

MELHORAMENTO GENÉTICO MICROBIANO BASEADO NA ENGENHARIA GENÉTICA: O CASO DOS MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL

MICROBIAL BREEDING BASED ON GENETIC ENGINEERING: THE CASE OF MICROORGANISMS PRODUCERS OF ETHANOL

PRISCILA ROSSETO¹, ANA CLAUDIA GAVIOLI², SANDRO AUGUSTO RHODEN³, JOÃO ALENCAR PAMPHILE^{3*}

1. Bióloga, mestranda do curso de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental da Universidade Estadual de Maringá; 2. Engenheira Agrônoma, mestranda do curso de Pós-graduação em Biotecnologia Ambiental da Universidade Estadual de Maringá; 3. Professor Doutor do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual de Maringá

* (UEM – Universidade Estadual de Maringá). Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87020-900. prof.pamphile@gmail.com

Recebido em 10/12/2013. Aceito para publicação em 16/12/2013

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma matéria prima abundante e de baixo custo no mercado brasileiro o que possibilita a produção de etanol em larga escala para diversos usos. No Brasil, toda a produção industrial de álcool é realizada utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ainda pouco se conhece de outros microrganismos que produzam álcool a nível industrial. Em vários países têm sido realizados estudos de fermentação que incluem o uso de bactérias em vez de leveduras para reduzir o tempo de fermentação alcoólica. As bactérias alcoólicas da espécie *Zymomonas mobilis* apresentam atributos tecnológicos que potencializam o seu emprego na fermentação alcoólica em escala industrial, pois possuem habilidades promissoras de transformar açúcares em etanol, em condições comparáveis àquelas exigidas pelas leveduras. Neste aspecto, a transformação genética tem exercido uma função significativa não somente para o entendimento da biologia dos seres vivos, mas também para a potencialização e melhoramento de características particulares de determinados organismos. Existem inúmeras metodologias que podem ser utilizadas na transformação genética de microrganismos, tais como: protoplasto-PEG, eletroporação, acetato de lítio, biolística e *Agrobacterium tumefaciens*.

PALAVRAS-CHAVE: Etanol, microrganismos, transformação genética.

ABSTRACT

The cane sugar is an abundant and low cost raw material in the Brazilian market which enables the production of ethanol on a large scale for various uses. In Brazil, all industrial alcohol production is performed

using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* but, little is known about other microorganisms that produce alcohol in industrial level. Studies in several countries, include fermentation using bacteria, instead of yeasts, to reduce the time of fermentation. Alcoholic *Zymomonas mobilis* bacteria species present technological attributes that enhance its use in alcoholic fermentation in industrial scale because they have promising abilities to transform sugars into ethanol in conditions comparable to those required by the yeast. In this respect, genetic transformation has played a significant role not only for understanding the biology of living beings, but also for the enhancement and improvement of particular characteristics of certain organisms. There are numerous methodologies that can be used in genetic transformation of microorganisms, such as protoplast-PEG, electroporation, lithium acetate, biolistics and *Agrobacterium tumefaciens*.

KEYWORDS: Ethanol, microorganisms, genetic transformation.

1. INTRODUÇÃO

Desde a crise do petróleo, a partir de 1973, há um grande interesse na busca de recursos energéticos renováveis, assim como de fontes de recursos orgânicos capazes de substituir os atuais produtos petroquímicos. Desta forma, por um lado realizaram-se esforços para melhorar a rentabilidade dos processos de obtenção de bioálcool, e por outro se tratou de substituir os processos

do tipo químico por outros do tipo biológico. Contudo, a consciência de que os combustíveis fósseis vão se esgotar e que é necessário utilizar tecnologias menos contaminantes, tem feito renascer o interesse nestes processos biológicos, principalmente quando relacionados à produção de etanol¹.

O etanol da cana-de-açúcar é o maior sucesso comercial dos combustíveis de biomassa em produção atualmente. O etanol da cana-de-açúcar possui balanço energético positivo e tem sido beneficiado pelo apoio de políticas governamentais em vários países, inclusive no Brasil, que atualmente abastece aproximadamente 40% do combustível para veículos de passageiros com etanol do açúcar. Além disso, a experiência brasileira sugere que os impactos ambientais adversos associados com a produção em larga-escala de etanol da cana-de-açúcar podem ser significativamente reduzidos².

