em torno de 90% (GONÇALVES et al., 2005; PESSOA-JR et al., 2005; VAN MARIS et al., 2006).

O etanol 2G é dependente da fermentação dos açúcares que constituem a biomassa lignocelulósica, que é estruturada pela interação entre celulose, hemicelulose e lignina (MESHITSUKA, ISOGAI, 1996; HOWARD et al., 2003; HIMMEL et al., 2007). A celulose, polissacarídeo encontrado em maior abundância no tecido vegetal das plantas, é formada através da interação linear de monômeros de glicose unidos através de ligações glicosídicas do tipo β -1,4. A hemicelulose, segundo maior componente da biomassa em questão, possui estrutura variável de acordo com a espécie vegetal. Na maioria das hemiceluloses são encontradas hexoses (glicose, galactose, manose, ácido glicurônico) e pentoses (xilose, arabinose) formando uma estrutura linear majoritariamente composta por um açúcar principal unida lateralmente a resíduos de outros carboidratos. A lignina, por sua vez, é uma macromolécula composta pela polimerização de unidades fenil-propano formando uma cadeia estrutural muito complexa, fornecendo rigidez, suporte e

proteção contra ataques enzimáticos que possam desestruturar o tecido vegetal (POLIZELI et al., 2005; DASHTBAN et al.; 2009; PROMPT, 2012).

A composição heterogênea das hemiceluloses faz com que haja numerosas classificações deste composto na natureza. De forma geral, a maior classe de hemiceluloses são as xilanas, compostos encontrados em grandes quantidades em gramíneas como a cana-de-açúcar. As xilanas são geralmente caracterizadas pela presença de resíduos de arabinose ligados lateralmente a uma cadeia linear principal formada majoritariamente de monômeros de xilose unidos entre si através de ligações glicosídicas β -1,4 (Figura 1). Sendo assim, de forma resumida, a xilose é o carboidrato presente em maior quantidade na xilana, e conseqüentemente a pentose predominante encontrada no bagaço e na palha da cana-de-açúcar (POLIZELI, 2005).

Figura 1 - Estrutura da xilana



Fonte: Polizeli, 2005.

O processo de transformação da biomassa lignocelulósica em etanol requer, em relação à xilana, a cooperação de um grupo de enzimas que conduzem uma série de reações. Isso consiste em disponibilizar, através da hidrólise do polissacarídeo em questão, os monômeros de xilose, que, assim, devem ser transportados do meio extracelular para o meio intracelular. A primeira etapa desse processo se dá através das quebras das ligações glicosídicas β -1,4 entre resíduos de xilose, que são catalisadas por enzimas endo-1,4- β -xilanases (genericamente

denominadas xilanases) e β -xilosidases, conforme esquematizado na Figura 1 (BEG et al., 2001; COLLINS et al., 2004; POLIZELI et al., 2005, HAHN-HAGERDAL et al., 2001; DASHTBAN et al., 2009).

As enzimas endo-1,4- β -xilanases (Figura 1A) são inicialmente responsáveis pela desestruturação da hemicelulose em oligômeros de xilose com menor grau de polimerização. Subsequentemente, essas mesmas enzimas atacam novamente o substrato (dessa vez menos polimerizado), produzindo mono-, di- ou trissacarídeos de xilose. Os monossacarídeos oriundos dessa primeira etapa são preferencialmente transportados para o interior da célula, enquanto isso os di- e trissacarídeos são hidrolisados novamente por outro grupo de enzimas, as β -xilosidases (Figura 1B), até que estes também sejam convertidos em monossacarídeos de xilose que possam ser transportados para o interior da célula.

Uma vez dentro da célula, a xilose deve ser reduzida a xilitol, que por sua vez é oxidado a xilulose antes de seguir pela Via das Pentoses-Fosfato (PPP). Para que as células de leveduras, entretanto, possam fermentar eficientemente a xilose, é necessário haver um balanço redox nessas duas primeiras reações da metabolização da xilose, que são catalisadas pelas enzimas Xilose-redutase (XR) e Xilitol-desidrogenase (XDH) respectivamente. Enquanto esta última utiliza NAD^+ como coenzima (que, na reação é reduzida a NADH), a primeira pode fazer uso tanto da NADH quanto da NADPH (que, na reação, são oxidadas a NAD^+ ou a NADP^+), dependendo da isoenzima presente. Naquelas leveduras em que a XR utiliza uma coenzima diferente da XDH, passa a haver um desbalanço que, pela falta da reciclagem dessas, acaba por interromper a metabolização de xilose, acarretando num acúmulo de xilitol (TOIVOLA et al., 1984; RIZZI et al., 1989; JEFFRIES, ALEXANDER, 1990; STAMBUK et al., 2008). Isso termina dificultando a metabolização da xilose, fazendo com que as células de leveduras tenham dificuldade de consumi-la em velocidade suficiente para garantir um metabolismo fermentativo com o grau de eficiência desejado.

Atualmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microrganismo utilizado na produção de etanol de primeira geração. O grande sucesso dessa levedura durante a fermentação do caldo de cana deve-se a algumas de suas características especiais, dentre elas a capacidade de fermentar carboidratos eficientemente mesmo na presença de oxigênio e de tolerar: (1) as altas concentrações de etanol na fase final da fermentação; (2) os baixos níveis de pH do meio; (3) o estresse osmótico provocado pelas altas concentrações de açúcares; e, (4) a pressão hidrostática provocada pelo grande volume de líquido contido nas dornas de fermentação (LAGUNAS, 1979, 1986; LANDRY et al., 2006). Essa levedura também se destaca por estar entre os melhores fermentadores de glicose (MERICCO et al., 2007), carboidrato presente em maior quantidade na biomassa lignocelulósica. No entanto, como já citado anteriormente, a produção do etanol de segunda geração é dependente da completa hidrólise da xilana e da eficiente fermentação da xilose, e cepas selvagens de *S. cerevisiae*, além de serem incapazes de fermentar a xilose, também são incapazes de hidrolisar a xilana (STAMBUK et al., 2008; MATSUSHIKA et al., 2009a).

