



## IX Oktoberfórum – PPGEQ

19, 20 e 21 de outubro de 2010

### AValiação de Produtividade de Etanol por *Spathaspora arborariae* em Meio Sintético

Fernanda da Cunha-Pereira<sup>1</sup>, Marco Antônio Zachia Ayub<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,

E-MAIL: {fernanda.pereira, mazayub}@ufrgs.br

**Resumo:** O etanol é um dos combustíveis de maior importância frente às crescentes preocupações a respeito da oferta e custo do petróleo, e também com relação ao impacto ambiental negativo devido ao efeito estufa. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a produtividade de etanol e xilitol em meio semissintético com glicose ou xilose ou arabinose por *Spathaspora arborariae*, sob condições anaeróbicas ou aeróbicas. Os ensaios foram realizados em frascos Duran de 500 mL contendo 20% de meio de cultivo, utilizando agitador orbital a 100 (anaerobiose) e 180 (aerobiose) rpm e temperatura de incubação de 28°C. As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e a concentração celular foi medida através da massa seca. A maior produtividade de etanol foi em cultivo anaeróbico utilizando glicose e xilose (6,27 e 3,62 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). Já para a arabinose, a maior produtividade foi no cultivo aeróbico (0,94 g L<sup>-1</sup>). Estes resultados demonstram que *S. arborariae* possui capacidade de converter glicose, xilose e arabinose em etanol, indicando que esta espécie tem potencial para a conversão total dos açúcares presentes em hidrolisados provenientes de resíduos lignocelulósicos agroindustriais que são à base dos biocombustíveis de segunda geração.

**Palavras-chave:** etanol, xilitol, *Spathaspora arborariae*, aerobiose, anaerobiose

#### 1. Introdução

Com o crescimento da população e da indústria, o consumo de combustíveis fósseis deverá crescer drasticamente, porém este é um recurso não renovável e limitado (SIVAKUMAR *et al.*, 2010). Sendo assim, um aumento na demanda por etanol, como um substituto para a gasolina, é esperado devido a preocupações relacionadas à estabilidade econômica, impacto ambiental e o aquecimento global.

A produção industrial de etanol combustível provém predominantemente de culturas agrícolas (biocombustível de primeira geração). Na América do Norte, o etanol é produzido a partir de milho, enquanto que no Brasil, utiliza-se a cana-de-açúcar (WHEALS *et al.*, 1999; BOTHAST E SCHLICHER, 2005). Biocombustíveis de segunda geração, tais como os derivados da biomassa lignocelulósica, estão tornando-se amplamente aceitos como superiores aos biocombustíveis de primeira geração, derivados de culturas alimentares (SIVAKUMAR *et al.*, 2010).

Os materiais lignocelulósicos são amplamente disponíveis, renováveis e possuem baixo custo, portanto, ideais para a bioconversão a etanol (JONNISON *et al.*, 2007). Em estimativa feita por KIM & YUM (2006) são gerados 1,5 trilhões de toneladas de biomassa

lignocelulósica por ano, tornando essa uma fonte inesgotável de matéria-prima para formação de bioprodutos, como o etanol e o xilitol. Resíduos gerados pelas culturas de arroz, trigo, cana e algodão chegam a contabilizar 66% do total de resíduos gerados na produção industrial (PRASAD, 2007). A lignocelulose é o principal componente da biomassa, sendo ela constituída por três tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina que estão fortemente entrelaçados e quimicamente ligados por forças não covalentes e ligações covalentes cruzadas (PÉREZ *et al.*, 2002). A proporção destes componentes varia na composição dependendo da espécie da planta, idade, tempo de colheita e condição ou estágio de crescimento (JEFFRIES; JIN, 2000). A celulose é um polímero linear, que é composto por subunidades de D-glicose ligadas através de ligações glicosídicas β-1-4 formando o dímero de celobiose (PÉREZ *et al.*, 2002). Hemicelulose é um polissacarídeo com menor peso molecular do que a celulose. A hemicelulose é composta por hexoses como glicose, manose e galactose, e pentoses como xilose e arabinose, podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos, grupos acetil e desoxi-hexoses. A lignina por sua vez é uma macromolécula tridimensional composta basicamente por unidades de fenilpropano, que se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinâmílicos precursores (guaiacil, siringil e p-

hidroxifenil). (FENGEL e WEGENER, 1989).