A cana-de-açúcar é uma matéria prima abundante e de baixo custo no mercado brasileiro, o que possibilita a produção de etanol em larga escala para diversos usos que variam desde o uso combustível até o consumo humano por meio da produção de cachaça. O atual processo de produção de cachaça e aguardente utiliza levedura (*Sacharomyces cerevisiae*) como agente fermentador e matérias primas açucaradas tais como: melaço e caldo de cana³. Portanto, no Brasil, toda a produção industrial de álcool é realizada utilizando leveduras, pouco se conhecendo de outros microrganismos que produzam álcool a nível industrial. Em virtude da situação de destaque em que se encontra o Brasil, a nível mundial, no setor energético, algumas instituições vêm selecionando microrganismos mais eficientes no processo de produção de álcool¹.

Em vários países têm sido realizados estudos de fermentação que incluem o uso de bactérias em vez de leveduras para reduzir o tempo de fermentação alcoólica. As bactérias alcoólicas da espécie *Zymomonas mobilis* apresentam atributos tecnológicos que potencializam o seu emprego na fermentação alcoólica em escala industrial, pois possuem habilidades promissoras de transformar açúcares em etanol e gás carbônico, em condições comparáveis àquelas exigidas pelas leveduras¹. Esta bactéria vem despertando muito interesse pelo seu potencial na produção de etanol, produzindo cerca de 1,9 mol de etanol por mol de glicose, com velocidade três a quatro vezes maior que *S. cerevisiae*¹. A *Z. mobilis* é uma bactéria única dentro do mundo microbiano, com crescimento, produção de energia e resposta às condições de cultura extremamente peculiares, causando um grande interesse no mundo científico, biotecnológico e industrial⁴. A habilidade da bactéria em acoplar e desacoplar a produção de energia a favor da formação do produto, responder à manipulação física e química do ambiente torna-a um microrganismo ideal para o estudo e desenvolvimento de processos microbianos para a

produção de etanol¹. Durante a produção de etanol as células sempre estão expostas a tensões como alta temperatura e baixas condições nutricionais, que afetam seu crescimento e produtividade. Linhagens tolerantes ao estresse na produção de etanol com alto rendimento são altamente desejáveis⁵.

Mas, apesar das vantagens apresentadas pela *Z. mobilis* perante as leveduras, o rendimento fermentativo diminui quando se utiliza sacarose como carboidrato para a fermentação. Isto é devido à formação de subprodutos como levana e sorbitol¹. De forma a gerar energia suficiente para o crescimento, *Z. mobilis* deve catabolizar substratos com altas taxas específicas de carbono, resultando em baixos rendimento de biomassa, pois a maior parte deste substrato é incorporada no catabolismo do produto final, o etanol⁶.

Elas possuem rotas catabólicas comparativamente simples e não tem a variedade de alternativas metabólicas encontradas em outros microrganismos.

O presente trabalho tem como objetivo analisar em uma revisão bibliográfica como é feito a transformação genética em microrganismos, os métodos utilizados na transformação, quais são os microrganismos produtores de etanol e como funcionam os mecanismos de produção desses microrganismos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os dados coletados para o presente trabalho foram retirados dos sites Google Acadêmico, Scielo e Web of Science, para a pesquisa de artigos, escolhidos preferencialmente a partir do ano de 2009. Utilizamos como palavras-chave Etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, Gene, Transformação Genética.

3. DESENVOLVIMENTO

Métodos de transformação genética em microrganismos

O potencial da genética molecular tem sido extensivamente explorado no estudo e manipulação de microrganismos, levando ao desenvolvimento de novas tecnologias que podem ser aplicadas tanto para eucariotos quanto para procariotos. Neste aspecto, a transformação genética tem exercido uma função significativa não somente para o entendimento da biologia dos seres vivos, mas também para a potencialização e melhoramento de características particulares de determinados organismos⁷. Existem inúmeras metodologias que podem ser utilizadas na transformação genética de microrganismos, tais como: protoplasto-PEG, eletroporação, acetato de lítio, biolística e *Agrobacterium tumefaciens*.

Existem dois processos principais para efetuar a fusão de protoplastos. O primeiro utiliza uma substância

fusogênica, o polietilenoglicol (PEG), por razão ainda não bem esclarecida. O PEG induz a formação de agregados de células e formação de pontes citoplasmáticas entre elas. O segundo processo de fusão é a eletrofusão que envolve dois passos, ou seja, as células são expostas a uma fonte de corrente alternada e ficam em linha como um colar de pérolas. Em seguida, um pulso de corrente contínua é dado e há uma quebra reversível da membrana, permitindo a fusão⁸. Além dos processos de fusão, os protoplastos podem ser empregados em duas aplicações que interessam diretamente a genética, que são a obtenção de cariótipos moleculares e a transformação⁸.