Por outro lado, diferentemente de *S. cerevisiae*, diversas espécies de leveduras, dentre elas algumas que já foram isoladas da microbiota brasileira, como *Cryptococcus laurentii*, *Sugiyamaella smithiae*, *Scheffersomyces stipitis* e *Spathaspora arborariae*, conseguem hidrolisar a xilana e/ou fermentar a xilose com diferentes graus de rendimento de etanol (CADETE et al., 2009; FERREIRA et al.,

2011; LARA et al., 2014). Essas leveduras, entretanto, não demonstram o mesmo desempenho fermentativo em comparação à *S. cerevisiae* em condições industriais. Sendo assim, diante dessas diferenças e conhecendo-se, como comentado acima, a elevada eficiência fermentativa de *S. cerevisiae* durante o consumo da glicose (carboidrato presente em maior quantidade nos hidrolisados de lignocelulose), diversos pesquisadores têm apontado a engenharia genética de *S. cerevisiae* – através da expressão heteróloga de genes que codifiquem enzimas que possibilitem a essa levedura a fermentação eficiente dos carboidratos que compõem a biomassa lignocelulósica – como a melhor alternativa para uma produção eficiente do etanol de segunda geração (LEANDRO et al. 2006, 2008; SALOHEIMO et al., 2007; HECTOR et al., 2008; KATAHIRA et al., 2008; MATSUSHIKA et al., 2008a, 2008b, 2009b, 2009c; BENGTSSON et al., 2009; RUNQUIST et al., 2009).

No entanto, alguns trabalhos recentes demonstraram que cepas da espécie de levedura *Dekkera bruxellensis* apresentavam rendimentos iguais ou superiores durante produção de etanol, em comparação com cepas industriais de *S. cerevisiae* (BETTIGA et al., 2009; BLOMQVIST et al., 2011; REIS et al., 2014). Além disso, as linhagens de *D. bruxellensis* mostraram-se robustas diante das mudanças de pH e temperatura e altamente tolerantes a presença de bactérias ácido-láticas, tornando-as assim um organismo extremamente resistente às condições adversas impostas no meio industrial.

Dessa forma, o presente trabalho apresenta a caracterização bioquímica de leveduras – isoladas de biomassa lignocelulósica em decomposição – com potencial para serem futuramente utilizadas na produção de etanol de segunda geração, seja pelo emprego direto de suas células no processo ou pela expressão heteróloga de suas enzimas em linhagens industriais de *S. cerevisiae*. Isso certamente contribuirá para a minimização das dificuldades impostas no processo de produção de etanol 2G, principalmente no que tange às questões de viabilidade econômica.

METODOLOGIA

Isolamento de leveduras e linhagens utilizadas

As leveduras utilizadas foram isoladas a partir de amostras de matéria vegetal em decomposição, obtidas no *Campus* Chapecó da Universidade Federal da Fronteira Sul 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. De cada amostra, foi separado 1,0 g de tecido vegetal para ser 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 xilana, xilose ou celobiose (o período compreendido entre a coleta e o inóculo não excedeu duas horas). Cada frasco foi incubado a 25°C por 3 a 10 dias sob agitação constante (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. Além dessas, somam-se as leveduras pertencentes a coleção do grupo de pesquisa do professor

Sérgio Luiz Alves Júnior, isoladas anteriormente no Parque Palmital e no Parque da Gruta de Nossa Senhora de Guadalupe, ambos na cidade de Chapecó.

Meios de cultura e crescimento celular

Para o cultivo das leveduras foram utilizados meios líquidos ricos ou mínimos contendo 20 g.L^{-1} de uma fonte de carbono, com pH ajustado para 5,0 através da adição de HCl (tabela 1).

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura utilizados.

Meio	Componentes (para 100 mL de meio)
Rico (YP)	<ul style="list-style-type: none"> – 1 g de Extrato de leveduras; – 2 g de peptona; – 2 g fonte de carbono (glicose) – Solução de HCl para ajuste do pH = 5,0 – Água destilada para completar 100 mL
Mínimo (SC)	<ul style="list-style-type: none"> – 0,67 g de Yeast Nitrogen Base – 2 g fonte de carbono (xilana, xilose ou glicose) – Solução de HCl para ajuste do pH = 5,0 – Água destilada para completar 100 mL

Para a verificação dos perfis de crescimento celular, as leveduras isoladas foram pré-cultivadas por 48 h em frascos Erlenmeyer com 1/5 do volume de meio líquido rico contendo 20 g.L^{-1} de glicose. Em seguida, as leveduras do pré-cultivo foram inoculadas (1/100 do volume final) em novos frascos Erlenmeyer com meio mínimo contendo, alternadamente, 20 g.L^{-1} de xilana, xilose ou glicose como fonte de carbono. As culturas foram incubadas a 28° C sob agitação de 160 rpm.

O crescimento celular foi determinado pela medida da densidade óptica – em espectrofotômetro, com feixe de 570 nm ($\text{DO}_{570\text{nm}}$) – em amostras a serem retiradas dos cultivos em tempos pré-estabelecidos. Uma alíquota de cada uma dessas amostras foi centrifugada (5 minutos a 3.000 rpm) e seu sobrenadante foi armazenado em microtubo para posterior determinação do consumo de carboidratos.

Determinação de glicose e xilose

A glicose, consumida durante os crescimentos celulares em meios contendo essa fonte de carbono, 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 reagiu com 1,0 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 xilose, ao longo dos crescimentos celulares, foi realizada através de uma adaptação, para microplacas de 96 poços (de fundo plano), do método colorimétrico de DNS descrito por MILLER (1959). Em cada poço das

microplacas, foram adicionados 25 μL de amostra (diluídas conforme necessidade, de modo que suas leituras estejam dentro da curva de calibração) e 25 μL 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 M NaOH). As curvas de calibração, com seis concentrações, na faixa de 0 a 2,0 g.L^{-1} de xilose, 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 e foram adicionados 330 μL de água em 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 xilose, foram calculadas com base na equação de reta gerada a partir da curva de calibração, utilizando as medidas de absorvância obtidas diretamente em planilhas do Microsoft® Excel.

