

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Químicas e Biológicas



**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E COMPARAÇÃO DE LEVEDURAS
SACCHAROMYCES E NÃO – *SACCHAROMYCES* NA PRESENÇA DE
DIFERENTES INIBIDORES PRESENTES NO HIDROLISADO
LIGNOCELULÓSICO**

Autor: Carlos Emanuel Vieira Flores Soares

Orientador: João Ricardo Moreira de Almeida

BRASÍLIA – DF

2020

CARLOS EMANOEL VIEIRA FLORES SOARES

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E COMPARAÇÃO DE LEVEDURAS
SACCHAROMYCES E NÃO – *SACCHAROMYCES* NA PRESENÇA DE
DIFERENTES INIBIDORES PRESENTES NO HIDROLISADO
LIGNOCELULÓSICO**

**Tese apresentada ao curso de doutorado em
Tecnologias Químicas e Biológicas da
Universidade de Brasília como requisito para
obtenção do título de Doutor.**

Orientador: Dr. João Ricardo Moreira de Almeida.

Brasília – DF

2020

Catálogo informatizado pelo autor

Soares, Carlos Emanuel Vieira Flores

Caracterização fisiológica e comparação de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* na presença de diferentes inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico. / Carlos Emanuel Vieira Flores Soares. – Brasília, 2020, 82p.

Orientador: João Ricardo M. de Almeida.

Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília (UnB), programa de Pós-Graduação em Tecnologias Químicas e Biológicas, 2020.

1. Hidrolisado. 2. Inibidores. 3. não-*Saccharomyces*. 4. *Saccharomyces*. 5. HMF.

Universidade de Brasília – UnB

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Químicas e Biológicas

Instituto de Química

Folha de aprovação

Carlos Emanuel Vieira Flores Soares

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E COMPARAÇÃO DE LEVEDURAS
SACCHAROMYCES E NÃO – SACCHAROMYCES NA PRESENÇA DE
DIFERENTES INIBIDORES PRESENTES NO HIDROLISADO
LIGNOCELULÓSICO**

Tese apresentada ao curso de doutorado em Tecnologias
Químicas e Biológicas da Universidade de Brasília como
requisito para obtenção do título de Doutor.

Brasília – DF, 29 de outubro de 2020.

Banca examinadora:

Dr. João Ricardo M. de Almeida (Presidente)

Universidade de Brasília

Dra. Talita Souza Carmo

Universidade de Brasília

Dra. Silvia Belém Gonçalves

Embrapa Agroenergia

Dra. Débora Trichez

Embrapa Agroenergia

Dr. Felix Gonçalves Siqueira

Embrapa Agroenergia (Suplente)

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Agroenergia, por ceder os seus laboratórios para a realização de todos os experimentos deste trabalho.

À Universidade de Brasília e ao curso de Pós-graduação em Tecnologias Químicas e Biológicas, por me ceder a oportunidade de cursar o Doutorado nesses 4 anos.

Às minhas colegas de trabalho Débora Trichez e Jessica C. Bergmann, pelas incríveis colaborações e orientações ao longo de todo o meu doutorado. Às demais colegas de trabalho agradeço a paciência e a gentileza de sempre estarem prontas a me ajudar, quando eu solicitei qualquer tipo de auxílio.

Ao meu professor de inglês, Vander, que dedicou longas horas do seu tempo para me ensinar e aperfeiçoar minha linguagem técnica para a publicação do meu artigo científico. Ao meu orientador, Dr. João Ricardo M. de Almeida, pela confiança no meu trabalho e pela oportunidade de trabalhar junto ao seu grupo de pesquisa de Biotecnologia Microbiana na Embrapa Agroenergia.

A todos os professores de doutorado do curso de Tecnologias Químicas e Biológicas, pelas lições aprendidas e suas contribuições diretas ou indiretas para a minha formação como Doutor.

À minha família, meus pais Carlos Soares e Valéria Soares, pelo cuidado que sempre tiveram comigo e com minha educação ao longo de todos esses anos. Às minhas irmãs Carla e Tallita, pelas infinitas conversas e risadas, quando mais precisei delas, e à minha esposa Sonia Regina, pelo cuidado e amor, quando ninguém mais podia dar, ela estava junto para me alegrar. A todos eles agradeço por acreditarem em mim durante todo esse período e sempre me amparem, quando eu mais precisei de sua força.

Eu posso não ter ido para onde eu pretendia ir, mas eu acho que acabei terminando onde eu pretendia estar”.