A eletroporação também é uma técnica de transformação genética utilizada para microrganismos⁹. Essa técnica substitui o uso de PEG pela indução da permeabilidade reversível das membranas biológicas via exposição a um campo elétrico de alta amplitude por um período de curta duração, onde o pulso elétrico promove mudanças na membrana o que permite a entrada do vetor de transformação¹⁰.

O método de transformação por acetato de lítio envolve a exposição de esporos germinados ao vetor de transformação na presença de 0,1 mol.L⁻¹ de acetato de lítio, seguida da incubação típica com CaCl₂ e PEG. Acredita-se que os cátions de metal alcalino ajudem a passagem do DNA exógeno para o interior das células¹¹.

A Biolística (ou Biobalística) consiste na introdução do DNA nas células vegetais (apesar de que, atualmente, usa-se esta técnica para bactérias e outros microrganismos) por meio de micropartículas de tungstênio, ouro ou outros materiais (com menos de um micron, ou poucos micra de diâmetro) contendo o DNA que se deseja introduzir nas células hospedeiras adsorvidas a essas partículas. As partículas são equiparadas a projéteis, disparados contra o tecido a ser infectado, por um aparelho semelhante a um revólver. As células que são atingidas por uma ou poucas esferas de tungstênio sobrevivem e podem ser transformadas⁸.

Outro método é a transformação genética de fungos mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, onde se baseia na capacidade dessa bactéria em transferir parte do seu DNA, para células eucarióticas¹². A *A. tumefaciens*, uma bactéria do solo, aeróbica, gram-negativa, não formadora de esporos, é capaz de induzir a formação de tumores em plantas. Essa bactéria pode infectar plantas, causando a doença denominada galha-da-coroa. A doença é caracterizada pela proliferação descontrolada das células próximas a região do colo da planta, o que resulta na formação de um tecido neoplásico, o tumor¹³. A planta ao sofrer a lesão libera moléculas-sinal que atraem a *Agrobacterium*, que ao infectar as células vegetais transferem o DNA recombinante para as mesmas¹⁴. Essa metodologia, bastante empregada na transformação genética de plantas¹² também foi adaptada para a transformação de fungos e para a levedura *S. cerevisiae*¹⁵.

A transformação genética em *Sacharomyces cerevisiae*

Na fermentação alcoólica, as leveduras são os microrganismos comumente utilizados a nível industrial. Destacando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como principal fonte da produção de etanol. Destaca-se a importância de *S. cerevisiae* como o microrganismo que tem sido tradicionalmente usado para a produção de bebidas alcoólicas e etanol, tendo açúcares como sacarose e glicose como substratos. Este microrganismo também possui a capacidade de produzir etanol a partir de material lignocelulósico¹⁶.

A *S. cerevisiae* é um microrganismo aeróbio facultativo, isto é, que tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose. Os produtos finais do metabolismo do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Assim, em aerobiose, o açúcar é transformado em biomassa, CO₂ e água e, em anaerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂, processo denominado de fermentação alcoólica. Os carboidratos considerados substratos para a fermentação, tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos à levedura¹⁷.

Para a produção eficiente de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, por ação da *S. cerevisiae*, é necessária a melhora da tolerância celular desse fungo leveduriforme, a compostos tóxicos libertados durante o pré-tratamento da biomassa. Notavelmente, durante o estudo realizado por Fujitomi et al¹⁸, a produtividade do etanol específico de uma linhagem modificada geneticamente de *S. cerevisiae* na presença de 90 mM de furfural, foi quatro vezes maior do que a da linhagem controle. O gene codificante da p-nitrofenilfosfatase (PHO13), foi inativado geneticamente em uma linhagem transformada com o plasmídeo pIUX1X2XK, clivado com a enzima de restrição EcoRV, empregando o método de transformação por acetato de lítio. A linhagem de *S. cerevisiae* com o gene da PHO13 inativado também foi capaz de crescer em condições aeróbicas, equivalentemente às linhagens selvagens. Na presença de grandes inibidores da fermentação, ácido acético, ácido fórmico e furfural, a linhagem com o gene de PHO13 inativado, exibiu uma boa produção de etanol a partir de xilose. Além disso, o mutante DPHO13 mostrou uma maior produção de etanol a partir da palha de arroz hidrolisada. Este estudo demonstrou que a deleção do gene PHO13 é uma estratégia simples, mas poderosa, para a produção eficiente do etanol a partir de biomassa lignocelulósica¹⁸.