Em virtude do elevado grau de polimerização da xilana, não foi determinada a concentração restante deste polissacarídeo ao longo dos crescimentos celulares que o utilizaram como fonte de carbono.

Determinação da atividade de hidrólise de xilana

A atividade de hidrólise de xilana foi determinada em duas etapas. Na primeira etapa, a atividade xilanase foi determinada em células crescidas até o início da fase exponencial de crescimento ($\text{DO}_{570\text{nm}} \sim 3,5$), em meios contendo xilana como fonte de carbono, e, na segunda etapa, ao fim do crescimento celular (72 h de incubação), tanto em células crescidas em meios contendo xilana como em células crescidas em meios contendo xilose como fonte de carbono. Para isso, no momento do ensaio, foram retiradas alíquotas de 1 mL dos cultivos, e as células foram centrifugadas por 5 minutos a 3.000 rpm. Subsequentemente, 100 μL de seus sobrenadantes 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 contendo os controles negativos foram fervidos a 100° C por 10 minutos). Em seguida, foram adicionados 300,0 μL de uma suspensão de 20 g.L^{-1} de xilana em tampão succinato-Tris 0,15 M pH 5,0 e os microtubos foram incubados por 30 minutos a 30°C ou a 50°C. Após a incubação, os tubos foram esfriados em banho de gelo para cessar a reação e em seguida congelados. Posteriormente, quantificou-se a concentração de açúcares redutores formados (mono-, di- ou trissacarídeos de xilose) através da mesma metodologia que utiliza o reativo DNS para a determinação de xilose. A atividade enzimática foi determinada em nmol de açúcar redutor formado por mL por minuto nas condições do ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hidrólise da xilana e a fermentação dos oligômeros e monômeros de xilose pelas leveduras são fatores limitantes na produção de etanol 2G. No intuito de encontrar espécies capazes de hidrolisar o polissacarídeo em questão, e, posteriormente, fermentar a xilose, foram isoladas leveduras de amostras de matéria vegetal em decomposição coletadas em dois locais. Primeiramente, no *Campus* Chapecó da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) e, posteriormente, na Unidade de Conservação da Floresta Nacional (FLONA) de Chapecó.

Na primeira coleta, no dia 05/07/2014, foram obtidos 32 isolados espalhados em 3 pontos distintos do *campus* universitário, enquanto que na segunda coleta, no dia 15/08/2014, foram obtidos 28 isolados de 4 pontos distintos no interior da unidade de conservação. Cada isolado recebeu um código único característico informando o local do isolamento, a fonte de carbono utilizada no isolamento, e o ponto de coleta do isolamento no interior de cada local. Desses 60 isolados, 4 cepas UFFS e 6 cepas FLONA foram randomicamente selecionadas para avaliação dos perfis metabólicos. Somam-se a esses, 2 isolados do Parque Palmital (PAL) e 3 isolados do Parque da Gruta Nossa Senhora de Guadalupe (NSG) pertencentes a coleção do grupo de pesquisa do Professor Sérgio Luiz Alves Júnior.

Após a fase de isolamento, foram realizadas análises de crescimento celular e consumo de carboidratos (glicose, xilose) das cepas selecionadas em meios mínimos. Os resultados obtidos a partir dos crescimentos celulares realizados em frascos Erlenmeyer, que permitiram a dosagem do consumo de açúcares durante o cultivo, estão apresentados nas Figuras 2 a 4.

Como pode ser observado nos gráficos apresentados nas Figuras 2 a 4, em meios contendo glicose como fonte de carbono (gráficos A), todas as linhagens, exceto a cepa PAL-5.3, apresentaram crescimento. Além disso, vale ressaltar a similaridade dos perfis de crescimento em glicose, com exceção das cepas UFFS-XI-2.3 (superior à média) e PAL-4.1a (inferior à média). Analisando os crescimentos com xilose como fonte de carbono (gráficos C), observamos que, além da cepa PAL-5.3, a cepa FLONA-CE-3.6 também não apresentou crescimento. Em relação ao consumo dos açúcares presentes nos meios (gráficos B e D das Figuras 2 a 4), pode-se observar a preferência por utilização de glicose em relação à xilose. Em todas as cepas que apresentaram crescimento, foi registrado o consumo total da glicose ao fim do tempo de cultivo – muitas delas inclusive consumiram toda a glicose presente no meio em menos de 24 h. Por outro lado, a xilose foi consumida mais vagarosamente, e, em muitos casos, ao fim do período de crescimento celular determinado, como nas cepas UFFS-XI-2.3, UFFS-XA-1.6, PAL-4.1a, NSG-2.5.1a, NSG-2.6.2a e NSG-2.10.1a, o açúcar em questão não foi totalmente metabolizado.

Apesar de não terem sido feitas dosagens de etanol, sabe-se que os rendimentos de leveduras utilizando a xilose como fonte de carbono são menores perante à utilização de glicose. Isso ocorre devido ao desvio da produção de etanol para a produção de xilitol ocasionada pela disponibilidade de oxigênio (TOIVOLA et al., 1984) e devido à velocidade de captação dos açúcares para o interior da célula, fazendo com que muitas leveduras optem por utilizar o açúcar na via respiratória ao invés de fermentá-lo (POSTMA et al, 1989).

O crescimento em meio mínimo contendo xilana, apresentado na Figura 5, demonstra que apenas 3 cepas (FLONA-XI-1.1, NSG-2.6.2a e PAL-4.1a) conseguiram utilizar o polissacarídeo como fonte de carbono para crescimento diante das condições impostas no experimento. Em se tratando de um polissacarídeo, sabe-se que a total degradação da xilana depende da expressão das enzimas endo-1,4- β -xilanasases e β -xilosidases, portanto, as cepas que não apresentaram crescimento em xilana possivelmente não contam com essas enzimas hidrolíticas. Entretanto, alguns desses mesmos microrganismos, em habitat natural, através da associação com fungos, bactérias e outras leveduras do nicho ecológico ao qual eles estão inseridos, conseguem utilizar os açúcares presentes na biomassa vegetal em decomposição, incluindo os hidrolisados de xilana (BAHDRA et al., 2008).