Atualmente, diversas pesquisas apontam que a viabilidade econômica do processo de produção de bioetanol depende de uma maior conversão dos açúcares (pentoses e hexoses) existentes nos hidrolisados de materiais lignocelulósicos. Além disso, busca-se alcançar o processo de biorrefinaria, que consiste na recuperação de diversos produtos de alto valor agregado oriundos da conversão dos materiais lignocelulósicos, como a obtenção simultânea de etanol e xilitol a partir das pentoses e hexoses provenientes do hidrolisado de um resíduo agroindustrial (LATIF E RAJOKA, 2001).

As hexoses são eficientemente fermentadas a etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo este que possui aplicação bem sucedida na produção industrial de etanol a partir de caldo de cana-de-açúcar e melaços no Brasil (MERICCO *et al.*, 2007). Porém a sua utilização na produção de etanol de segunda geração, sobre hidrolisados que contém pentoses e hexoses não é tão eficiente, já que essa levedura não consegue converter pentoses a etanol. Várias pesquisas atualmente objetivam o desenvolvimento de cepas modificadas de *S. cerevisiae* que consigam utilizar as pentoses presentes nos hidrolisados. Existem alguns microrganismos capazes de fermentar pentoses a etanol e os que mais se destacam são: bactérias anaeróbicas, *Escherichia coli*, *Pichia stipitis* e fungos filamentosos (HANH-HÄGERDAL *et al.*, 2007).

Um das alternativas para aumentar a produtividade de etano é a utilização de co-cultivos. Co-cultivos envolvendo dois microrganismos, um fermentador de hexoses e um fermentador de pentoses têm sido muito estudados, como *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (GROOTJEN *et al.*, 1991<sup>a</sup>). Porém, deve-se observar certas dificuldades nesta operação, como encontrar uma aeração e pHs ideais para a fermentação, além de utilizar microrganismos resistentes aos inibidores presentes no hidrolisado (ZHANG *et al.*, 2010).

Um dos fatores que afeta significativamente a taxa de utilização dos carboidratos disponíveis e sua eventual conversão a etanol é aeração do cultivo (SAHA E WOODWARD, 1997). O catabolismo da glicose pela *Saccharomyces cerevisiae* pode se dar pela via aeróbia ou anaeróbia. A via a ser seguida pelo piruvato é a anaeróbia com formação de etanol. Por outro lado, na presença de O<sub>2</sub>, o piruvato seguirá a via aeróbia promovendo assim um alto crescimento celular (RETTORI e VOLPE, 2000).

Sob condições aeróbias (microaerofilia), grande parte da xilose metabolizada (açúcar mais abundante nos materiais lignocelulósicos) é convertida a xilitol, que é o principal co-produto formado nos cultivos de xilose sob condições limitadas de oxigênio, comprometendo assim, a produção de etanol (WALFRIDSSON *et al.*, 1995). Além disso, quando a concentração de xilose atinge determinado nível e a oxigenação aumenta, alguns microrganismos preferem utilizar o etanol produzido como fonte de carbono, isso foi demonstrado em microrganismos como *Pachysolen tannophilus* (MALESZKA & SCHNEIDER, 1982), *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii* (SCHIRMER-MICHEL *et al.*, 2008).

Desta forma, o objetivo deste trabalho é verificar a cinética de conversão de hexose e pentoses a etanol sob condições anaeróbicas e aeróbicas pela levedura *Spathaspora arborariae* em meio sintético.

## 2. Materiais e Métodos

A levedura utilizada neste estudo foi *Spathaspora arborariae* (UFMG-HM 19.1A<sup>T</sup> = NRRL Y-48658<sup>T</sup>) cepa gentilmente cedida pelo Departamento de Microbiologia-UFMG. Esta levedura foi isolada de amostras de madeira apodrecida coletadas no Parque Nacional da Serra do Cipó e no Parque Estadual do Rio Doce, os quais estão localizados em Minas Gerais na parte sul da Serra do Espinhaço.