Em outro trabalho¹⁹, Sanda et al., procuraram, similarmente ao trabalho supracitado, o desafio de se obter uma linhagem microbiana boa produtora de etanol, a partir da fermentação de hidrolisados de lignocelulose

derivados, na presença de inibidores da fermentação, tais como os ácidos acéticos e fórmico. Eles também realizaram experimentos de transformação genética com o método de acetato de lítio, buscando-se a super-expressão dos genes codificadores das enzimas transaldolase (TAL) e formiato-desidrogenase (FDH). Sanda *et al.*¹⁹ analisaram os transformantes em experimentos de fermentação em batelada, com hidrolisado lenho-celulósico, contendo uma mistura de glicose, frutose e xilose como fontes de carbono. Também usaram nos tratamentos, os inibidores da fermentação, acetato e formiato. Estes pesquisadores não observaram qualquer perda de capacidade de fermentação devido à co-expressão de genes da enzima TAL e da enzima FDH, em um recombinante de *S. cerevisiae*. Assim, o método de transformação genética microbiana, resultou na melhoria da produção de etanol a partir xilose, mesmo na presença de formiato.

A engenharia metabólica, bem como as recombinações genéticas de cepas laboratoriais, vem se desenvolvendo como uma ferramenta promissora na produção de etanol, com o uso de linhagens tolerantes a inibidores superiores, com alta produtividade do etanol em condições industriais. A identificação de enzimas adicionais envolvidas na transformação de inibidores e metabólica, com a subsequente abordagens de engenharia, parece ser uma estratégia muito promissora para a obtenção de cepas ainda mais eficientes¹⁹.

Linhagens de *S. cerevisiae* que são adequadas para a fermentação de açúcar²⁰ foram isoladas com reciclo de células sob a condição estressante imposta pela fermentação industrial. A seleção de estirpes de levedura sob a pressão seletiva, poderia exercer impactos positivos sobre a sua fermentação, com elevado desempenho na produção de etanol, glicerol e reduzida formação de espuma, bem como a manutenção de uma alta viabilidade durante a reciclagem²¹. Reciclagem de células pode também ter a vantagem de permitir que as células possam ficar condicionadas ou adaptadas para processo de fermentação²².

A transformação genética em *Zymomonas mobilis*

As bactérias alcoólicas da espécie *Zymomonas mobilis* apresentam atributos tecnológicos que potencializam o seu emprego na fermentação alcoólica em escala industrial, pois possuem habilidades promissoras de transformar açúcares em etanol e gás carbônico, em condições comparáveis àquelas exigidas pelas leveduras. Possuem uma produtividade em etanol, a partir de glicose, acima de 97% do valor teórico máximo²³

A bactéria *Z. mobilis* é Gram-negativa, não esporulante, móvel e anaeróbia facultativa, sendo que, algumas linhagens são obrigatoriamente anaeróbias. Morfológicamente, apresenta-se na forma de bastonete curto e

grosso medindo de 2,0 a 6,0 µm de comprimento e 1,0 a 1,4 µm de largura. Quando apresenta mobilidade, possui de um a quatro flagelos polares²⁴.

As bactérias *Z. mobilis* produtoras de etanol têm atraído muita atenção nos últimos anos, porque a sua taxa de crescimento é substancialmente mais elevada do que a da *S. cerevisiae*, presentemente utilizada para a produção de álcool combustível prático e com avanços recentes no campo da biotecnologia, que tem o potencial para desempenhar um papel-chave na produção de etanol, tornando muito mais econômico²⁵. Esta bactéria apresenta aproximadamente o dobro de velocidade de crescimento, produz etanol numa velocidade seis a sete vezes maiores e o fator de conversão de glicose em etanol é 5% maior. Além disso, *Z. mobilis* não requer controle adicional de oxigênio para manter sua viabilidade em altas concentrações de células²⁶.

Numerosos estudos têm sido publicados sobre etanol celulósico, com produção a partir de biomassa herbácea, como sabugo de milho, espigas de milho, palha de trigo e bagaço de cana, o que não é o caso da produção de etanol a partir de biomassa, tais como madeiras folhosas e coníferas^{27, 28, 29}. Os principais componentes de açúcar de biomassa herbácea são a glicose, xilose e arabinose. Aqueles de biomassa de madeira são a glicose, xilose e manose. Porque a composição de açúcar de biomassa lignocelulósica varia entre as plantas, é necessário selecionar os microrganismos de acordo com o hidrolisado alvo³⁰.