Figura 2 – Crescimento celular (A,C) e consumo de açúcares (B,D) de leveduras isoladas de amostras coletadas no *Campus* da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). As linhagens apresentadas foram cultivadas em meio mínimo contendo 20 g.L⁻¹ de glicose (A,B) ou xilose (C,D) como fonte de carbono.

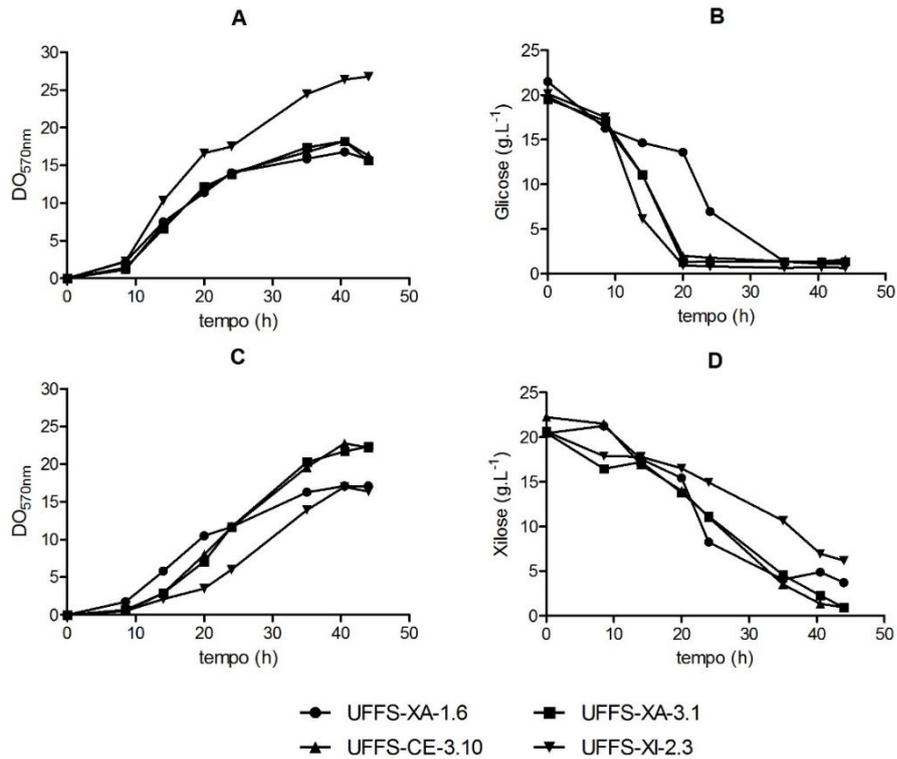


Figura 3 - Crescimento celular (A,C) e consumo de açúcares (B,D) de leveduras isoladas de amostras coletadas na Unidade de conservação da Floresta Nacional de Chapecó (FLONA). As linhagens apresentadas foram cultivadas em meio mínimo contendo 20 g.L⁻¹ de glicose (A,B) ou xilose (C,D) como fonte de carbono.

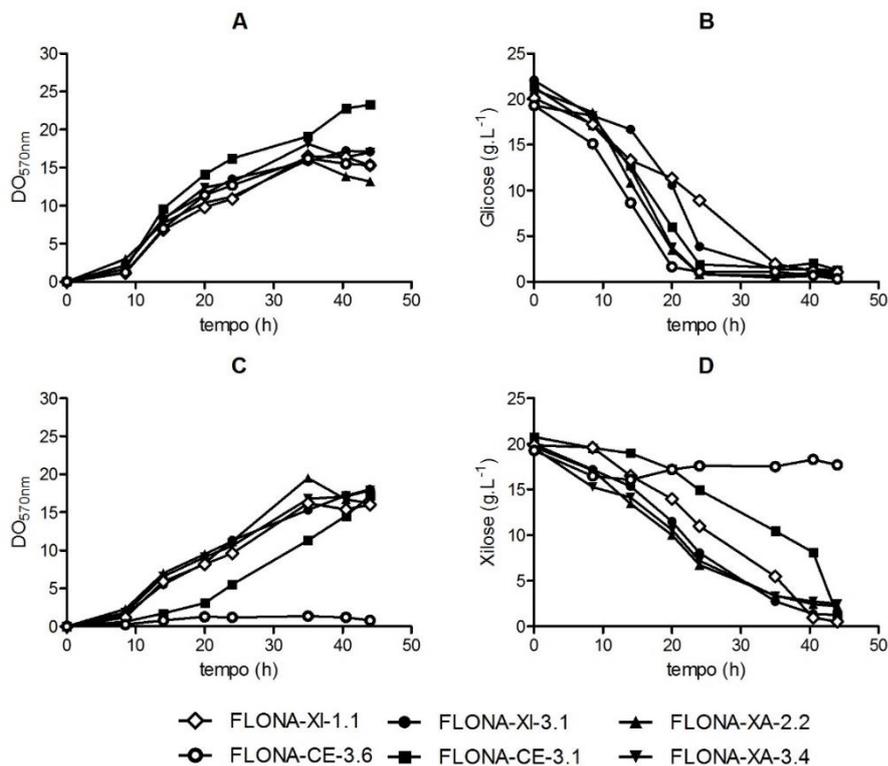


Figura 4 - Crescimento celular (A,C) e consumo de açúcares (B,D) de leveduras isoladas de amostras coletadas no Parque Palmital (PAL) e no Parque da Gruta de Nossa Senhora de Guadalupe (NSG). As linhagens apresentadas foram cultivadas em meio mínimo contendo 20 g.L⁻¹ de glicose (A,B) ou xilose (C,D) como fonte de carbono.