(Douglas Adams)

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”. *(Carl Sagan)*

RESUMO

SOARES, C. E. V. F. **Caracterização fisiológica e comparação de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* na presença de diferentes inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico.** 2020. 82 p. Doutorado em Tecnologias Químicas e Biológicas pela Universidade de Brasília, Brasília - DF, 2020.

Várias espécies de leveduras tem sido avaliadas para a produção de combustíveis e produtos químicos a partir de açúcares presentes na biomassa lignocelulósica. O hidrolisado lignocelulósico contém açúcares e também compostos que inibem o metabolismo microbiano, como ácidos orgânicos, furaldeídos e compostos fenólicos. Compreender a resposta de leveduras a esses compostos inibitórios é importante para o desenvolvimento de bioprocessos. Nesse contexto, o objetivo geral desse trabalho foi identificar novas linhagens de leveduras capazes de metabolizar xilose e caracterizar a resposta fisiológica de diferentes espécies em termos de tolerância a inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos. Inicialmente, as linhagens de leveduras JA1 e JA9, previamente isoladas de madeira em decomposição, foram identificadas pela análise de dados de sequência de DNA das regiões D1/D2 e região ITS 5.8S. Em seguida, o potencial de assimilação de xilose e produção de xilitol dessas linhagens foi avaliado em meio contendo xilose, mistura de xilose-glicose e em hidrolisado lignocelulósico. As linhagens foram identificadas como *Spathaspora* sp. JA1 e *Meyerozyma caribbica* JA9, e ambas se destacaram pela capacidade de produção de xilitol em meio sintético e em hidrolisado de biomassa de cana de açúcar. De fato, *Spathaspora* sp. JA1 produziu 22,62 g/L de xilitol, com rendimento de 0,58 g/g em hidrolisado. Em um segundo momento, a tolerância e a resposta fisiológica de 7 leveduras industriais de *Saccharomyces cerevisiae* e 7 leveduras não-*Saccharomyces* em relação a inibidores selecionados de hidrolisados lignocelulósicos foram avaliadas. Comparou-se o perfil de crescimento das 14 leveduras na presença de três concentrações diferentes de furaldeídos (furfural e 5-hidroximetil-furfural - HMF), ácidos orgânicos (ácido acético e ácido fórmico) e compostos fenólicos (vanilina, seringaldeído, ácidos ferúlico e ácido cumárico). Baseado no perfil de crescimento das leveduras, 7 delas foram selecionadas para análise do perfil fermentativo na presença de ácido acético, HMF e vanilina, os compostos inibidores mais tóxicos nas condições testadas. *Candida tropicalis* JA2, *Meyerozyma caribbica* JA9, *Wickerhamomyces anomalus* 740, *S. cerevisiae* JP1, B1.1 e G06 foram selecionadas porque se mostraram mais tolerantes aos compostos testados, enquanto *Spathaspora* sp. JA1 foi selecionada por seu bom desempenho no consumo de xilose e produção de xilitol. Os resultados obtidos mostraram uma resposta dose-dependente das leveduras em relação aos oito inibidores avaliados. Entre as leveduras comparadas, as linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram maior tolerância aos compostos fenólicos e furaldeídos, 3 delas com maior tolerância que as demais. Com relação às leveduras não-*Saccharomyces*, *C. tropicalis* JA2 e *W. anomalus* 740 apareceram como as mais tolerantes, enquanto as cepas de *Spathaspora* foram as mais sensíveis aos diferentes inibidores. Esses resultados demonstram a importância da caracterização fisiológica de diferentes linhagens e espécies de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*.

Palavras-chave: Hidrolisado; Inibidores; não-*Saccharomyces*; *Saccharomyces*; HMF.

ABSTRACT

SOARES, C. E. V. F. **Physiological characterization and comparison of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in the presence of different inhibitors present in the lignocellulosic hydrolysate.** 2020. 82 p. PhD in Chemical and Biological Technologies to University of Brasília, Brasília - DF, 2020.