O estoque de cultura deste microrganismo foi mantido em placas de Petri e tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar extrato de malte (AEM) composto em g L<sup>-1</sup>: extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona, 5; glicose, 10 e ágar, 20; e em microtubos contendo 20% de glicerol e 80% de meio de cultura EM composto em g L<sup>-1</sup>: extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona, 5 e glicose, 10. As culturas crescidas em meio sólido foram mantidas a 4°C e as culturas líquidas contendo glicerol em Freezer (-18°C).

O pré-inóculo foi preparado através do cultivo da levedura em meio EM, em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio. As células foram cultivadas em agitador orbital (Marconi, MA 830) a 180 rpm, 30 °C por 24 horas. Em seguida as células foram recolhidas por centrifugação a 3000 xg por 20 minutos. O pellet formado foi lavado com solução salina e ressuspenso diretamente no mesmo meio que foi utilizado na fermentação. O inóculo foi padronizado para que a concentração celular da suspensão atingisse densidade óptica igual a 1 em comprimento de onda de 600 nm (DO<sub>600</sub>=1). O volume de inóculo perfazia 10% do volume total de cultivo em todos os frascos utilizados neste experimento.

Cultivos anaeróbicos e microaeróbicos de *S. arborariae* foram conduzidos em meios de cultura contendo glicose ou xilose ou arabinose. Estes experimentos foram realizados em Frascos Duran (500 mL) contendo 100 mL dos meios semissintéticos G<sub>30</sub> ou X<sub>30</sub> ou A<sub>30</sub>, em agitador orbital (Marconi, MA 830), sob condições microaeróbica (180 rpm) e anaeróbica (100 rpm). As composições dos meios utilizados foram em (g L<sup>-1</sup>): G<sub>30</sub> - extrato de levedura, 3; peptona, 5 e glicose, 30; X<sub>30</sub> - extrato de levedura, 3; peptona, 5 e xilose, 30; e A<sub>30</sub> - extrato de levedura, 3; peptona, 5 e arabinose, 30. A temperatura de cultivo e o período de incubação foram de 28°C e 55 horas, respectivamente. Alíquotas de 10 mL foram retiradas as 0, 4, 8, 12, 24, 46 e 55 horas de cultivo, para acompanhamento da cinética de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol e xilitol. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

A concentração celular foi determinada através da quantificação de massa seca e a glicose, xilose, arabinose, etanol e xilitol, foram quantificados através de análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. As amostras foram previamente filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade igual a 0,2 µm. A análise cromatográfica foi feita em um cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizando uma coluna BIORAD HPX-87H, aquecida a 45°C e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a 0,6 mL/min como eluente e um detector de índice de refração (SHIMADZU). A concentração de açúcares foi determinada através de curvas de calibrações preparadas com padrões de grau analítico, secos sob sílica e vácuo.

### 3. Resultados e Discussões

Para uma maior compreensão dos parâmetros cinéticos utilizados para monitorar o cultivo, abaixo serão apresentadas Tabela e Figuras (gráficos) referentes a este trabalho.

**Tabela 1.** Parâmetros cinéticos para os cultivos em meio semissintético sob condições anaeróbicas e aeróbicas utilizando o microrganismo *S. arborariae*.

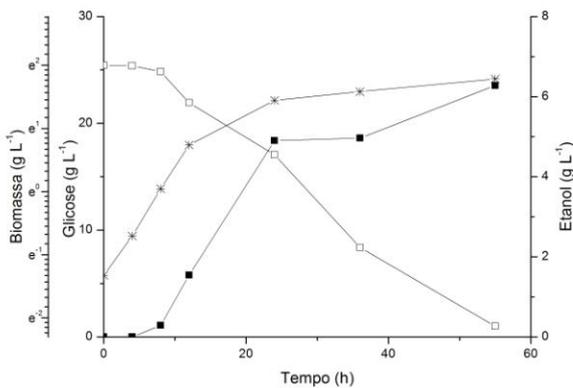
Tipo de Cultivo	S	Consumo (%)	Etanol (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> ET (g g <sup>-1</sup> )	Q (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Xilitol (g L <sup>-1</sup> )
Cultivo Aeróbio	G	96	0,56	0,05	0,02	-
	X	100	0,57	0,03	0	0,19
	A	37	0,94	0,09	0,02	-
Cultivo Anaeróbio	G	96	6,27	0,26	0,11	-
	X	87	3,62	0,16	0,07	0,4
	A	39	0,43	0,04	0,01	-