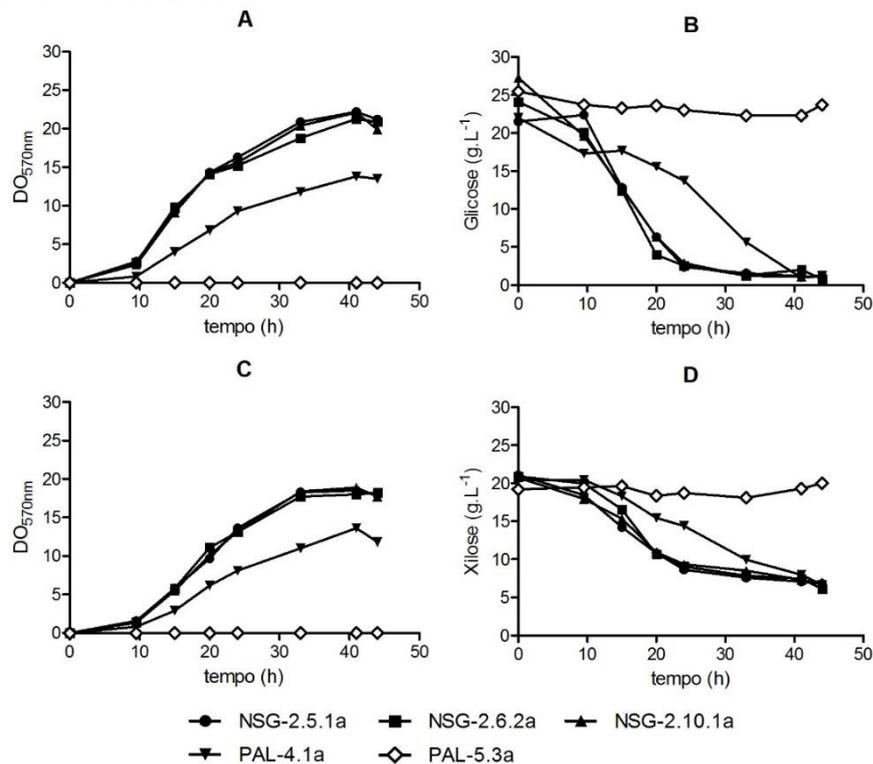
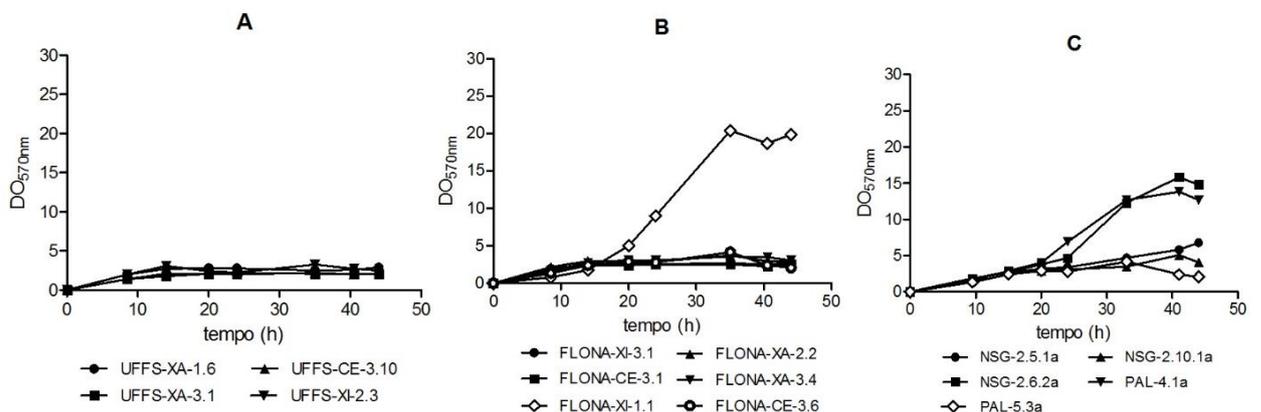


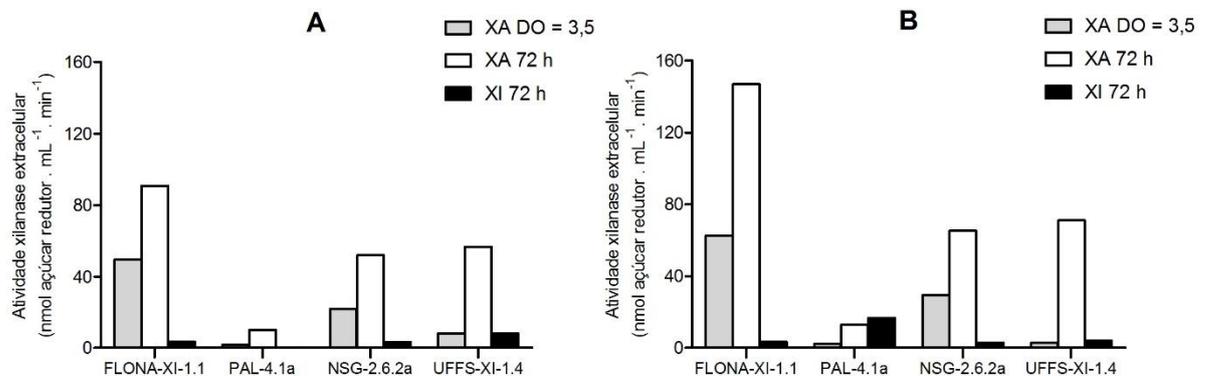
Figura 5 - Crescimento celular (A,B,C) de leveduras isoladas em meios contendo Xilana como fonte de carbono.



Após a análise do crescimento celular em xilana, foram selecionadas as cepas que apresentaram resultados positivos de consumo do polissacarídeo para determinação da atividade xilanase. Além dessas, uma outra cepa (UFFS-XI-1.4), que sabidamente havia apresentado crescimento em placas contendo xilana como fonte de carbono, também foi utilizada. Essas análises correspondem ao perfil de atividade extracelular xilanolítica de células crescidas em xilose e xilana como indutor da expressão enzimática. As análises foram efetuadas a 30° C (Figura 6A) e a 50° C (Figura 6B), correspondente à temperatura ótima para fermentação e a

temperatura ótima para hidrólise (LARA et al.,2014). Os resultados de atividade enzimática são dados em nmol de açúcar redutor formado por mL a cada minuto.