Several yeast species were evaluated for the production of fuels and chemicals from sugars present in lignocellulosic biomass. The lignocellulosic hydrolysate also contains compounds that inhibit microbial metabolism, such as organic acids, furaldehydes and phenolic compounds. Understanding the response of yeasts to these inhibitory compounds is important for the development of different bioprocesses. The general objective of this work was to identify new yeast strains capable of metabolizing xylose and to characterize the physiological response of different species in terms of tolerance to inhibitors present in lignocellulosic hydrolysates. Initially, the yeast strains JA1 and JA9, previously isolated from decomposing wood, were identified by analyzing DNA sequence data from D1/D2 regions and ITS 5.8S region. Then, the potential for assimilation of xylose and production of xylitol from these strains was evaluated in a medium containing xylose, a mixture of xylose-glucose and in lignocellulosic hydrolysate. The strains were identified as *Spathaspora sp.* JA1 and *Meyerozyma caribbica* JA9, and both stood out for their capacity to produce xylitol in synthetic medium and in sugarcane biomass hydrolysate. In fact, *Spathaspora sp.* JA1 produced 22.62 g/L of xylitol, with yield of 0.58 g/g in hydrolysate. In a second step, the tolerance and physiological response of 7 industrial yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* and 7 non-*Saccharomyces* yeasts in relation to selected inhibitors of lignocellulosic hydrolysates were evaluated. The growth profile of the 14 yeasts was compared in the presence of three different concentrations of furaldehydes (furfural and 5-hydroxymethyl-furfural - HMF), organic acids (acetic acid and formic acid) and phenolic compounds (vanillin, syringaldehyde, ferulic acids and coumaric acid). Based on the yeast growth profile, 7 yeasts were selected for analysis of the fermentative profile in the presence of acetic acid, HMF and vanillin, the most toxic inhibitory compounds under the conditions tested. *Candida tropicalis* JA2, *M. caribbica* JA9, *Wickerhamomyces anomalus* 740, *S. cerevisiae* JP1, B1.1 and G06 were selected because they were more tolerant to the compounds tested, while *Spathaspora sp.* JA1 was selected for its good performance in the consumption of xylose. The results obtained showed a dose-dependent response of yeasts in relation to the eight inhibitors evaluated. Among the yeasts compared, the strains of *S. cerevisiae* showed greater tolerance to phenolic and furaldehydes compounds, 3 of them with greater tolerance than the others. Regarding non-*Saccharomyces* yeasts, *C. tropicalis* JA2 and *W. anomalus* 740 appeared as the most tolerant, while the strains of *Spathaspora* were the most sensitive to different inhibitors. These results demonstrate the importance of the physiological characterization of different *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts and species.

Keywords: Hydrolyzed; Inhibitor; Non-*Saccharomyces*; *Saccharomyces*; HMF.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido Acético

AF: Ácido Fórmico

VA: Vanilina

FU: Furfural

HMF: 5-Hidroximetil-Fufural

SE: Seringaldeido

AFU: Ácido ferúlico

AC: Ácido cumárico

Abs: Absorbância

g/L: gramas por litros

Heat maps: Mapas de calor

HPLC: *High performance liquid chromatography*/ Cromatografia líquida de alta eficiência

nm: nanômetros

OD: *Optical density*/Densidade óptica

pH: Potencial Hidrogeniônico

YPD: *Yeast Peptone Dextrose*/Extrato de levedura Dextrose

YPX: *Yeast Peptone Xylose*/ Extrato de levedura com xilose

rpm: rotação por minutos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica da composição, da biomassa lignocelulósica, demonstrando a lignina, hemicelulose e celulose, distribuídas em um tecido vegetal.	3
Figura 2. Esquema geral mostrando as rotas de conversão da xilose pela via de oxirredução, e as vias de formação de xilitol, xilulose-5-P e etanol.	6
Figura 3. Esquema demonstrando origem dos inibidores a partir do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.	8
Figura 4. Esquema demonstrando de forma geral o efeito dos inibidores sobre a célula de levedura. Após causar a perda da membrana, acumulam-se no citoplasma, reduzindo o pH neutro da célula com aumento de íons H^+ , isso leva a redução do pH, aumento da fase “lag”, inibição do metabolismo microbiano e pôr fim a diminuição do produto de interesse	2
Figura 5. Esquema demonstrando, de forma geral, os mecanismos de resposta aos inibidores sobre a célula de levedura. A célula tende a remover inicialmente os íons H^+ que reduzem o pH através da bomba de prótons (CASPETA; CASTILLO; NIELSEN, 2015). Outra forma é associar o inibidor a fonte de carbono como a glicose de forma a quebrar a estrutura e facilitar a ação da destoxificação biológica (WANG et al., 2010). Ou o microrganismo se adapta ao inibidor e age sobre ele com enzimas redutases auxiliadas por cofatores para destoxificar o inibidor (LIU, 2018).	3
Figura 6. Exemplo de destoxificação de um inibidor fenólico por <i>S. cerevisiae</i> , ao utilizar enzimas redutases associadas com carreadores de elétrons NADH e NADPH.	4
Figura 7. Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). A árvore ideal é mostrada. A árvore é desenhada em escala, com os comprimentos dos ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método da Máxima Verossimilhança Composto (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004) e estão nas unidades do número de substituições de base por site. Esta análise envolveu 22 sequências de nucleotídeos. As posições de códon incluídas foram 1 ^a + 2 ^a + 3 ^a + Não codificantes. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequência (opção de exclusão em pares). Havia um total de 627 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X (KUMAR et al., 2018).	8

