

Revisão: leveduras utilizadas na produção de etanol de segunda geração

ALMEIDA, de Souza Cássio
NASCIMENTO, Daniela Defávori do

Resumo

Os biocombustíveis como o etanol e etanol de segunda geração podem ser produzidos por meio da metabolização de açúcares hexoses e pentoses, respectivamente, e surgiram como alternativas para mitigar os efeitos poluentes da combustão dos combustíveis fósseis, como o caso da gasolina. Nesse contexto, as pesquisas buscando microrganismos capazes de fermentar as pentoses presentes nas diversas biomassas lignocelulósicas envolvem práticas de recombinação de linhagens que apresentam características desejáveis para serem aprimoradas, como a capacidade de fermentar D-xilose em etanol ou tolerância por compostos inibidores da metabolização, como o ácido acético, o qual causa grande impacto no consumo da D-xilose, e utilizam a engenharia genética para adicionar genes que possam auxiliar as leveduras durante o processo fermentativo. Os genes SUT4 e SUT6 são transportadores de açúcares, incluindo pentoses, e são provenientes da levedura *Spathaspora arboriae*, ou o gene HAA1, identificado como responsável por garantir resistência ao ácido acético, o gene foi adicionado na levedura *Saccharomyces cerevisiae* GSE-16 T18, e conseguiu realizar produção de etanol em altas concentrações de ácido acético (15 g/L), mostrando a eficiência do novo gene na fermentação da levedura em ambiente estressante. Essa revisão também aborda outros gêneros de leveduras conhecidos por possuírem a capacidade de fermentar as pentoses, como os gêneros *Pichia* e *Spathaspora*, ambos os gêneros possuem diversas espécies que se tornaram foco de estudos que buscaram avaliar suas respectivas eficiências e produtividades fermentativas. É notório que o desenvolvimento de novos microrganismos geneticamente modificados se mostra ser a chave para que seja possível alcançar eficiência na metabolização da D-xilose em etanol lignocelulósico, mesmo que em condições adversas para as leveduras.

Palavras-chave: Engenharia genética, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia spp.*, *Spathaspora spp.*, linhagem recombinante

Abstract

Biofuels such as ethanol and second-generation ethanol can be used through the metabolization of hexoses and pentoses sugars, respectively, they have emerged as alternatives to mitigate the polluting effects of fossil fuel, such as gasoline. In this context, studies that are trying to find microorganisms capable of fermenting pentoses present in several lignocellulosic biomass, involve practices of recombining lines that present desirable characteristics for improvements, such as the ability to ferment D-xylose in ethanol or tolerance for metabolism inhibiting compounds, such as acetic acid, which has a major impact on D-xylose consumption during the process. It is also reported the use of genetic engineering to add genes that can help yeast during the fermentation process. The SUT4 and SUT6 genes are sugar transporters, which includes pentoses, and it is obtained from the yeast *Spathaspora arboriae*. The HAA1 gene was identified as responsible for ensuring resistance to acetic acid, the gene was added in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* GSE-16 T18, and managed to produce ethanol in high acetic acid concentrations (15 g/L), showing the efficiency of the new gene in fermenting yeast while in a stressful environment. This review also addresses other genus of yeasts known for having the ability to ferment pentose, such as the genera *Pichia* and *Spathaspora*, both genres have several species that have become the focus of studies that sought to evaluate their respective fermentative efficiencies and productivity. It is well known that the development of new genetically modified microorganisms is shown to be the key for achieving efficiency in the metabolism of D-xylose present in lignocellulosic ethanol, even under adverse conditions for yeasts.

Key words: Genetic engineering; *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia spp.*, *Spathaspora spp.*; recombinant strain.

Resumen

Los biocombustibles como el etanol y el etanol de segunda generación se pueden producir mediante la metabolización de azúcares hexosas y pentosas, respectivamente, y han surgido como alternativas para mitigar los efectos contaminantes de la combustión de combustibles fósiles, como la gasolina. En este contexto, la investigación que busca microorganismos capaces de fermentar las pentosas presentes en las diversas biomásas lignocelulósicas implica prácticas de recombinación de cepas que tienen características deseables para mejorar, como la capacidad de fermentar D-xilosa en etanol y la tolerancia a compuestos inhibidores del metabolismo, como ácido acético, que tiene un gran impacto en el consumo de D-xilosa, y utiliza ingeniería genética para agregar genes que pueden ayudar a las levaduras durante el proceso de fermentación. Los genes SUT4 y SUT6 son transportadores de azúcar, incluidas las pentosas, y provienen de la levadura *Spathaspora arboriae*, o el gen HAA1, identificado como responsable de garantizar la resistencia al ácido acético, el gen se agregó en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* GSE-16 T18, y logró producir etanol en altas concentraciones de ácido acético (15 g/L), mostrando la eficiencia del nuevo gen en la fermentación de levadura en un ambiente estresante. Esta revisión también aborda otros géneros de levadura que se sabe que tienen la capacidad de fermentar pentosa, como los géneros *Pichia* y *Spathaspora*, ambos géneros tienen varias especies que se han convertido en el foco de estudios que buscaron evaluar sus respectivas eficiencias fermentativas y productividad. Es bien sabido que el desarrollo de nuevos microorganismos modificados genéticamente es la clave para lograr la eficiencia en el metabolismo de la D-xilosa en etanol lignocelulósico, incluso en condiciones adversas para las levaduras.

Palabras clave: Ingeniería genética; *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia spp.*, *Spathaspora spp.*; cepa recombinante.

INTRODUÇÃO

Desde que se iniciou a procura por combustíveis provenientes de fontes alternativas de energia, os biocombustíveis como etanol, biodiesel e biogás receberam grande atenção, com objetivo de gradativamente substituir e mitigar as emissões dos gases de efeito estufa (GEE) proveniente da combustão de combustíveis fósseis, como o caso da gasolina, têm-se observado uma vasta gama de estudos buscando produzir esses biocombustíveis de forma mais eficiente e menos custosa. Esses biocombustíveis podem ser de primeira (1G), segunda (2G) e terceira geração (3G), sendo diferenciados de acordo com a fonte da matéria-prima a ser fermentada.

O etanol 1G é produzido por meio da fermentação de açúcares hexoses (C6), e recebem esse nome por possuírem 6 carbonos em sua molécula. No Brasil, o microrganismo responsável por fermentar esses açúcares em etanol é a levedura consolidada *Saccharomyces cerevisiae*, e os açúcares são obtidos da cana-de-açúcar, diferente dos Estados Unidos que realizam a hidrólise do amido de milho para realizar a fermentação a etanol. De acordo com a CONAB, em 2019 o Brasil alcançou a marca de 33,14 bilhões de litros de etanol produzidos, mostrando um aumento de 5,9 bilhões de litros, representando 21,7% a mais em relação ao período anterior e foi registrado como maior índice de produção desde a safra 2015/16 (CONAB, 2019).