Figura 6 - Atividade xilanase extracelular apresentada por leveduras crescidas em meios sintéticos contendo 20 g.L⁻¹ de xilana (no início da fase exponencial – barras cinzas –, ou após 72 horas de crescimento – barras brancas) ou 20 g.L⁻¹ de xilose (após 72 horas de crescimento – barras pretas) como fonte de carbono.

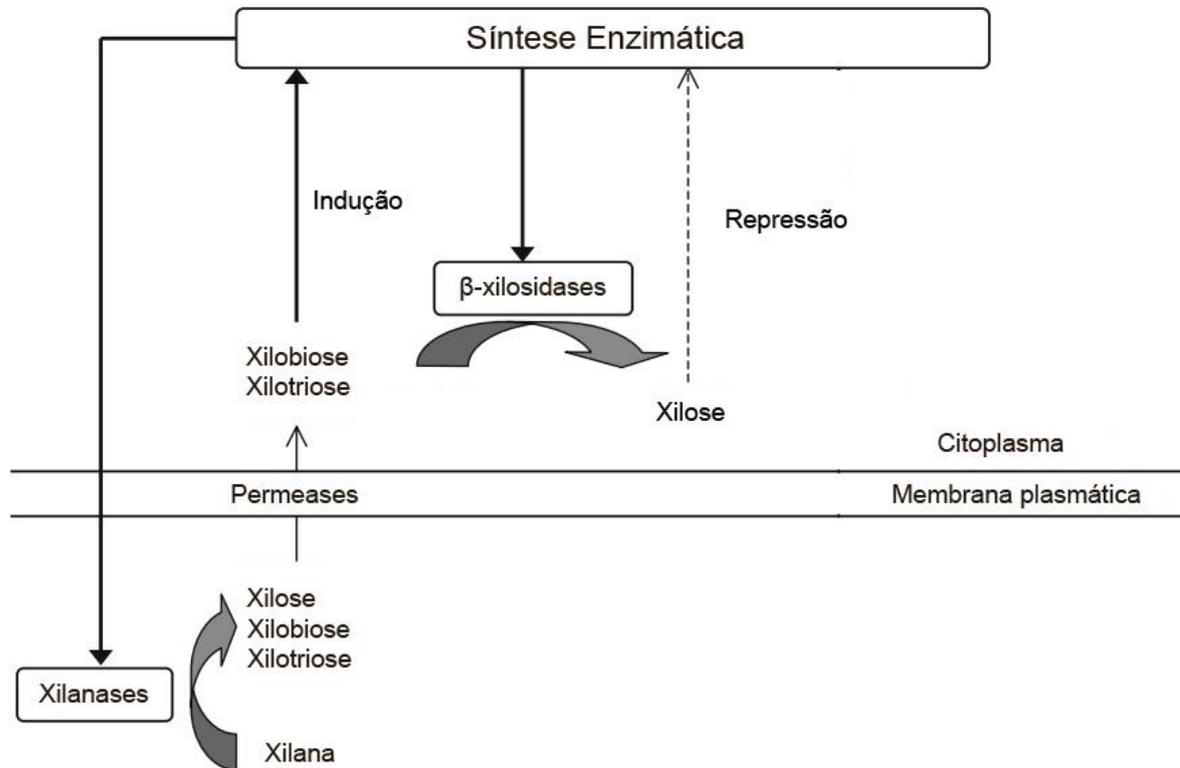


Conforme demonstram os resultados, a linhagem FLONA-XI-1.1 foi a que apresentou maior atividade enzimática entre todas as cepas analisadas. Observa-se que o aumento de temperatura de 30° C (Figura 6A) para 50° C (Figura 6B) ocasionou um aumento expressivo na atividade de hidrólise da xilana por esta cepa. Nas demais linhagens, a mudança de temperatura não teve o mesmo grau de influência sobre a atividade enzimática, o que pode sugerir que o pH ou a temperatura ótima de hidrólise dessas cepas possa vir a ser diferente das condições impostas no experimento (POLIZELI, 2005).

Como pode ser observado nos gráficos da Figura 6, foram registrados maiores níveis de atividade enzimática nas células crescidas em xilana em relação a células crescidas em xilose, o que demonstra que a xilana, possivelmente, é um indutor para a síntese enzimática de xilanases. Esse efeito foi questionado por muito tempo por alguns autores (BIELY, 1985; KULKARNY et al., 1999), devido ao fato de que macromoléculas como a xilana não conseguem manter contato direto com o sítio de indução de expressão gênica localizado no interior das células a ponto de desencadear a síntese enzimática, portanto, macromoléculas não poderiam ser consideradas indutores gênicos. No entanto, sabe-se que após a hidrólise inicial da xilana através da atividade basal das xilanases constitutivas, geram-se oligossacarídeos de xilose - principalmente xilobiose e xilotriose – que por sua vez são transportados com a ajuda de permeases para o interior da célula, onde eles engatilham a transcrição dos genes responsáveis pela produção de endo-1,4-β-xilanases e β-xilosidases (Figura 7). Além disso, alguns autores defendem que a xilobiose é o principal indutor da síntese de ambas as enzimas (HALTRICH et al., 1996; SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997, POLIZELI et al, 2005). De fato, os resultados obtidos corroboram este indicativo, tendo em vista que, na fase final de crescimento, onde a presença de oligossacarídeos é efetivamente maior do que na fase inicial (devido a polimerização da xilana), os dados indicam uma maior expressão dessas

enzimas, haja vista a maior atividade xilanase apresentada após 72 h de cultivo celular.

Figura 7 - Representação esquemática da regulação do complexo xilanolítico envolvendo as xilanases e as β -xilosidases.



Fonte: Polizeli, 2005.