- Figura 8. Região do DNA ribossômico utilizado na identificação de leveduras. Em destaque a região D1/D2 que fica dentro do 28S. 12
- Figura 9. Posição filogenética de *Spathaspora sp.* JA1 e *M. caribbica* JA9 com base nas regiões ITS e nos domínios D1/D2 do gene LSU do RNAr. As sequências foram alinhadas usando MAFFT e árvore filogenética inferida, usando FastTree. Os valores de suporte são mostrados ao lado do respectivo nó. A barra mostra o número, a posição e substituições por nucleotídeos (TRICHEZ et al., 2019)..... 19
- Figura 10. Consumo de açúcar e formação de produtos pelas leveduras *Spathaspora sp.* JA1 (A) e (B), *M. caribbica* JA9 (C) e (D), *M. guilliermondii* (E) e (F) e *S. passalidarum* (G) e (H) durante a fermentação em condições limitadas de oxigênio em xilose (coluna da esquerda) Consumo de açúcar e formação de produtos pelas leveduras *Spathaspora sp.* JA1 (A) e (B), *M. caribbica* JA9 (C) e (D), *M. guilliermondii* (E) e (F) e *S. passalidarum* (G) e (H) durante a fermentação em condições limitadas de oxigênio em xilose (coluna da esquerda) e na mistura de glicose e xilose (coluna da direita). Xilose (▲); glicose (■); xilitol (Δ); etanol (●); biomassa (□). As experiências foram realizadas em duplicatas biológicas (TRICHEZ et al., 2019) 22
- Figura 11. Curva de crescimento das leveduras *Saccharomyces* em ácido acético em microplaca de ELISA 96 poços com intervalo de crescimento de 4h de uma leitura para outra em OD 600 nm. Crescimento de (A) *S. cerevisiae* A11. (B) *S. cerevisiae* A12. (C) *S. cerevisiae* JP1. (D) *S. cerevisiae* CAT-1. (E) *S. cerevisiae* B1.1. (F) *S. cerevisiae* G06. (G) *S. cerevisiae* G10, em meio YPD 20 g/L suplementado com e sem ácido acético. Ácido acético 1 g/L (■), 5 g/L (▲) e 10 g/L (●); sem ácido acético (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica. 35
- Figura 12. Curva de crescimento das leveduras não-*Saccharomyces* em ácido acético em microplaca de ELISA 96 poços com intervalo de crescimento de 4h de uma leitura para outra em OD 600 nm. Crescimento de (A) *C. tropicalis* JA2. (B) *M. caribbica* JA9. (C) *S. arborariae*. (D) *S. passalidarum*. (E) *S. stipitis*. (F) *Spathaspora sp.* JA1. (G) *W. anomalus* 740, em meio YPD 20 g/L suplementado com e sem ácido acético. Ácido acético 1 g/L (■), 5 g/L (▲) e 10 g/L (●); sem ácido acético (◆). Assim, os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicatas técnicas e duplicatas biológicas. 36
- Figura 13. Heat map, mostrando o escore inibitório de oito inibidores em três concentrações diferentes no crescimento de leveduras em meio YPD 20 g/L definido após 24 horas. Todos os valores foram normalizados com o crescimento em meio sem inibidor (OD600 24h - OD600 0h). ex. 100% OD600 ~1,5 (não inibida) enquanto 0% é igual a