Por conta da produção de etanol 1G gerar resíduos durante o processo, como o bagaço e palha de cana-de-açúcar, estudos foram iniciados para tentar reaproveitar os açúcares presentes nesses resíduos. Foi verificado que eles possuíam grande teor de material lignocelulósico, com açúcares de 5 carbonos chamados pentoses (C5), os quais a levedura *S. cerevisiae* é naturalmente incapaz de fermentar a etanol. No caso do etanol proveniente de biomassa lignocelulósica, ele passa a ser chamado de etanol de segunda geração (E2G), sendo uma alternativa para o mercado pois a obtenção de sua matéria-prima não compete com o espaço da cultura de cana-de-açúcar.

Diante disso, pesquisas envolvendo microrganismos capazes de fermentar pentoses a etanol vêm sendo realizadas, buscando caminhos na engenharia genética para adição de genes que configurem tal capacidade, com o objetivo de construir linhagens tolerantes aos inibidores produzidos pelo processo e que mesmo assim apresentem eficiência na produção de etanol 2G. Este trabalho tem como objetivo apresentar estudos que buscam leveduras capazes de fermentar os açúcares C5, bem como seu desempenho na fermentação em comparação com outras linhagens de leveduras do mesmo gênero e de gêneros diferentes, sejam ela geneticamente modificadas ou não.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Biocombustíveis

Os biocombustíveis surgiram como alternativa à utilização de combustíveis fósseis (não renováveis), como o petróleo, carvão e gás natural. A iniciativa foi desencadeada em função da primeira Crise do Petróleo, na década de 1970, a qual forçou os países a procurarem meios de implantações de políticas a favor da utilização de fontes alternativas de energia menos poluentes, principalmente contra a emissão de gases poluentes resultantes da queima de combustíveis derivados do petróleo, como o caso da gasolina (LEITE; LEAL, 2007). Na época, o Brasil era fortemente dependente da importação de petróleo, neste contexto, em 1975 foi criado o Proálcool-Programa Nacional do Álcool, como estratégia para abastecer o mercado interno do país com combustíveis alternativos, utilizando o álcool anidro para mistura junto à gasolina, assim, se tornando menos poluente e aos poucos combatendo a dependência do petróleo estrangeiro (BRASIL; RODRIGUES, 2010).

Em função de uma nova crise do petróleo em 1979, incentivou-se a pesquisa e produção de carros movidos a etanol, proporcionando grande avanço na indústria canavieira (LANZOTTI, 2000).

A cultura da cana-de-açúcar se tornou fundamental no Brasil, mesmo com o fim do Proálcool em meados da década de 1980, deixando de existir como programa do governo de incentivo à produção de álcool combustível. Porém, as políticas de apoio a produção de cana-de-açúcar e da utilização do álcool combustível foram mantidas, em função do constante aumento da produção por parte da indústria automobilística de veículos movidos à álcool (CORTEZ et al., 2016).

Classificação dos biocombustíveis

Os biocombustíveis são divididos em dois grupos, convencionais e avançados, e são diferenciados de acordo com sua fonte de obtenção. Os biocombustíveis convencionais são conhecidos como de primeira geração, sua fonte de produção são as culturas alimentares, como milho, soja, cana-de-açúcar etc. Os avançados, por sua vez, são os de segunda e terceira geração. Os biocombustíveis 2G são obtidos de culturas não alimentares, como resíduos agrícolas e florestais, enquanto os biocombustíveis 3G são obtidos por meio da utilização de algas (CGEE 2018). Podem ser citados como biocombustíveis 1G o biodiesel, produzido pelo processamento de óleo vegetal, gordura animal, e o etanol, podendo ser obtido pelo processamento de cana-de-açúcar, milho, beterraba etc. O etanol de segunda geração, por sua vez, é produzido por meio da

hidrólise da biomassa lignocelulósica, a qual pode ser obtida de diferentes fontes de matéria-prima (CARVALHO et al., 2013; CGEE, 2018).

Etanol

O etanol (C_2H_5OH), também chamado de álcool etílico, é um composto orgânico oxigenado. É caracterizado como um combustível líquido, possui elevado teor de oxigênio em sua composição, sendo aproximadamente 35% em relação à massa total, assim, é realizada uma combustão mais limpa, resultando melhor desempenho dos motores e maior redução na emissão de gases poluentes, ainda mesmo quando misturado à gasolina, atuando como aditivo (BNDES; CGEE, 2008).

Para produzir o etanol é necessário que ocorra a ação de microrganismos que atuam na conversão da biomassa vegetal em etanol. O processo de conversão pode ser resumido em três etapas, são elas: (1) conversão da biomassa em açúcares passíveis de fermentação; (2) fermentação dos açúcares em etanol; (3) separação por destilação e purificação do etanol. A etapa de destilação é responsável por retirar grande parte da água na mistura, resultando em aproximadamente 95% de etanol puro, chamado então de etanol hidratado. Quando o restante da água é retirado, obtém-se o etanol anidro, sendo este utilizado como aditivo na mistura com gasolina (ZUURBIER; VOOREN, 2008 apud SILVA; GOMES; NASCIMENTO, 2019).

Seu uso como combustível ocorre de duas maneiras, na forma hidratada, para automóveis movidos exclusivamente a álcool, ou na forma anidra, sendo estabelecido, em 2015, a adição de 27% de álcool anidro na gasolina (BRASIL, 2015).

De acordo com a CONAB, em 2019 o Brasil alcançou a marca de 33,14 bilhões de litros de etanol produzidos, mostrando um aumento de 5,9 bilhões de litros, representando 21,7% a mais em relação ao período anterior. Esse índice de produção de etanol é o maior já registrado para o país, superando o maior índice até então de 30,46 milhões de litros na safra 2015/16 (CONAB, 2019).

Porém, em 2020, o setor sucroalcooleiro sofreu grande impacto devido à crise do novo Covid-19. No mês de abril, o Centro Brasileiro de Infraestrutura (CBIE) realizou o décimo corte no preço da gasolina no ano, chegando a custar R\$ 0,99 por litro, registrando o menor valor desde 2005, quando era vendida a R\$1,94 o litro. Essa alteração no preço da gasolina impactou diretamente o etanol, sendo vantajoso apenas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso e Goiás. Atribui-se a perda de competitividade do etanol aos sucessivos cortes no preço da gasolina em resposta à queda das cotações internacionais do petróleo. Além dos cortes, a ANP

autorizou as distribuidoras de combustíveis a reduzirem a compra de etanol anidro, sem riscos de punição, em razão da queda da demanda por gasolina no país (ANP; CBIE; UDOP, 2020).

Fermentação Etanólica

A fermentação etanólica é definida pela ação de leveduras, principalmente a levedura *S. cerevisiae*, a qual atua nos açúcares passíveis de fermentação em uma solução. É denominada como um processo biológico no qual há o crescimento de leveduras por meio de reações de oxidação parcial, a qual também é utilizada para produção do álcool e gás carbônico (LIMA; MARCONDES, 2002; SILVA et al., 2007).