Em que:

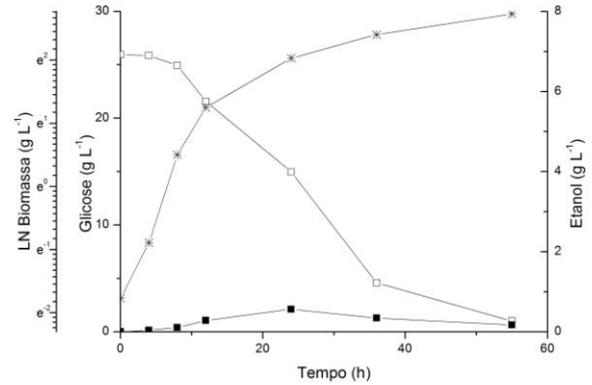
- S: Substrato
- G: Glicose
- X: Xilose
- A: Arabinose

Y<sub>P/S</sub>: coeficiente de produtividade de etanol (g etanol por g<sup>-1</sup> açúcar consumido)

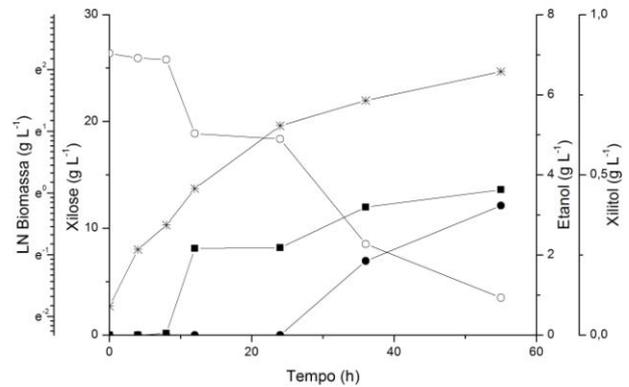
Q: coeficiente de produtividade volumétrica (g h<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>)



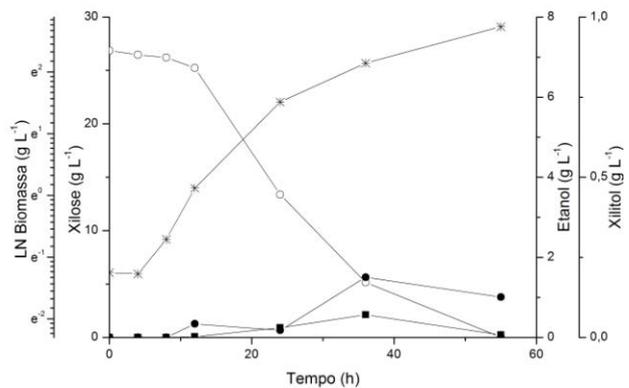
**Figura 1.** Cinética da produção de biomassa, consumo de glicose e produção de etanol, sob anaerobiose, por *S. arborariae*. Biomassa (\*), glicose (□) e etanol (■).



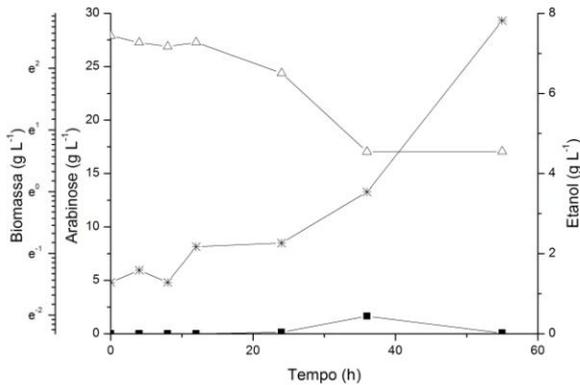
**Figura 2.** Cinética da produção de biomassa, consumo de glicose e produção de etanol, sob aerobiose, por *S. arborariae*. Biomassa (\*), glicose (□) e etanol (■).