- OD600 < 0,5 (completamente inibida). AA (ácido acético); AF (ácido fórmico); FU (furfural); HMF (5-hidroximetil-furfural); VA (valinina); SE (seringaldeído); AFU (ácido ferúlico); AC (ácido cumárico)..... 39
- Figura 14. Fermentação de levedura em glicose na presença e ausência de inibidores. Primeira linha: *S. cerevisiae* JP1. Segunda linha: *S. cerevisiae* B1.1. Terceira linha: *S. cerevisiae* G06. Primeira coluna: controle (sem presença de inibidor no meio). Segunda coluna: ácido acético 5 g/L. Terceira coluna: HMF 3g/L. Quarta coluna: vanilina 1,5 g/L. Glicose g/L (◇); Biomassa g/L (□); Glicerol g/L (○); Etanol g/L (Δ); HMF g/L (▲); Vanilina g/L (◆); ácido acético g/L (●). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de duplicata biológica. 42
- Figura 15. Fermentação de levedura em glicose na presença e ausência de inibidores. Primeira linha: *C. tropicalis* JA2. Segunda linha: *Spathaspora* sp. JA1. Terceira linha: *M. caribbica* JA9. Quarta linha: *W. anomalus* 740. Primeira coluna: controle (sem presença de inibidor no meio). Segunda coluna: ácido acético 5 g/L. Terceira coluna: HMF 3 g/L. Quarta coluna: vanilina 1,5 g/L. Glicose g/L (◇); Biomassa g/L (□); Glicerol g/L (○); Etanol g/L (Δ); HMF g/L (▲); Vanilina g/L (◆); ácido acético g/L (●). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de duplicata biológica..... 45
- Figura 16. Fermentação de levedura em xilose na presença e ausência de inibidores. Primeira linha: *C. tropicalis* JA2. Segunda linha: *Spathaspora* sp. JA1. Terceira linha: *M. caribbica* JA9. Quarta linha: *W. anomalus* 740. Primeira coluna: controle (sem presença de inibidor no meio). Segunda coluna: ácido acético 5 g/L. Terceira coluna: HMF 3g/L. Quarta coluna: vanilina 1,5 g/L; Xilose g/L (◇); Biomassa g/L (□); Glicerol g/L (○); Etanol g/L (Δ); HMF g/L (▲); Vanilina g/L (◆); ácido acético g/L (●); xilitol (■). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de duplicata biológica. 52
- Figura 17. Curva de crescimento (A) *C. tropicalis* JA2; (B) *M. caribbica* JA9; (C) *S. arborariae* (D) *S. passalidarum*; (E) *S. stipitis*; (F) *Spathaspora* sp. JA1; (G) *W. anomalus* 740. HMF 0,5 g/L (■), 1 g/L (▲) e 3 g/L (●); sem HMF (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica. 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de diferentes resíduos agrícolas.....	4
Tabela 2. Compostos inibitórios presentes no hidrolisado de cana-de-açúcar.....	1
Tabela 3. Genes e enzimas de respostas expressos na presença de inibidores de hidrolisados lignocelulosicos.....	5
Tabela 4 Capacidade fermentativa da <i>S. stipitis</i> em condições mínimas.....	9
Tabela 5. Produção de xilitol por diferentes leveduras	23
Tabela 6. Parâmetros de fermentação de leveduras fermentadoras de xilose em hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar.....	25
Tabela 7. Inibidores de hidrolisado e suas respectivas concentrações utilizadas no perfil de crescimento, estabelecidas com base em concentrações encontradas na literatura, sendo uma mínima e uma máxima e um terceira para fins comparativos.....	30

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. Biomassa lignocelulósica.....	2
2.2. Hidrolisado lignocelulósico.....	4
2.3. Assimilação de xilose e produção de xilitol	5
2.3.1. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica e inibidores.....	6
2.3.1.1. Ácidos orgânicos, Compostos Furaldeídos e Compostos Fenólicos	8
2.3.2. Metabolismo de inibidores e destoxificação biológica.....	2
2.4. Leveduras com potencial biotecnológico	5
2.4.1. Leveduras <i>Saccharomyces</i>	5
2.4.2. Leveduras não- <i>Saccharomyces</i>	7
2.4.3. Sequenciamento de DNA de levedura	11
3. Justificativa.....	13
4. Capítulo I: Identificação de cepas isoladas de madeira em decomposição	14
4.1.1. Objetivo Geral	14
4.1.2. Objetivos específicos:	14
5. Metodologia	15
5.1. Microrganismos utilizado no estudo.....	15
5.1.1. Identificação de levedura.....	15
5.1.2. Análise filogenética.....	16
5.1.3. Fermentação sobre condição de oxigênio limitado.....	16
5.1.4. Fermentação em hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar	17
5.1.5. Análise de HPLC	17
5.1.6. Cálculo de rendimento e produtividade	18
6. Resultados e Discussão.....	18
6.1. Identificação de levedura.....	18
6.2. Assimilação de xilose.....	20
6.3. Fermentação de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar	24
7. Capítulo II: Tolerância de leveduras <i>Saccharomyces</i> e não- <i>Saccharomyces</i> a inibidores de hidrolisados lignocelulósico.	28
7.1. Objetivo geral:	28
7.1.1. Objetivos específicos:	28