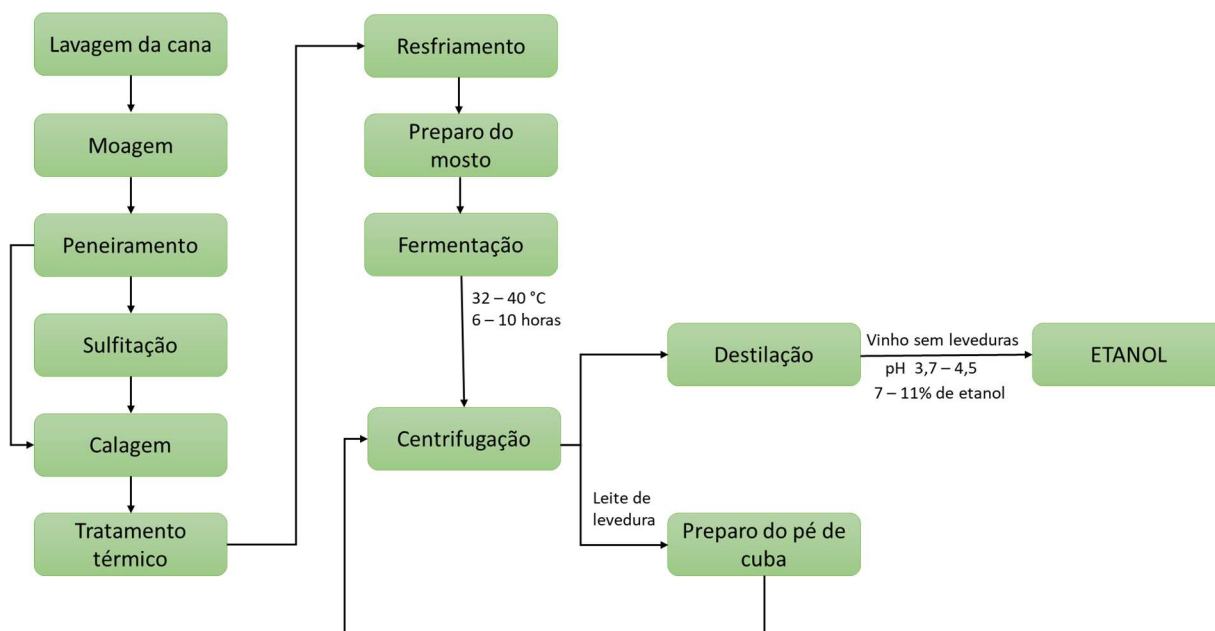
Durante o processo de fermentação, as leveduras produzem a enzima invertase, a qual é responsável por hidrolisar o dissacarídeo sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) em duas moléculas menores de monossacarídeos, possibilitando que a levedura converta esses açúcares em etanol (SOUZA, 2009). A hidrólise da sacarose da origem aos monossacarídeos D-glicose e a D-frutose, ambos possuem a mesma fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, porém, possuem diferentes fórmulas estruturais.

A fermentação alcoólica tem início a partir de uma molécula de glicose, resultando em duas moléculas de ácido pirúvico ($C_3H_4O_3$) e duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP). As duas moléculas de ácido pirúvico produzidas são posteriormente convertidas em duas moléculas de acetaldeído (C_2H_4O) e duas moléculas de CO_2 . Ao final da reação, o acetaldeído é reduzido por duas moléculas de NADH, a fim de produzir duas moléculas de etanol (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

De acordo com Ceccato-Antonini (2011), o processo de fermentação nas indústrias tem início com a pré-fermentação, etapa na qual as leveduras são adicionadas no mosto previamente preparado, nesta etapa ocorre multiplicação das células como também aumento da temperatura. Após esta etapa, com pouca espuma presente no mosto, inicia-se a fermentação principal, a qual tem duração de nove a dez horas, nela ocorrem o aumento de acidez e queda de densidade do mosto, resultado da conversão de açúcar em álcool.

Ao término da fermentação principal ocorre a pós-fermentação, caracterizada pela diminuição gradual da temperatura do mosto, redução no desprendimento de CO_2 e fim da formação de espumas. Quando o processo é finalizado, obtém-se o vinho, nome dado ao mosto totalmente fermentado. Então, centrifuga-se o vinho para separação das leveduras (leite ou creme de leveduras) que serão reutilizadas nas próximas fermentações, por outro lado, o vinho sem as leveduras é destilado, obtendo etanol e conseqüentemente a vinhaça, resíduo da fermentação etanólica. O processo completo com etapas adicionais é evidenciado na figura 1.

Figura 1. Esquema representativo de produção de etanol nas indústrias



Fonte: Adaptado de Ceccato-Antonini (2011).

Leveduras

As leveduras são fungos, microrganismos cujo crescimento dominante é na forma unicelular, possuem reprodução assexuada, podendo ser por meio fissão ou brotamento multilateral e polar, e na forma sexuada, por meio de ascósporos.

As leveduras, em especial a *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microrganismo explorado comercialmente por sua capacidade de obtenção do etanol pelo processo de fermentação alcoólica. Outros microrganismos também são capazes de produzir etanol, como é o caso da bactéria *Zymomonas mobilis*, mas, pela vantagem econômica, as leveduras são os agentes mais utilizados (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001). A *Saccharomyces* foi tão estudada que foi o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado, o estudo de Goffeau e colaboradores contou com aproximadamente 600 pesquisadores ao redor do mundo, tanto da Europa, América do Norte como do Japão, foi intitulado “Life with 6000 genes” e publicado na revista Science em 25 de outubro de 1996 (GOFFEAU et al., 1996).

Atualmente essa levedura tem sido material de estudo para pesquisas na área da genética. Os principais objetivos destes estudos envolvem a utilização de leveduras geneticamente modificadas para aumentar o rendimento na produção de biocombustíveis na fermentação alcoólica, para o etanol (NEVES; ELEUTHERIO; VILELA, 2014) e na fermentação de pentoses (xilose e arabinose) a etanol de segunda geração (FAPESP, 2015; MILESSI, 2017).

Biomassa Lignocelulósica

Com o intuito de mitigar os efeitos causados pela utilização de combustíveis fósseis, a biomassa lignocelulósica recebeu grande atenção, pois representa cerca de 60% da biomassa vegetal e possui características que a fazem ser uma alternativa para a produção de combustíveis renováveis: sua composição química é principalmente lignina (10-30%), hemicelulose (15-35%) e celulose (30-50%), sendo a hemicelulose e a celulose polissacarídeos que podem ser hidrolisados em açúcar, se tornando então passíveis de fermentação para obtenção de etanol (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; RODRIGUES et al., 2016).