Yanase *et al.*³⁰, realizaram um delineamento experimental com o objetivo de obterem uma linhagem de *Z. mobilis*, produtora de etanol, a partir de biomassa de árvores, contendo glicose, manose e xilose como os principais componentes de açúcares. O resultado deste trabalho foi obtido por meio da introdução genes que codificam enzimas catabólicas de manose e xilose a partir de *Escherichia coli*. A integração do gene *manA* de *E. coli* no DNA cromossômico de *Z. mobilis*, conferiu a habilidade desta bactéria co-fermentar manose e glicose, produzindo 91% do rendimento teórico de etanol, em 36 h. Pela introdução do plasmídeo recombinante contendo os genes codificadores *xyIA*, *xyIB*, *tal* e *tktA*, de *E. coli*, os pesquisadores Yanase *et al.*³⁰, aumentaram o espectro de fermentação da *Z. mobilis*, incluindo os substratos: manose, xilose e glicose. A linhagem resultante da Tecnologia do DNA Recombinante foi capaz de fermentar uma mistura de 20g/L glicose, 20g/L manose e 20g/L xilose, como principais componentes de açúcares do hidrolisado de madeira, em 72h, com a produção de 89,8% da produção teórica.

Z. mobilis com capacidade de converter açúcar em etanol, com alta velocidade e rendimento, além de tolerância ao estresse, tais como alta temperatura e baixo valor de condições nutricionais⁵, são características celulares importantes, pois a alta temperatura no verão e

baixa concentração nutricional no fim de um lote são comuns na indústria do etanol. O rendimento na produção de etanol por meio de *Z. mobilis* é tão alta quanto 97% do rendimento teórico quando a glicose ou frutose é o substrato. Tem uma elevada produtividade de etanol que é específico até 2,5 vezes mais elevada em relação à levedura. Pode tolerar até 400 g / l de glicose, até 160 g / l de etanol, e até 8 g / l ácido acético (pH 6)³¹. Sua capacidade de crescer com menor pH (5,0-5,5) ajuda a reduzir os requisitos assépticos para a fermentação, tornando assim o processo de fermentação mais econômico⁵.

Em um trabalho relevante, realizado por Jia *et al.*⁵, três genes exógenos (*yfdZ* e *metB* a partir de *E. coli* e *Pfu-sHSP* a partir de *Pyrococcus furiosus*) foram integrados no genoma de *Z. mobilis* CP4 para criar a *Z. mobilis* HYM, por meio do transposon Tn5. A cepa recombinante de HYM, com os três genes, permitiu à mesma crescer em meio nutritivo simples, com composição química definida sem a adição de aminoácido. Essa linhagem HYM demonstrou não somente, a tolerância a um estresse desfavorável associado à um déficit nutricional, como também passou a ter a capacidade de converter glicose em etanol, com alta produção, em uma alta temperatura. Essas características de fermentação de alto desempenho mantiveram-se estáveis até 100 gerações⁵.

4. CONCLUSÕES

Trabalhos científicos e de inovação tecnológica voltados ao melhoramento genético de novas linhagens microbianas, produtoras de etanol, a partir de cepas industrialmente relevantes, constitui a fronteira da ciência no que concerne a um incremento na produção desta importante fonte alternativa ao petróleo. A Tecnologia do DNA Recombinante, com as modernas técnicas de transformação genética de microrganismos, destacando-se o método de transformação por acetato de lítio, eletroporação e o uso de transposons, têm alcançado um expressivo sucesso na otimização dos processos de produção de etanol a partir de substratos alternativos, como a biomassa de madeira, fermentando diferentes açúcares, como a glicose, xilose e manose, empregando-se *S. cerevisiae* e *Z. mobilis*.

REFERÊNCIAS

[1] Ernandes FMPG, Cruz CHG. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. *Seminário: Ciências Agrárias, Londrina*. 2009; 30(2):361-80.
 [2] Goldermberg J. Biomassa e energia. Universidade de São Paulo – SP, Brasil, Quim. Nova. 2009; 32(3):582-7.
 [3] Dornelles AS, Rodrigues S. Fermentação alcoólica de caldo de cana utilizando grãos de *kefir*. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE *Revista Ciência Agronômica*, 2006; 37(3):386-90.
 [4] Doelle HW, Kirk, L, Crittenden R, Toh H. *Zymomonas*

mobilis – Science an industrial application. *Critical Reviews in Biotechnology*, London, 1993; 13:57- 98.