8.	Metodologia	29
8.1.	Microrganismos utilizados no estudo	29
8.2.	Meio de cultura.....	29
8.3.	Inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos	30
8.4.	Curvas de crescimento	31
8.5.	Heat map (Mapa de calor).....	31
8.6.	Fermentações em condições de aeróbicos	32
8.7.	Análise de HPLC/UHPLC	32
9.	Resultados e Discussão.....	34
9.1.	Desempenho das leveduras na presença dos inibidores de hidrolisado.....	34
9.2.	Fermentações comparativas em glicose na presença de inibidores (<i>Saccharomyces</i>).....	40
9.3.	Fermentações comparativas em glicose na presença de inibidores (não- <i>Saccharomyces</i>).....	43
9.4.	Fermentações comparativas em xilose na presença de inibidores (não- <i>Saccharomyces</i>).....	46
10.	Conclusões.....	53
11.	Referência	54
	Apêndice A: Curvas de crescimento na presença de inibidores das leveduras <i>Saccharomyces</i> e não-<i>Saccharomcyes</i>	67
	Apêndice B: Publicações Elaboradas	81

1. Introdução

Nos últimos anos, devido à crescente preocupação com o meio ambiente, preços e a escassez dos combustíveis fósseis em âmbito mundial, o uso de fontes de energias renováveis tem ganho cada vez mais atenção. O uso de energias renováveis visa a substituição dos combustíveis fósseis e a obtenção de diversos produtos de interesse com alto valor agregado (ANDRADE; CARVALHO; SOUZA, 2010).

Nesse contexto, a biomassa lignocelulósica obtém destaque como fonte de energia renovável, a fim de ser utilizada na indústria, como, por exemplo, pelas biorrefinarias. As biorrefinarias têm como objetivo principal otimizar os recursos a partir dos resíduos, de forma sustentável, minimizando seus impactos no meio ambiente (OLIVEIRA, 2016). No Brasil, as biorrefinarias que se baseiam na biomassa da cana-de-açúcar, por exemplo, geram produtos de interesse econômico, como: eletricidade, açúcar, levedura para ração animal e combustível (OLIVEIRA, 2016; RODRIGUES, 2011).

A partir da biomassa lignocelulósica é possível obter o hidrolisado lignocelulósico, por meio de um pré-tratamento escolhido conforme o tipo de biomassa a ser trabalhada. Durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, ocorre a liberação de açúcares fermentescíveis como a glicose e a xilose, juntamente com a formação e liberação de inibidores. Estes compostos podem ser agrupados em ácidos orgânicos, furaldeídos e compostos fenólicos (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008; FONSECA, 2009; MACHADO, 2013; RODRIGUES, 2011).

Os inibidores afetam as vias metabólicas dos microrganismos durante os bioprocessos, agindo principalmente nas vias da glicólise e no ciclo do ácido cítrico. Assim, levam à diminuição do crescimento celular e à queda da produção do produto de interesse. Isso ocorre devido ao efeito negativo dos inibidores sobre o pH intracelular, inibição de enzimas e processos metabólicos, e a perda da integridade da membrana, entre outros efeitos (ALMEIDA et al., 2007; CASPETA; CASTILLO; NIELSEN, 2015).

Alguns microrganismos como as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são conhecidos por tolerar os inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico em maiores níveis que bactérias (LIU; SLININGER; GORSICH, 2005). Entretanto, o não consumo natural de pentoses, como a xilose, presente no hidrolisado, dificulta o uso de leveduras *Saccharomyces* em bioprocessos que visam utilizar tal hidrolisado como substrato (BERGMANN et al., 2019; JOHANSSON; XIROS; LARSSON, 2014).

Algumas leveduras não-*Saccharomyces* aptas a consumir a xilose presente no hidrolisado tem sido descritas. No entanto, dados comparativos sobre a tolerância dessas leveduras aos inibidores presentes em hidrolisados ainda são escassos na literatura. Estudos envolvendo apenas inibidores isolados como vanilina e seringaldeído (CORTEZ; ROBERTO, 2010), 5-hidroximentil-furfural (HMF) e furfural (BLOMQVIST et al., 2011; MUKHERJEE et al., 2017; RUYTERS et al., 2015), são relatados. Em adição, poucos estudos comparativos entre *Saccharomyces* e não - *Saccharomyces* foram realizados (PANDEY et al., 2019).