A lignocelulose pode ser encontrada em porções menores não comestíveis nas culturas de alimento, como os resíduos de colheita: bagaço de cana, palha de milho, palha de trigo, bagaço de sorgo etc., assim, sua obtenção não compete com a produção de alimentos e também se torna desnecessário o aumento de área plantada para sua obtenção (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010; MARRIOTT; GOMÉZ; McQUEEN-MASON, 2016), sendo este outro ponto positivo que a torna uma alternativa de matéria prima renovável para a industrial sucroalcooleira. A tabela 1 apresenta diferentes biomassas lignocelulósicas e suas respectivas composições químicas.

Tabela 1. Quantidade (%) de celulose, hemicelulose e lignina em diferentes biomassas lignocelulósicas

Biomassa lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40-44	30-32	22-25
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Madeira dura	43-47	25-35	16-24
Madeira mole	40-44	25-29	25-31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3
Forragem de milho	38-40	28	7-21
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Fibra de bananeira	60-65	6-8	5-10
Palha de cevada	31-45	27-38	14-19

Fonte: Santos (2012).

Porém, para a utilização deste tipo de biomassa é necessário que seja feito um pré-tratamento, o qual é realizado por meio de hidrólise ácida ou enzimática, com objetivo de tornar

os açúcares presentes disponíveis e passíveis de fermentação por parte das leveduras (RODRIGUES et al., 2016).

O pré-tratamento tem como objetivo aumentar o acesso das enzimas a fim de aumentar a digestibilidade da celulose e possui efeitos específicos na hemicelulose, celulose e lignina, para que seja possível prosseguir com as etapas de hidrólise e fermentação (ALVIRA et al., 2010). A quebra da estrutura complexa do material lignocelulósico libera as pentoses D-xilose e L-arabinose, e algumas hexoses como a D-manose, D-glucose e D-galactose, açúcares os quais as leveduras possuem capacidade de fermentar a etanol (TOMÁS-PEJÓ et al., 2014). A lignina, por sua vez, não possui moléculas de açúcar em sua composição e não é utilizada na produção de etanol de segunda geração, ela atua na estrutura do material, garantindo sua rigidez (ANDRADE, 2014).

O processo de pré-tratamento é necessário pois a lignina presente na lignocelulose dificulta a realização da hidrólise por “esconder” a superfície celulósica. Também é importante para quebrar a superfície cristalina da lignocelulose, para que assim seja possível remover a lignina, permitindo que ocorra a ação enzimática nas moléculas de celulose e hemicelulose (OGEDA; PETRI, 2010).

Em função de suas características, a biomassa lignocelulósica foi direcionada para estudos que buscam aumentar a produção de biocombustíveis, como o biogás (WANG et al., 2018; ABRAHAM et al., 2020), biodiesel (KUMAR; SINGH; KORSTAD, 2017; ANANTHI et al., 2019) e principalmente o etanol 2G (da SILVA; ERRICO; RONG, 2018; NDUKWE et al., 2020; MORAIS et al., 2020).

Etanol de Segunda Geração

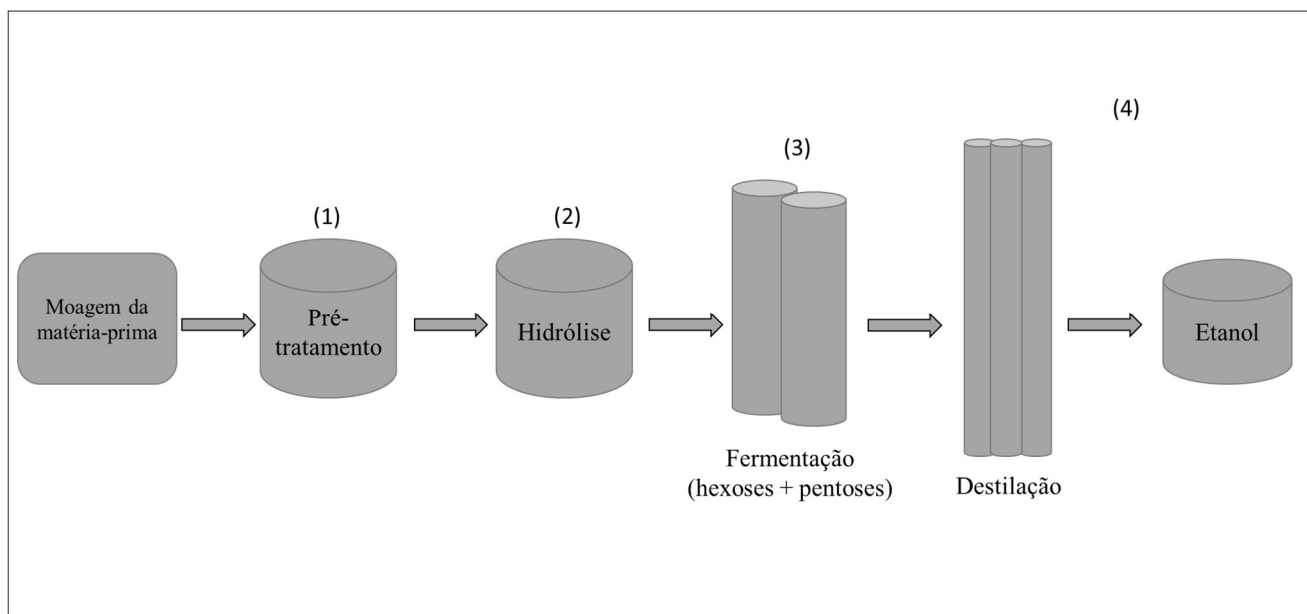
Assim como para o etanol 1G, produzido através da fermentação, por exemplo, da cana-de-açúcar, como para o etanol 2G, o qual é produzido através da fermentação de biomassa lignocelulósica, a via fermentativa é a mais importante para a produção e obtenção do etanol no Brasil. As fontes de obtenção de biomassa lignocelulósica são amplas e de fácil obtenção, principalmente se tratando de resíduos de culturas (BARCELOS, 2012; CGEE, 2018).

A utilização da biomassa lignocelulósica como matéria-prima para produção do etanol 2G pode ocorrer por conversão bioquímica ou termoquímica, sendo a rota bioquímica a mais desenvolvida. Seguindo a rota bioquímica (Figura 2) é necessário que ocorra um pré-tratamento da biomassa, seguido de hidrólises ácida ou enzimática, com o objetivo de quebrar os polissacarídeos em açúcares mais simples, permitindo a fermentação destes em etanol (MUSSATO et al., 2010).

O processo de produção do etanol a partir de biomassa lignocelulósica pode ser resumido em quatro etapas partindo da moagem da matéria-prima (Figura 2), são elas: (1) pré-tratamento, o qual envolve etapas mecânicas para reduzir o tamanho de partículas de celulose e hemicelulose e

etapas químicas, para tornar a biomassa mais digestível para os microrganismos; (2) hidrólise ácida ou enzimática, com o objetivo de quebrar os polissacarídeos em açúcares mais simples; (3) fermentação das hexoses (C6) e pentoses (C5), realizada por microrganismos (na sua maioria leveduras); (4) destilação do etanol e armazenamento (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

Figura 2 - Processo simplificado da produção de etanol 2G



Fonte: Adaptado de Mussato et al. (2010).