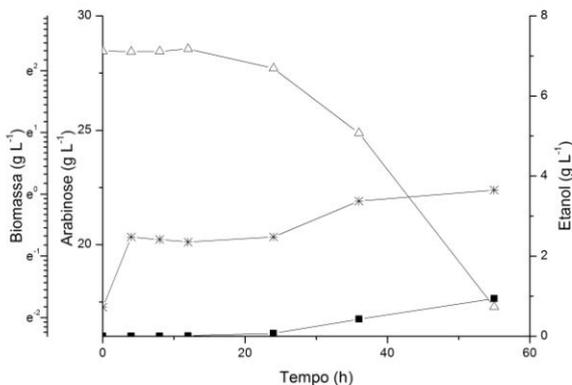
**Figura 3.** Cinética de produção de biomassa, consumo de xilose e produção de etanol e xilitol, sob anaerobiose, por *S. arborariae*. Biomassa (\*), xilose (○), etanol (■) e xilitol (●).



**Figura 4.** Cinética da produção de biomassa, consumo de xilose e produção de etanol e xilitol, sob aerobiose por *S. arborariae*. Biomassa (\*), xilose (○), etanol (■) e xilitol (●).



**Figura 5.** Cinética da produção de biomassa, consumo de arabinose e produção de etanol, sob anaerobiose, por *S. arborariae*. Biomassa (\*), arabinose (Δ) e etanol (■).



**Figura 6.** Cinética da produção de biomassa, consumo de arabinose, e produção de etanol, sob aerobiose, por *S. arborariae*. Biomassa (\*), arabinose (Δ) e etanol (■).

No ensaio em que se utilizou glicose como substrato foi possível observar que 96% deste açúcar foi consumido sob condições anaeróbicas, em 55 horas de cultivo (Figura 1), com um coeficiente de rendimento de etanol ( $Y_{P/S}$ ) igual a  $0,27 \text{ g g}^{-1}$ . No entanto, em condições aeróbicas (Figura 2), pouco etanol foi produzido, resultando em um baixo  $Y_{P/S} = 0,09 \text{ g g}^{-1}$ . Neste cultivo observou-se que a quantidade de biomassa foi maior que no cultivo anaeróbico, mostrando que em aerobiose ocorre um desvio na rota metabólica para a multiplicação celular (RETTORI e VOLPE 2006). ROUHOLLAH *et al.* (2007) avaliaram a conversão de glicose em etanol em cultivos com *S. cerevisiae*, *Pichia stipitis* e *Kluyveromyces marxianus*, a 100 rpm em agitador orbital, obtendo coeficientes de rendimento de etanol ( $Y_{P/S}$ ) de 0,40, 0,41 e  $0,42 \text{ g g}^{-1}$ , respectivamente. Esta diferença de rendimento pode ser explicada pela diferença da relação volume de meio/volume do frasco, já que esta foi de 20% neste trabalho enquanto que para ROUHOLLAH *et al.* (2007) foi de 40%. Esta modificação altera a oxigenação do meio e interfere no metabolismo celular, ou seja, com um maior volume de meio dentro frasco a quantidade de oxigênio disponível para o cultivo é menor, diminuindo a difusão de  $O_2$  no meio, favorecendo a formação de etanol. Em único estudo publicado sobre *S. arborariae* CADETE *et al.* (2009) relataram que esta levedura produziu etanol com um rendimento específico para bioconversão de glicose

( $Y_{E/G}$ ) de  $0,35 \text{ g g}^{-1}$ , em agitador orbital a 160 rpm ( $28^\circ\text{C}$  e pH 5). O maior rendimento obtido por CADETE *et al.* (2009) quando comparado ao rendimento apresentado nesse trabalho (aerobiose) pode também ser explicado pela diferença de oxigenação, pois apesar da rotação utilizada por este autor ser 20 rpm menor que a aplicada nestes experimentos, não se pode garantir que a transferência de oxigênio seja semelhante uma vez que o agitador orbital empregado nesses experimentos são diferentes e existe uma diferença diâmetro de agitação.