[5] Jia X, Wei N, Wang T, Wang H. Use of an EZ-Tn5-based random mutagenesis system to create a *Zymomonas mobilis* with significant tolerance to heat stress and malnutrition. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013; 40:811-22.
 [6] Toma MM, Kalnenieks U, Berzins A, Vigants A, Rikmanis M, Viesturs U. The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. *Process Biochemistry*, London. 2003; 38:1347-50.
 [7] Fávoro LCL. Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.). [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; 2009.
 [8] Azevedo JL. *Genética de Microrganismos*. 2ª ed. Rev Ampl. Goiânia: Editora UFG, 2008.
 [9] Kwon-Chung KJ, Goldman WE, Klein B, Szanislo PJ. Fate of transforming DNA in pathogenic fungi. *Medical Mycology*, Philadelphia, 1998; 36:38-44.
 [10] Ruiz-Díez B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, 2002; 92:189-95.
 [11] Fincham, JRS. Transformation in Fungi. *Microbiological Reviews*, Washington, 1989;53:148-70.
 [12] Michiels CB, Hooykaas PJ, Van Den Hondel CA, Ram AF. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current Genetics*, Berlin, 2005; 48:1-17.
 [13] Agrios GN. Plant diseases caused by fungi. In: Agrios, GN. (Ed). *Plant Pathology*. London: Academic Press, 1997;245-406.
 [14] Pallu APS. Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar. [tese]. Piracicaba: Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; 2010.
 [15] Bundock P, Den Dulk-Ras A, Beijersbergen A, Hooykaas PJJ. Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo Journal*, Oxford, 1995;14:3206-14.
 [16] Martin C, Marcet M, Aalmazan O, Jonsson LJ. Adaptation of a recombinant xyloseutilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technology*, 2006; 98:1767- 73.
 [17] Lima UA, Basso LC, Amorim HV. Produção de etanol. In: Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. (Ed.) *Biocologia Industrial*, São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001;1:11-20.
 [18] Fujitomi K, Sanda T, Hasunuma T, Kondo A. Deletion of the PHO13 gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. *Bioresource Technology*. 2012; 111:161-6.
 [19] Sanda T, Hasunuma T, Matsuda F, Kondo A. Repeated-batch fermentation of lignocellulosic hydrolysate to ethanol using a hybrid *Saccharomyces cerevisiae* strain metabolically engineered for tolerance to acetic and formic acids. *Bioresource Technology*, 2011; 102:7917-24.
 [20] Hahn-Hagerdal B, Karhumaa K, Jeppsson M, Gorwa-Grauslund MF. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, 2007; 108:147-77.
 [21] Basso LC, De Amorim HV, De Oliveira AJ, Lopes ML.

Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res.* 2008;8:1155-63.

[22] Slininger PJ, Thompson SR, Weber S, Liu ZL, Moon J. Repression of xylose-specific enzymes by ethanol in *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* and utility of repitching xylose-grown populations to eliminate diauxic lag. *Biotechnol. Bioeng.* 2011, doi:10.1002/bit.23119.

[23] Sprenger GA. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, 1996; 145:301-7.

[24] Falcão De Morais JO, Rios EMMM, Calazans GMT, Lopes CE. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, 1993; 31:75-91.

[25] Yanase H, Sato D, Yamamoto K, Matsuda S, Yamamoto S, Okamoto K. Genetic engineering of *Zymobacter palmae* for production of ethanol from xylose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 02302(06):2592-99.

[26] Rogers PL, Phil D, Lee KJ, Tribe DE. High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, London, 1980; 15:7-11.

[27] Mohagheghi A, Dowe N, Schell D, Chou YC, Eddy C, Zhang M. Performance of a newly developed integrant of *Zymomonas mobilis* for ethanol production on corn stover hydrolysate. *Biotechnol Lett*, 2004; 26:321-25.

[28] Margeot A, Hahn-Hagerdal B, Edlund M, Slade R, Monot F. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Curr Opin Biotech*, 2009; 20:372-380.

[29] Li X, Kim TH, Nghiem NP. Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). *Bioresource Technol*, 2010; 101:5910-16.

[30] Yanase H, Miyawaki H, Sakurai M, Kawakami A, Matsumoto, M. Haga, K. et al. Ethanol production from wood hydrolysate using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012; 94:1667-78.

[31] Talarico LA, Gil MA, Yomano LP, Ingram LO, Mau-pin-Furlow JA. Construction and expression of an ethanol production in Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 2005; 151:4023-31.