Na etapa de hidrólise pode-se adotar diferentes configurações dos processos enzimáticos para obtenção da glicose. Um dos métodos é o chamado Hidrólise Enzimática Separada da Fermentação (SHF), nele a hidrólise enzimática e a fermentação ocorrem em unidades físicas distintas, otimizando o controle das condições ideais para cada etapa. No método de Hidrólise Enzimática e Fermentação Simultânea (SSF) a hidrólise e a fermentação de açúcares C6 acontecem no mesmo evento, o que permite que a glicose produzida seja imediatamente consumida pelo microrganismo fermentador, reduzindo os efeitos inibidores da glicose. Outro método é o chamado Hidrólise Enzimática e Co-Fermentação Simultânea (SSCF), neste modelo os açúcares C5 e C6 são fermentados pelo mesmo microrganismo, diferente dos dois modelos anteriores. Por último, o método sugerido para ser seguido é chamado de Bioprocesso Consolidado (BPC), o qual realiza em uma única etapa a produção da celulase, hidrólise enzimática e fermentação de pentoses e hexoses pelo mesmo microrganismo (SANTOS, 2012).

Um dos maiores desafios para alcançar eficiência de produção está na fermentação simultânea de açúcares C5 e C6, sendo preciso continuar com a busca por novos microrganismos

ou linhagens geneticamente modificadas de microrganismos já utilizados, como é o caso da levedura *S. cerevisiae*, consolidada na fermentação de hexoses (MILESSI, 2017).

O principal objetivo da utilização do etanol de segunda geração como combustível alternativo é sua capacidade de substituir os derivados de petróleo, permitindo a redução na dependência pelos recursos fósseis e a ajuda na mitigação dos gases de efeito estufa (BNDES; CGEE, 2008). A produção em nível industrial do etanol de segunda geração tem a capacidade de realizar tal substituição, como também aumentar o balanço energético e o rendimento de produção de etanol por hectare cultivado, uma vez que não há competição por área cultivada, além do mais, a possibilidade de redução do custo de produção em função do aproveitamento dos resíduos agrícolas necessários para produzir o E2G (DELLA-BIANCA et al., 2013).

Se concretizada no Brasil, a produção de etanol de segunda geração utilizando palha e bagaço de cana-de-açúcar possui a capacidade de elevar em até 50% a produtividade em relação à produção de etanol no país (MILANEZ et al., 2015). Esta estimativa é possível em função da capacidade energética dos materiais lignocelulósicos, os quais teoricamente permitem a produção de 600 milhões de galões de etanol para cada 10 milhões de toneladas de biomassa seca, isto é, 227,12 L/ton, sendo apenas para a fração celulósica da matéria-prima (SANTOS, 2012). Para o bagaço de cana seco, o rendimento é variável, de 157 L/ton até 335 L/ton. Em comparação com o rendimento na produção de etanol 2G, o rendimento da cana-de-açúcar para produção de etanol 1G é de aproximadamente 90 L/ton (BNDES; CGEE, 2008).

Para que seja possível alcançar um processo eficiente e econômico na produção de etanol lignocelulósico é necessário que os microrganismos utilizados no processo convertam completamente o substrato, isto é, converter todos os açúcares, hexoses e pentoses em etanol. Isso deve ser realizado sob condições de produção em indústrias e usinas (GALBE; ZACCHI, 2002). A fermentação de pentoses em nível industrial depende de algumas características do processo, as quais têm influência no seu valor no mercado, são elas: Economia de água durante o processo, pois ao final toda água deve ser removida, sendo este um processo custoso. Uma alternativa para economia seria a reutilização da água nas etapas de produção; Microrganismos tolerantes aos inibidores de metabolismo gerados no pré-tratamento e hidrólise, como ácidos orgânicos e compostos aromáticos; Rendimento na conversão dos açúcares em etanol; buscando produzir a menor quantidade de subprodutos e maior eficiência na conversão do hidrolisado em etanol; Produção específica de etanol, a qual mede a eficiência da fermentação por massa celular, quanto maior a produção específica, menor será a quantidade da massa celular necessária para realizar a fermentação (WINGREN; GALBE; ZACCHI, 2003).

Atualmente três plantas industriais de etanol de segunda geração estão próximas de alcançar eficiência e viabilidade econômica de produção, duas destas indústrias estão localizadas no Brasil e utilizam palha e bagaço da cana que sobram da produção de etanol 1G, são elas: Raízen, unidade de Piracicaba (SP), e GranBio, localizada em São Miguel dos Campos (AL). A terceira indústria é do consórcio Poet-DSM, em Emmetsburg, no estado norte-americano de Iowa, também utilizam resíduos da produção de etanol 1G, neste caso, do milho (FAPESP, 2018).

Leveduras fermentadoras de pentoses

A metabolização dos açúcares como a glicose, xilose e arabinose em etanol pode ser realizada tanto por bactérias quanto por leveduras, porém, foi verificado que os melhores resultados de produtividade foram obtidos com o uso de leveduras (SREENATH; JEFFRIES, 2000; SCORDIA et al., 2012; MILESSI et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016 *apud* FERREIRA, 2016).

Embora a levedura *S. cerevisiae* tenha capacidade de fermentar todos os açúcares C6 presentes na lignocelulose e possuir rendimento de fermentação em etanol de até 0,51 g/g, sua fermentação se resume exclusivamente a hexoses, não sendo o microrganismo ideal para produção de etanol 2G. Neste contexto, linhagens de *S. cerevisiae* estão sendo recombinadas e modificadas geneticamente para alcançar a metabolização dos açúcares C5 como o caso das linhagens KE6-12 e KE6-13i, as quais possuem os genes XYL1 e XYL2 (produzem a enzima xilucinase, metabolizadora de xilose) obtidos da levedura *Pichia stipitis* (TOMAS-PEJÓ, 2014).

Sabe-se que um vasto número de espécies de leveduras é capaz de metabolizar e fermentar a xilose e a arabinose, porém, a capacidade de fermentar a xilose e arabinose em etanol não é ampla, cerca de apenas 1% delas possuem essas características, como é o caso das leveduras *Candida shehatae*, *Pichia stipitis*, *Pichia membranifaciens*, *Pachyloson tannophilus* (HAHNHAGERDAL et al., 2007; CHANDEL et al., 2011; RIBEIRO, 2019).