Quando xilose foi utilizada como fonte de carbono sob condições anaeróbicas (Figura 3), foi consumido 87% da concentração inicial deste açúcar tendo como produtos etanol e xilitol com coeficientes de rendimento ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,16 \text{ g g}^{-1}$  e  $0,02 \text{ g g}^{-1}$ . Em condições aeróbicas (Figura 4), a xilose foi exaurida em 55 horas, no entanto a produção de etanol e xilitol foram baixas com  $Y_{P/S}$   $0,03 \text{ g g}^{-1}$  e  $0,01 \text{ g g}^{-1}$ . Verificando os resultados observa-se que em anaerobiose *S. arborariae* tem preferência para a conversão de xilose a etanol, isso provavelmente se deve ao fato de que a redução da xilose a xilitol promovida por esta levedura depende de NADH ou NADPH, já que o cofator  $NAD^+$  pode ser recuperado em uma etapa seguinte, seja em condições anaeróbicas ou de limitação de  $O_2$ . Sendo assim, na ausência de oxigênio o principal produto do metabolismo de xilose é o etanol. Em estudo realizado com *Pachysolen tannophilus*, fermentações foram conduzidas utilizando meio semissintético, em frascos Erlenmeyer, incubados em um agitador a  $30^\circ\text{C}$  e 100 rpm apresentou um rendimento de conversão de xilose em etanol  $0,13 \text{ g g}^{-1}$  (ZHAO *et al.*, 2008). Este resultado foi semelhante ao encontrado neste trabalho, mostrando que a *S. arborariae* é uma promissora fermentadora de xilose a etanol em condições anaeróbicas, assim como *P. tannophilus* que é reconhecida como excelente produtora de etanol a partir de xilose (STAMBUCK *et al.*, 2008). CADETE *et al.* (2009) mostraram que *S. arborariae* produziu etanol a partir de xilose com um coeficiente de rendimento de bioconversão específico de  $0,37 \text{ g g}^{-1}$  ( $Y_{EX}$ ). Comparando todos os resultados descritos acima com os do experimento realizados, os resultados sugerem que existe uma faixa ótima de agitação para oxigenação do meio para gerar um a maior conversão de xilose a etanol.

Arabinose foi o açúcar menos consumido por *S. arborariae* em ambas as condições de cultivo (38% em média), tendo como consequência baixa produtividade de etanol, apresentando coeficientes de rendimento de etanol de  $0,04 \text{ g g}^{-1}$  e  $0,09 \text{ g g}^{-1}$ , para anaerobiose e aerobiose, respectivamente (Figuras 5 e 6, respectivamente). DIEN *et al.*, (1996), realizou uma seleção de leveduras capazes de converter L-arabinose em etanol utilizando agitador em condições de microaerofilia e obteve um coeficiente de rendimento de bioconversão específico de  $0,13 \text{ g g}^{-1}$  ( $Y_{P/S}$ ) em 14 dias e consumo de  $33 \pm 5\%$  do substrato por *Candida sp.* (YB-2248). Assim, observa-se que os valores encontrados neste estudo foram semelhantes ao descrito acima, porém em um tempo menor de cultivo.

#### 4. Conclusão

A partir dos resultados apresentados nesse trabalho, pode-se concluir que a levedura *Spathaspora arborariae*

apresenta-se como um microrganismo com grande potencial para converter pentoses e hexoses em etanol. Através dos resultados também é possível verificar que a maior produtividade de etanol foi para a glicose e xilose em anaerobiose e por fim arabinose em aerobiose. Desta forma, como esta levedura apresentou boa conversão dos açúcares em etanol em condições de anaerobiose, co-cultivos com esta levedura e *S. cerevisiae* se mostra uma alternativa promissora para aumentar o rendimento em etanol.

## 5. Referências

BOTHAST R.J. & SCHLICHER M.A. *Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol*. Appl Microbiol Biotechnol, v. 67, p.19–25, 2005.

CADETE, R.; SANTOS, R.; MELO, M.; MOUROZ, A.; GONÇALVES, D.; STAMBUKZ, B.; GOMES, F.; LANCHANCE, M.; ROSA, C. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. FEMS Yeast Res, v. 9, p.1338–1342, 2009.

FENGEL, D., WEGENER, G. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, 1989, 613p.