Assim, a identificação de leveduras não-*Saccharomyces* que sejam tolerantes aos inibidores e aptas a utilizar a xilose abre perspectivas na produção de produtos gerados a partir do hidrolisado lignocelulósico como fonte de matéria-prima (FERREIRA et al., 2011).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica é composta por três componentes principais: pela celulose, hemicelulose e lignina, sendo que a concentração de cada um desses componentes varia de espécie para espécie de vegetal. A lignocelulose está presente nas células dos vegetais, dando sustentação à parede celular, conforme demonstrado na Figura 1 (PETRECHEN, 2017; ZAMPIERI, 2011).

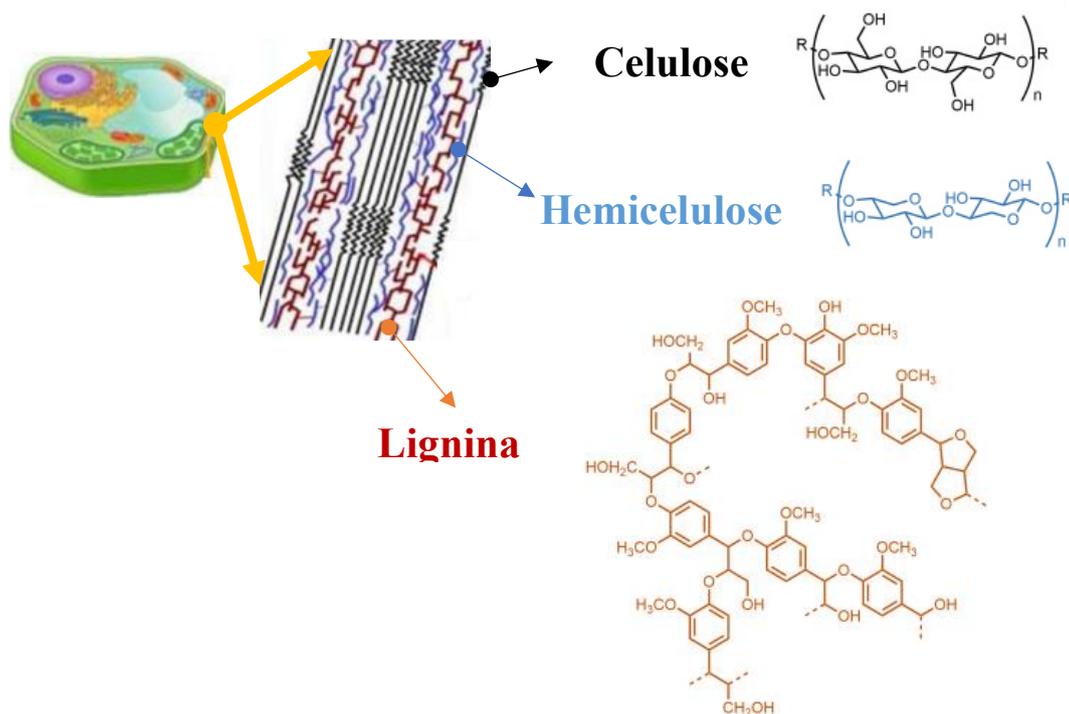


Figura 1. Estrutura básica da composição, da biomassa lignocelulósica, demonstrando a lignina, hemicelulose e celulose, distribuídas em um tecido vegetal.

A celulose é o polissacarídeo mais abundante encontrado na Terra, sendo formada por moléculas de glicoses, que estão ligadas umas às outras por ligação β -1,4 e pode ser hidrolisada por enzimas celulases (BERGENSTRÄHLE et al., 2010).

A hemicelulose é composta por diferentes tipos de carboidratos (ZAUTSEN, 2011). Os principais açúcares encontrados são as pentoses, açúcares de cinco carbonos (arabinose e xilose) e as hexoses (glicose, galactose e manose), que estão ligadas umas às outras por ligações glicosídicas (ZAMPIERI, 2011). Dentre as pentoses, a xilose corresponde a cerca de 30% da biomassa lignocelulósica (PETRECHEN, 2017).