Leveduras do gênero *Spathaspora* são encontradas no Brasil e possuem diversas espécies capazes de fermentar a D-xilose, são elas: *Spathaspora brasiliensis*, *Spathaspora subii*, *Spathaspora roraimanensis*, *Spathaspora xylofermentans* e *Spathaspora arborariae* (CADETE et al., 2009). Recentemente, em 2018, outra espécie deste gênero foi descoberta no Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, localizada na cidade de Piracicaba/SP. No estudo orientado pelo Prof. Luiz Carlos Basso, a levedura fermentadora de D-xilose recebeu o nome de *Spathaspora piracicabensis*, em razão da cidade em que foi descoberta (VARIZE et al., 2018).

METODOLOGIA

Para realizar a discussão sobre as leveduras utilizadas na produção de etanol de segunda geração, foram consultados trabalhos realizados em universidades, e em revistas de biotecnologia (Biofuels, Bioproducts & Biorefining) e microbiologia (Antonie van Leeuwenhoek). Os trabalhos foram publicados entre 2008 e 2018 envolvendo palavras-chave como: leveduras fermentadoras de xilose, etanol lignocelulósico, biotecnologia e engenharia genética na fermentação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A engenharia genética é considerada uma das melhores alternativas para obter microrganismos fermentadores de pentoses com alto rendimento a etanol e resistente aos inibidores produzidos, porém, não é possível prever os efeitos inesperados após a adição de novos genes. Estudos utilizando linhagens recombinantes e geneticamente modificadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram realizados por Tomás-Pejó et al., (2014), os autores avaliaram os efeitos da adição dos genes XYL₁ e XYL₂ obtidos da levedura *Pichia stipitis*, dando origem às linhagens KE6-12 e KE6-13i cultivadas em meio YPX com 20 g/L de xilose e 10 g/L de glucose e observaram superexpressão da enzima xilucinase, metabolizadora de xilose. A fermentação do hidrolisado lignocelulósico tóxico foi realizada pelas duas linhagens simultaneamente, consumindo 90% da xilose e produzindo etanol com rendimento de 0,4 g/g.

Procurando mais alternativas de modificações genéticas nas leveduras do gênero *Saccharomyces*, Kretzer (2017) utilizou os genes SUT₄ e SUT₆ (transportadores de xilose) obtidos da levedura *Spathaspora arboriae*, em linhagens de *S. cerevisiae*, obtendo-se as linhagens DLGK₁-SUT₄ e DLGK₁-SUT₆. Foi verificado que a linhagem contendo o gene SUT₆ transportou apenas a glicose e não teve influência sobre os outros açúcares. Enquanto a linhagem com gene SUT₄ consumiu cerca de 2 g/L de xilose durante a fermentação, porém, não produziu etanol e apresentou fenótipo de floculação quando a única fonte de carbono foi a xilose, sugerindo condição de estresse para as leveduras. O baixo consumo de xilose pode ser atribuído à remoção do transportador pelo processo de endocitose (HORÁK, 2003).

O estudo de Casey et al. (2010), avaliou o efeito do ácido acético nas concentrações 7,5 e 15 g/L, respectivamente, (faixa de concentração esperada para as diferentes biomassas lignocelulósicas) na co-fermentação de glucose e xilose pela linhagem geneticamente modificada *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST), com concentração inicial de 4,75 g de células secas/L, e identificou que entre os compostos inibidores presentes na biomassa lignocelulósica, como ácidos orgânicos e compostos fenólicos, o ácido acético é um dos principais inibidores do processo de fermentação de etanol. Os autores observaram que na concentração de 15 g/L de ácido acético

houve a maior redução no consumo de glucose e xilose, maior produção de metabólitos e consequente redução na produção de etanol na presença de ácido acético.

A tolerância aos inibidores é crucial para que as leveduras consigam desempenhar com eficiência a fermentação dos açúcares à etanol. Buscando linhagens resistentes a esses inibidores, Milessi (2017) selecionou as linhagens de *S. cerevisiae* GSE16-T18, GSE16-T18 encapsulada em gel de alginato de Cálcio, para proporcionar maior proteção contra os inibidores, e a linhagem GSE16-T18 HAA₁, a qual possui o gene HAA₁, responsável por garantir tolerância ao ácido acético. As leveduras T18 apresentaram eficiência de fermentação de xilose de 0,02 g_{xilose}/g_{células}.h, enquanto as T18 encapsuladas mostraram maior proteção ao inibidor, fermentando a xilose 0,07 g_{xilose}/g_{células}.h, em concentração de 11 g/L de ácido acético. O maior rendimento foi observado pela T18 (0,47 g/g), não sendo muito diferente dos rendimentos da GSE16-T18 HAA₁ (0,45 g/g) e da T18 encapsulada (0,44 g/g) e maior produtividade da linhagem GSE16-T18 HAA₁, de 4,25 g/L de etanol na presença de 15 mg/L de ácido acético, sendo esta uma concentração alta de ácido acético na fermentação (CASEY et al., 2010).

Silva et al. (2011), avaliaram a fermentação de xilose a etanol pela levedura *Pichia stipitis* linhagem NRRL Y-7124. A fermentação ocorreu em um biorreator com tanque agitador, com concentração (g/L) inicial de células igual a 1 e fontes de carbono composta principalmente de xilose (90,0), glicose (15,0), arabinose (15,0) e ureia (2,3). Foram avaliadas as possíveis influências da aeração nas faixas de 0,25 e 0,75 vvm (volume de ar por volume de meio) e agitação de 150 e 250 rpm (rotações por minuto) e obtiveram melhores resultados quando a agitação acontece a 250 rpm e aeração de 0,25 vvm. A produção de etanol nas condições descritas alcançou 26,7 g/L (84h de fermentação), produtividade de 0,32 g/L.h e eficiência no processo de 63%, valores considerados pelos autores como satisfatórios.

Porém, os valores foram inferiores aos encontrados por Yuangsaard et al (2013), os quais utilizaram uma levedura do mesmo gênero *Pichia*, porém da espécie *kudriavzevii*, linhagem DMKU 3-ET₁₅ isolada em meio YPD contendo 1% de extrato de levedura, 2% peptona e 2% glucose (v/v) a 40°C e pH 5, diferente dos valores ideais de temperatura e pH encontrados por Ribeiro et al. (2019), utilizando a levedura *Pichia membranifaciens* em meio YPD 1% extrato de leveduras, 2% peptona, 1% xilose e 1% glicose, sendo iguais a 32°C e pH entre 4 e 4-5. Foi utilizado como biomassa lignocelulósica amido de mandioca hidrolisado. Os valores de produção de etanol obtidos por Yuangsaard et al. (2013) foram de 7,68% (m/v) após 24h de fermentação, produtividade 3,28 g/L.h, e rendimento de 85,4%. Os valores de produtividade e rendimento são 10,25 vezes e 22,4% mais altos do que os valores encontrados por Silva et al. (2011), respectivamente.