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

JEFFRIES, T.W.; JIN, Y.S. *Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts*. Applied Microbiology and Biotechnology, v.63, n.5, p.495–509, 2000.

JOHNSON, J. M-F; COLEMAN, MARK D.; GESCH, RUSS; JARADAT, ADBULLAH; MITCHELL, ROB; REICOSKY, DON; WILHELM, W.W. *Biomass-bioenergy crops in the United States: a changing paradigm* *The American Journal of Plant Science and Biotechnology*, v. 1, p.1-28, 2007.

KIM, J.; YUN, S. *Discovery of Cellulose as a Smart Material*. Macromolecules, v.39, p.4202–4206, 2006.

LATIF, F.; RAJOKA, M.I. *Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts*. Bioresource Technology, v.77, p. 57–63, 2001.

MALESZKA, R.; SCHNEIDER, H. *Fermentation of D-xylose, xylitol, and D-xylulose by yeasts*. Canadian Journal of Microbiology, v. 28, p. 360–363, 1982.

MERICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. *Fermentative life style in yeasts belonging to the Saccharomyces complex*. FEBS Journal, v. 274, p. 656–666, 2007.

PRASAD, A. S., SINGH, H. C. J. *Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues*. Bioresource Technology, v. 3, p. 1–39, 2007.

PÉREZ J., MUÑOZ-DORADO J., DE-LA-RUBIA T. E MARTÍNEZ J. *Biodegradação e tratamentos biológicos de celulose, hemicelulose e lignina: uma visão geral*, Int Microbiol, v. 5, p. 53–63. (2002)

PEIRÓ, A. M.; AYLLÓN, J. A.; PERAL, J.; DOMÉNECH, X. *TiO<sub>2</sub>-photocatalysed degradation of phenol and ortho-substituted phenolic compounds*. Applied Catalysis B: Environmental, v. 30, p. 359–373, 2001.

RETTORI, D. e VOLPE, P. L.O. *Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da Saccharomyces cerevisiae*. Química Nova, 2006

ROUHOLLAH, H.; IRAJ, N., GITI, E.; SORAH, A. *Mixed sugar fermentation by Pichia stipitis, Saccharomyces cerevisiae, and an isolated xylose fermenting Kluyveromyces marxianus and their cocultures*. African Journal of Biotechnology. V. 6 (9), p. 1110–1114, 2007.

SAHA, B.C.; WOODWARD, J. *Fuels and Chemicals from Biomass*. Ed. American Chemical Society, Washington, DC, 1997.

SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ P. F.; MATOS, G. S.; AYUB, M.A.Z. *Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant Candida guilliermondii NRRL Y-2075*. Bioresource Technology, v. 99, p. 2898–2904, 2008.

SIVAKUMAR, G.; DANIEL R. VAIL, JIANFENG XU, DAVID M. BURNER, JACKSON O. LAY JR., XUMENG GE, PAMELA J. Weathers - *Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations*. Eng. Life Sci., v. 10, No. 1, p. 8–18, 2010

STAMBUK, B.U.; ELEUTHERIO, E.C.A.; FLOREZ-PARDO, L.M.; SOUTO-MAIOR, A.; BOM, E.P.S. *Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains*. Journal of Scientific & Industrial Research, v. 67, p. 918–926, 2008.

WALFRIDSSON, M. et al. *Xylose-metabolizing Saccharomyces cerevisiae strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase*. Applied Environmental Microbiology, Washington, v.61, p.4184–4190, 1995.

WHEALS A.E.; BASSO L.C.; ALVES D.M.G.; AMORIM HV *Fuel ethanol after 25 years*. Trends Biotech, v. 17, p. 482–487, 1999.

GROOTJEN DRJ, JANSEN ML, VAN DER LANS RGJM, LUYBEN KCHAM *Reactors in series for the complete conversion of glucose/xylose mixtures by Pichia*

*stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* v.13, p. 828–833, 1991.

ZHANG, X.; SHEN, Y., SHI, W.; BAO, X. *Ethanollic cofermentation with glucose and xylose by the recombinant industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* NAN-127 and the effect of furfural on xylitol production*. *Bioresource Technology*. P. 7104-10, 2010.