Além disso, observando os gráficos da figura 6, os resultados sugerem que na maioria das linhagens crescidas em xilose, exceto na linhagem PAL-4.1a (figura 6B), a expressão de xilanases foi inibida – ou ao menos não foi induzida – mesmo após 72 h de crescimento celular. Não há um consenso na literatura sobre a indução ou repressão da produção de enzimas xilanolíticas pela ação da xilose (FLORES et al., 1996; KULKARNY et al., 1999; POLIZELI et al., 2005), todavia, em concordância com os dados apresentados no presente trabalho, os resultados de outros pesquisadores apresentam várias espécies que possuem inibição da atividade xilanolítica devido a presença de xilose (BIELY, 1985; KULKARNY et al., 1999).

Ainda com base nos resultados obtidos através da análise da atividade xilanolítica, verificou-se que a cepa PAL-4.1a apresentou um comportamento anormal com a mudança de temperatura do ensaio enzimático. Esperar-se-ia um aumento ou decréscimo proporcional na atividade xilanase com a variação da temperatura de 30°C para 50°C, no entanto, a atividade enzimática de células crescidas em xilana, que se apresentava maior que a de células cultivadas em xilose, no ensaio a 30°C (Figura 6A), foi inferior quando analisada em 50°C (Figura 6B). É possível, portanto, que isoenzimas, expressas em condições diferentes e com

diferentes temperaturas ótimas de atuação, possam estar relacionadas ao perfil observado. Nesse sentido, a enzima expressa em células crescidas em xilana pode ser diferente daquela expressa em células cultivadas em xilose.

Além de conseguirem utilizar a xilana, a glicose e a xilose como fonte de carbono, algumas cepas utilizadas no presente trabalho também apresentaram crescimento em celobiose (dados não apresentados – dos Santos et al., manuscrito em preparação), indicando que as mesmas têm potencial para serem utilizadas para produção de etanol 2G. Alguns autores têm sugerido a integração dos processos de produção de etanol de primeira e segunda geração através da utilização de um microrganismo que consiga fermentar diferentes açúcares presentes na biomassa lignocelulósica, resultando em um maior rendimento de etanol, menor demanda energética e menor custo de produção (TOIVOLA et al., 1984; HAHN-HAGERDAL et al., 2001; GALBE, ZACCHI, 2002).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos certamente apontam que algumas leveduras isoladas podem vir a ser utilizadas em estudos que busquem identificar os genes que codifiquem as enzimas responsáveis pela metabolização dos carboidratos em questão ou que avaliem a aplicabilidade direta desse organismo em condições industriais ou semi-industriais. Com isso, será possível verificar o verdadeiro potencial de uso dessas leveduras na produção do etanol 2G, seja através do seu uso direto como microrganismo fermentador, da expressão heteróloga de suas enzimas em cepas de *S. cerevisiae*, ou da aplicação de suas enzimas xilanolíticas, nesse caso para promover hidrólise prévia da hemicelulose e permitir a fermentação do hidrolisado subsequentemente. Vale ressaltar também, ainda como perspectivas futuras, que seria interessante a identificação taxonômica dos isolados, no intuito de promover o aumento do conhecimento da microbiota local.

XYLAN HYDROLYSIS AND XYLOSE METABOLIZATION BY YEASTS ISOLATED FROM DECAYED WOOD

ABSTRACT

Hydrolysis of lignocellulosic compounds, such as xylan, and xylose metabolism, the main product of this hydrolysis, are limiting factors for the production of second generation ethanol. In order to better understand these two steps, the present study aimed to isolate and to characterize yeasts belonging to the local microbiota. We analyzed 16 strains, which were isolated at Universidade Federal da Fronteira Sul, Conservation Unit of the National Forest Chapecó, Nossa Senhora de Guadalupe Grotto Park and Palmital Park, located in the city of Chapecó. Among the analyzed strains, 14 of them were able to grow on media with glucose, 13 were able to grow on xylose and 3 on xylan. The glucose was the fastest carbon source to be consumed by the cells. The xylanase activities, induced by xylan or xylose, were also analyzed. Our results demonstrated that the enzyme activity in cells grown on xylan is higher than in cells grown on xylose, suggesting that xylose does not induce the enzymatic activity and can act as a repressor of this enzyme expression. Furthermore, our data also suggest that the activity of xylanases is higher in the final stages of cell growth, indicating that the products of enzymatic hydrolysis are more powerful inducers of the gene expression. The present study also enabled us to identify strains which can contribute to the optimization of the second generation ethanol production.

Keywords: Yeasts. Lignocellulosic Biomass. 2G Ethanol. Xylan. Xylose.

REFERÊNCIAS

- BHADRA B., RAO R. S.; SINGH P. K.; SARKAR P. K.; SHIVAJI S. Yeasts and yeast-like fungi associated with tree bark: diversity and identification of yeasts producing extracellular endoxylanases. **Curr. Microbiol.** 56:489–494, 2008.
- BEG, Q. K.; KAPOOR M.; MAHAJAN L.; HOONDAL G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56, 326–338, 2001.
- BENGTSSON, O.; HAHN-HAGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Biofuels** 2: 9, 2009.
- BETTIGA, M.; BENGTSSON, O.; HAHN-HAGERDAL, B.; GORWA -GRAUSLUND, M.F. Arabinose and xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fungal pentose utilization pathway. **Microb Cell Fact** 8: 40, 2009.
- BIELY P. Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnol** 3:286–290, 1985.
- BLOMQUIST J.; SOUTH E.; TIUKOVA L.; MOMENI M. H.; HANSSON H.; STAHLBERG J.; HORN S. J.; SCHNURER J.; PASSOTH V. Fermentation of lignocellulosic hydrolysate by the alternative industrial ethanol yeast *Dekkera bruxellensis*. **Applied Microbiology** 53: 73-78, 2011.
- CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D. L.; STAMBUK, B. U.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M-A.; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Res.** 9: 1-5, 2009.
- COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.** 29: 3-23, 2004.
- DÁRIO, M. G. **Análise molecular do metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção industrial de álcool combustível.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 107p, 2007.
- DASHTBAN, M; SCHRAFT, H; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residuos; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences** 5: 578-595, 2009.
- FERREIRA, A. D.; MUSSATTO, S. I.; CADETE, R. M.; ROSA, C. A.; SILVA, S. S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast** 28: 547-554, 2011.
- FLORES, M. E.; PEREA, M.; RODRÍGUEZ, O.; MALOVÁEZ, A.; HUITRÓN, C.; Physiological studies on induction and catabolite repression of β -xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* sp. CH-M-1035. **Journal of Biotechnology** 49: 179-187, 1996.