O gênero *Spathaspora* é conhecido por possuir espécies capazes de fermentar a D-xilose em etanol, e muitas espécies foram encontradas no Brasil, isoladas de amostras de madeira em decomposição na região da Floresta Amazônica. De acordo com Stambuk et al. (2008) e Cadete et al., (2009), muitas destas espécies podem fornecer uma fonte de genes fermentadores de D-xilose, enzimas e transportadores para alcançar uma produção eficiente de etanol. Cadete et al. 2013 avaliaram 4 espécies isoladas e cultivadas em meios YP, contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de D-xilose. As espécies receberam o nome de *S. xilofermentans*, *S. brasiliensis*, *S. subii* e *S. roraimensis*. A capacidade de fermentar glicose e xilose em etanol foi avaliada para as 4 espécies. A levedura que apresentou maior eficiência na produção de etanol foi a espécie *S. xilofermentans* (0,37 g/g em glicose e 0,34 g/g em xilose), corroborando com trabalhos anteriores avaliando a capacidade fermentativa da *Staphaspora arborariae* (0,35 g/g em glicose e 0,37 g/g em xilose). Analisando a espécie *S. passalidarum*, Melo (2013), determinou que seu crescimento pode ocorrer entre temperaturas de 38 a 41°C, e que a fermentação da D-xilose em etanol nas temperaturas entre 34 e 39°C. Avaliaram também a fermentação com diferentes tipos de oxigenação, sendo moderada (180 rpm) e limitante (120 rpm), sendo observada maior conversão dos açúcares (0,47 g/g) no modelo de oxigenação moderada e maior produção de etanol no modelo limitante de oxigênio com hidrolisado de casca de soja, chegando a 3,8 g/L de etanol.

Recentemente, uma nova espécie deste gênero foi descoberta, a espécie *S. piracicabensis* (VARIZE et al., 2018), a nova espécie também possui a capacidade de fermentar a D-xilose em etanol. Foi isolada e cultivada em meio líquido estéril YEPX (extrato de levedura 1%, peptona 1%, xilose 2%) e apresentou produção de etanol de 3,48 g/L. Por ser uma espécie recentemente descoberta, ainda há pouca literatura sobre seu desempenho fermentativo em outros meios e condições de crescimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por microrganismos que fermentem naturalmente pentoses, ou até mesmo linhagens recombinantes e geneticamente modificadas de leveduras já consolidadas como o caso da *Saccharomyces cerevisiae* abre novos caminhos e diferentes alternativas para alcançar uma produtividade eficiente de etanol lignocelulósico. A adição de genes que configurem resistência aos inibidores de fermentação ou até transportadores de açúcares são alguns exemplos que demonstram a capacidade da engenharia genética em manipular genes de interesse. Da mesma forma que se descobrem novas linhagens, a pesquisa por microrganismos que fermentem a biomassa lignocelulósica em etanol de uma maneira mais eficaz, resistente a condições estressantes e que apresentem viabilidade de produção em escala industrial deve continuar, para que assim seja

possível acelerar e concretizar a introdução do etanol 2G no mercado e diminuir o consumo de combustíveis derivados de petróleo, reduzindo os danos causados pela emissão dos GEE proveniente dos combustíveis fósseis.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A. et al. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. V. 301, n. 122725, 2020.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- ANANTHI, V. et al. Enhanced microbial biodiesel production from lignocellulosic hydrolysates using yeast isolates. *Fuel*. V. 256, n. 115932, 2019.
- ANDRADE, L. F. *Produção de etanol de segunda geração*. Monografia (Programa de Pós-Graduação em Especialista em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.
- ANP – AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Comunicado sobre estoques de etanol anidro. 2020. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/>. Acesso em 30 mar. 2020.
- BARCELOS, C. A. *Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino*. Tese [*Sorghum Bicolor* (L.) Moench, para a produção de bioetanol]. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- BNDES; CGEE. *Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável*. Rio de Janeiro: BNDES. 2008. 316 p.
- BRASIL. *Biodiesel: Uma fonte renovável de energia*. 2010. Disponível em <http://www.biodiesel.gov.br>. Acessado em: 9 de abril. 2019.
- BRASIL. Portal Brasil. Governo estabelece adição de 27% de etanol na gasolina. 2015. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/03/adicao-de-27de-etanol-na-gasolina-e-estabelecida-pelo-governo>. Acesso em: 10 abr 2020.
- CADETE, R. M. et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylosefermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *Fems Yeast Research*. V. 9, n. 8, p. 1338-1342, 2009.
- CADETE, R. M. et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora subii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel D-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 103, n. 2, p. 421-431, 2013.
- CHANDEL, A. K. et al. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. V. 6, n. 1, p. 8-20, 2011.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Biosource Technology*. V. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CARVALHO, L. C. et al. Cana-de-açúcar e álcool combustível: histórico, sustentabilidade e segurança energética. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 9, n. 16, p. 530, 2013.

CASEY, E.; SEDLAK, M.; HO, N. W. Y.; MOSIER, N. S. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. V. 10, p. 385-393, 2010.

CBIE – CENTRO BRASILEIRO DE INFRAESTRUTURA. Gasolina nas refinarias atinge menor patamar em ao menos 15 anos. 2020. Disponível em: <https://cbie.com.br/>. Acesso em 25 abr. 2020.

CECCATO-ANTONINI, S. R. *Microbiologia da fermentação alcoólica*. A importância do monitoramento microbiológico em destilarias. São Carlos: EdUFSCar, 2011. (Coleção UAB-UFSCar).

CGEE- Centro de Gestão de Estudo Estratégicos. Agenda Positiva da Mudança do Clima e do Desenvolvimento Sustentável. Relatório prospecção etanol de segunda geração - E2G 2030 Panorama analítico prospectivo dos biocombustíveis e bioprodutos. Brasília, 2018.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Produção de etanol no Brasil mantém recorde de 33,14 bilhões de litros, 2019. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 10 maio. 2020.

CORTEZ, L. A. B et al. *Proálcool, Universidades e Empresas*: 40 anos de ciência e tecnologia para o Etanol brasileiro. 1975-2015. 1 ed. Blucher, 2016, p 223.

DELLA-BIANCA, B. E. et al. What do we know about the yeast stains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 97, n. 3, p. 979-991, 2013.

FAPESP. A Vez da Biotecnologia na biomassa. *Revista FAPESP*. 2015. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/>. Acesso em: 9 mai. 2020.

FAPESP. Obstáculos no caminho. *Revista FAPESP*, 2018. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/>. Acesso em: 9 jul. 2020.

FERREIRA, A. D. *Produção eficiente de Etanol 2G a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar*: otimizando condições de cultivo e operacionais. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2016.

GALBE, M; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol Biotechnol*. V. 59, n. 6, p. 618-628, 2002.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. *Science*. V. 274, n. 5287, p. 546-567, 1996.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*. V. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology Biotechnology*. V. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.

HORÁK, J. The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1614, n. 2, p. 139-155, 2003.

KRETZER, L. G. *Clonagem, expressão e análise de transportadores de açúcares em linhagens recombinantes de Saccharomyces cerevisiae*. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

KUMAR, D.; SINGH, B.; KORSTAD, J. Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bacteria for production of biodiesel and renewable diesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. V. 73, p. 654-671, 2017.

LANZOTTI, C. R. *Uma Análise Energética de Tendências do Setor Sucroalcooleiro*. (Dissertação). UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas. 2000, 106 p.

LEITE, R. C. C; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. *Novos estud. - CEBRAP*, São Paulo, n. 78, p. 15-21, 2007. Disponível em:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010133002007000200003&lng=en&nr=iso. Acesso em 2 abr. 2020.

LIMA, L.R.; MARCONDES, A. A. *Alcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira*. Curitiba: Editora UFPR, 2002, p. 248.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Edgard Bluche, 2001. p. 1-43. (Biotecnologia Industrial; v. 3).

MARRIOTT, P. E.; GÓMEZ, L. D.; Mc-QUEEN-MASON, S. J. Unlocking the potential of lignocellulosic biomass through plant science. *New Phytologist*. V. 209, n. 4, p. 1366-1381, 2016.

MELESSI, T. S. S. *Produção de etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando Saccharomyces cerevisiae selvagem e geneticamente modificada imobilizadas*. (Tese). UFSCAR - Universidade Federal de São Carlos, 2017, 190 p.

MELO, M. A. *Avaliação da produção de bioetanol por linhagens de Spathaspora passalidarum isoladas da Floresta Amazônica Brasileira*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

MILANEZ, A. Y; NYKO, D.; VALENTE, M. S. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar – uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. *BNDES Setorial*. V. 41, p. 237-294, 2015.

MORAIS, C. G. et al. Production of ethanol and xylanolytic enzymes by yeasts inhabiting rotting wood isolated in sugarcane bagasse hydrolysate. *Fungal Biology*. V. 124, n. 7, n. 639-647, 2020.

MUSSATO, S. I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, 2010, v.28, p.817-830.

NDUKWE, J. K. et al. Mechanisms of weak acid-induced stress tolerance in yeasts: Prospects for improved bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Process Biochemistry*. v. 90, p. 118-130, 2020.

NEVES, B. C.; ELEUTHERIO, E. C. A.; VILELA, L. F. *Saccharomyces cerevisiae geneticamente modificada e seu uso*. Depositante: Universidade Federal do Rio de Janeiro. PI 1101427-0 A2. Depósito: 24 mar. 2011. Publicação: 11 fev. 2014.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

RIBEIRO, N. N. et al. Otimização das condições fermentativas de *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração. *Química Nova*, v. 42, n. 7, p. 720-728, 2018.

RODRIGUES, C. et al. Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. In: RESENDE, R. R. (Org.). *Biotechnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações*. v. 4. São Paulo: Blucher, 2016. p. 283-314. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br>. Acesso em: 10 abr. 2020.

RODRIGUES, L. D. *A cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de biocombustíveis: impactos ambientais e o zoneamento agroecológico como ferramenta para mitigação*. Monografia. 2010. UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora. 64 p.

SÁNCHEZ, O. J; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from diferente feedstocks. *Bioresource Technology*. v. 99. P. 5270-5295. 2008.

SANTOS, D. S. *Produção de etanol de segunda geração por Zymomonas mobilis naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica*. 2012. 218 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro - RJ, 2012.

SILVA, A. R. G. da; ERRICO, M.; RONG, B. G. Systematic procedure and framework for synthesis and evaluation of bioethanol production processes from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology Reports*. v. 4, p. 29-39, 2018.

SILVA, F. S. G.; GOMES, W. P. C.; NASCIMENTO, D. D. *Avaliação da fermentação de leveduras visando a produção de etanol de segunda geração*. Bioenergia em revista: diálogos. v. 9, n. 2, p. 35-61, 2019.

SILVA, J. P. A. et al. ETHANOL Production from Xylose by *Pichia Stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. V. 28, n. 01, p. 151-156, 2011.

SILVA, J. S; JESUS, J. C; COUTO, S. M. Noções sobre Fermentação e Produção de Álcool na Fazenda. In: SILVA, J. S. *Produção de Álcool na Fazenda e em Sistema Cooperativo*. Minas Gerais: Viçosa, 2007.

SOUZA, C. S. *Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por linhagem de S. Cerevisiae*. Tese. Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/IPT. 2009.

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.

TOMÁS-PEJÓ, E.; BONANDER, N.; OLSSON, L. Industrial yeasts strains for biorefinery solutions: Constructing and selecting efficient barcoded xylose fermenting strains for ethanol. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. V. 8, n. 5, p. 626-634, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

UDOP – UNIÃO NACIONAL DE BIOENERGIA. Com queda de preço da gasolina, 2020.
Disponível em: <https://www.udop.com.br>. Acesso em 30 abr. 2020.

VARIZE, C. S. et al. *Spathaspora piracicabensis* F. A., Sp. Nov., a D-xylose-fermenting Yeast Species Isolated from Rotting Wood in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology*. V. 111, n. 4, p. 525-531, 2018.

WANG, D. et al. Can hydrothermal pretreatment improve anaerobic digestion for biogas from lignocellulosic biomass? *Bioresource Technology*. V. 294, p. 117-124, 2018.

WINGREN, A.; GALBE, M; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*. V. 19, n. 4, p. 1109-1117, 2003.

YUANGSAARD, N. et al. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. *Antonie van Leeuwenhoek*. V. 103, n. 3, p. 577-588, 2013.

1 ALMEIDA, Cássio de Souza é Tecnólogo em Biocombustíveis pela FATEC Piracicaba – Faculdade de Tecnologia Dep. “Roque Trevisan”. Durante a graduação adquiriu conhecimento técnico e acadêmico no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) no qual desenvolveu duas iniciações científicas no Laboratório de Ecotoxicologia e estagiou no Laboratório de Biologia Celular e Molecular. Atualmente atua como Tecnólogo de Processos na Lallemand Soluções Biológicas Ltda.

2 NASCIMENTO, Daniela Defávares do. Possui graduação em Engenharia Agrônoma pela Universidade de São Paulo (1997), graduação em Licenciatura Em Ciências Agrárias pela ESALQ/USP (1998), mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela ESALQ/USP (2000) e doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela ESALQ/USP (2005). Especialista (MBA) em Agronegócios pelo PECEGE/ESALQ/USP (2012). Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em Bioquímica e Biologia Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: cultura de tecidos, micropropagação de plantas, clonagem gênica, transformação genética de plantas (Tabaco, Arabidopsis, Eucalipto e cana-de-açúcar), análises moleculares. Desde 2010 é professora concursada por prazo indeterminado para as disciplinas: Biotecnologia e Bioetanol do curso de Graduação em Biocombustíveis; e Biotecnologia e Bioquímica de Alimentos do curso de Graduação em Alimentos, todos da FATEC Piracicaba "Deputado Roque Trevisan".