GALBE M.; ZACCHI G. A review of the production of ethanol from softwood. **Appl Microbiol Biotechnol** 59:618–628, 2002.

GONÇALVES, A. R.; BENAR, P.; COSTA, S. M.; RUZENE, D. S.; MORYIA, R. Y.; LUZ, S. M.; FERRETTI, L. P. Integrated processes for use of pulps and lignins obtained from sugarcane bagasse and straw. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 121-124: 821-826, 2005.

HAHN-HAGERDAL, B. ; KARHUMAA, K.; JEPSSON, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae* **Adv Biochem Engin/Biotechnol** 108: 147–177, 2001.

HALTRICH D.; NIDETZKY B.; KULBE K. D.; STEINER W.; ZUPANCIC S. Production of fungal xylanases. **Bioresour. Technol.** 58:137–161, 1996.

HECTOR, R. E.; QURESHI, N.; HUGHES, S. R.; COTTA, M. A. Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. **Appl Microbiol Biotechnol.** 80: 675-684, 2008.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science** 315: 804-807, 2007.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; VAN RENSBURG, E. L. J.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **Afr. J. Biotechnol.** 2: 602-619, 2003.

JEFFRIES, T. W., ALEXANDER, M. A. Production of ethanol from xylose by *Candida shehatae* grown under continuous or fed-batch conditions. In: KIRK, T. K.; CHANG, H-M. **Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1990.

KATAHIRA S.; ITO M.; TAKEMA H.; FUJITA Y.; TANINO T.; TANAKA T.; FUKUDA H.; KONDO A. Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter Sut1. **Enzyme Microb Technol** 43: 115-119, 2008.

KULKARNI N.; SHENDYE A.; RAO M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS. Microbiol. Rev.** 23:411–456, 1999.

LAGUNAS, R. Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. **Mol. Cel. Biochem.** 27: 139-146, 1979.

LAGUNAS, R. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast** 2: 221-228, 1986.

LANDRY, C. R.; TOWNSEND, J. P.; HARTL, D. L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Ecol.** 15: 575-591, 2006.

LARA et al. Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**. **105:1107-1119, 2014.**

LEANDRO M. J.; SPENCER-MARTINS, I.; GONÇALVES, P. The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/ xylose facilitator. **Microbiology** 154: 1646-1655, 2008.

LEANDRO, M. J.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. **Biochem. J.** 395: 543-549, 2006.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; & SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 84: 37-53, 2009a.

MATSUSHIKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K.; INOUE, H. MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Expression of protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase increase ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 81: 243–255, 2008a.

MATSUSHIKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, and xylulokinase. **J. Biosci. Bioeng.** 105: 296–299, 2008b.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresour Technol.** 100: 2392-2398, 2009b.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K.; SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production by a recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain with a genome-integrated NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase gene. **Appl Environ Microbiol.** 75: 3818-3822, 2009c.

MERICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS J.** 274: 656-666, 2007.

MESHITSUKA, G.; ISOGAI, A. Chemical structure of cellulose, hemicellulose, and lignin. In: Chemical Modification of Lignocellulosic Materials. ed. **DNS Hon, Marcel Dekker, Inc., New York**, p. 11-34, 1996.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31 426-429, 1959.

PESSOA-JR, A.; ROBERTO, I. C.; MENOSSI, M.; SANTOS, R. R.; FILHO, S. O.; PENNA, T. C. V. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. **Appl. Biochem. Biotech.** 121-124: 59-70, 2005.

POLIZELI, M. L.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCEI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from Fungi: properties and industrial applications **Appl Microbiol Biotechnol** 67: 577-591, 2005.

POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 468-477, 1989.

PROMPT, A. H. **Análise da fermentação de glicose e xilose por leveduras *Spathaspora* isoladas de madeira em decomposição**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 86p, 2012.

REIS A. L. S.; SOUZA R. F. R.; TORRES R. R. N. B.; LEITE F. C. B.; PAIVA P. M. G.; VIDAL E. E.; MORAIS-JR M. A. Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. **SpringerPlus** 3:38, 2014.

RIZZI, M.; HARWART, K.; ERLEMANN, P.; BUI-THANH, N.; DELLWEG, H. Purification and Properties of the NAD⁺-Xylitol Dehydrogenase from the *Pichia stipitis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering** 67: 20-24, 1989.

RUNQUIST, D.; FONSECA, C.; RÅDSTRÖM, P.; SPENCER-MARTINS, I.; HAHN-HÄGERDAL, B. Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol.** 82:123-130, 2009.

SALOHEIMO, A.; RAUTA, J.; STASYK, O. V.; SIBIRNY, A. A.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. **Appl Microbiol Biotechnol.** 74: 1041-1052, 2007.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BOM, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **J. Sci. Ind. Res.** 67: 918-926, 2008.

SUNNA A., ANTRANIKIAN G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit Rev Biotechnol** 17(1):39–67, 1997.

TOIVOLA A.; YARROW D.; VAN DEN BOSCH E.; VAN DIJKEN J. P.; SCHEFFERS W. A. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. **Appl Environ Microbiol** 47:1221–1223, 1984.

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

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnol.** 17: 482-487, 1999.

WU, L.; BIRCH, R. G. Doubled sugar content in sugarcane plants modified to produce a sucrose isomer. **Plant Biotechnol. J.** 5: 109-117, 2007.

ZANIN, G. M.; SANTANA, C. C.; BOM, E. P. S.; GIORDANO, R. C. L.; DE MORAES, F. F.; ANDRIETTA, S. R.; CARVALHO NETO, C. C.; MACEDO, I. C.; FO, D. L.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Brazilian bioethanol program. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 84-86: 1147-1161, 2000.