A lignina é uma macromolécula amorfa com caráter hidrofóbico e aromático, além de possuir um alto grau de polimerização de suas unidades básicas denominadas fenilpropano (ZAUTSEN, 2011). O fenilpropano consiste em um anel aromático e uma cadeia lateral alifática de três carbonos, em que a composição da cadeia lateral é distinta, variando de espécie para espécie (PETRECHEN, 2017). A lignina faz ligações químicas com a hemicelulose e a celulose, de forma a dar rigidez à parede celular dos tecidos vegetais (ZAMPIERI, 2015).

Sabendo que a composição da biomassa lignocelulósica é rica em açúcares fermentescíveis, é possível, por meio de etapas de para acessar esses açúcares como hidrólise de celulose, uso de enzimas para quebra das ligações glicosídicas; hidrólise de hemicelulose que usa uma variedade de enzimas para realizar essa etapa e degradação da lignina que age a na ação dos componentes inorgânicos e orgânicos tendo as lignases atuando sobre essa estrutura (MACHADO, 2013).

Além disso é necessário um pré-tratamento e hidrólise de biomassas como palha de milho, bagaço de cana, palha e/ou casca de arroz, restos de madeira, entre outros, extrair esses açúcares e obter o hidrolisado lignocelulósico rico em açúcares, para utilização em bioprocessos (CANILHA et al., 2009; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

2.2. Hidrolisado lignocelulósico

O hidrolisado lignocelulósico tem sua origem nos resíduos de plantas florestais e/ou resíduos agroindustriais que são reaproveitados pelas biorefinarias a fim de obter produtos com alto valor agregado como o xilitol e o etanol (BAÊTA, 2016; SOARES; ALMEIDA, 2018).

O hidrolisado de bagaço de cana é composto principalmente de 45% de hexoses, cerca de 25% de pentoses como a xilose açúcar a qual as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* não estão aptas a consumir naturalmente e 20% de lignina, como demonstrado na tabela 1 (BERGMANN et al., 2019; FONSECA, 2009). Sendo assim é necessário liberar esses açúcares com um pré-tratamento e optar por utilizar leveduras que sejam aptas a consumir xilose (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008; MOURO, 2012; ZANCANARI, 2012).

Tabela 1. Composição de diferentes resíduos agrícolas.

Resíduos	Hexoses (%)	Pentoses (%)	Lignina(%)
Bagaço de cana-de-açúcar	45	25	20
Palha de cevada	40	20	15
Sabugo de milho	42	39	14
Casca de amendoim	38	36	16
Palha de arroz	32	24	13
Casca de arroz	36	15	19
Palha de trigo	30	24	18

Fonte: (FONSECA, 2009)

2.3. Assimilação de xilose e produção de xilitol

A xilose é uma das fontes de carbono mais abundantes da biomassa lignocelulósica chegando a compor cerca de 30% da hemicelulose (ZAUTSEN, 2011). Ela pode ser obtida por meio do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica e ser empregada em diferentes bioprocessos como, por exemplo, na produção de etanol de segunda geração e xilitol (ALBUQUERQUE et al., 2014).

O xilitol é um metabolito secretado durante a assimilação de xilose (Figura 2) e é de grande interesse industrial como, por exemplo, das indústrias odontológicas, farmacêuticas e alimentícias, uma vez que apresenta propriedades anticariogênicas e edulcorantes (ALBUQUERQUE et al., 2014; CARNEIRO; E SILVA; ALMEIDA, 2019; TRICHEZ et al., 2019).

O metabolismo de xilose em leveduras se inicia pela ação da enzima xilose redutase, que reduz a molécula de xilose a xilitol com o auxílio de cofatores NAD(P)H^+ . Diversas xiloses redutases estão descritas na literatura que facilitam e/ou aumentam a assimilação da própria xilose para a conversão em xilitol e/ou etanol, aumentando a captação natural de xilose pela levedura (BIER et al., 2007; SERPA, 2016).

O xilitol produzido é oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase com o auxílio do cofator $\text{NAD(P)}^+\text{H}$ (KOTTER; CIRIACY, 1993; SERPA, 2016). A xilulose produzida é fosforilada em xilulose-5-fosfato pela ação da enzima xilulose quinase, a qual é metabolizada pela via das pentoses fosfato, seguindo para via da glicólise e formando o etanol como produto final Figura 2 (BIER et al., 2007; FUGITA, 2010; WOHLBACH et al., 2011). Em alguns casos, a levedura pode vir a secretar o xilitol produzido antes de ser oxidado a xilulose (FUGITA, 2010).

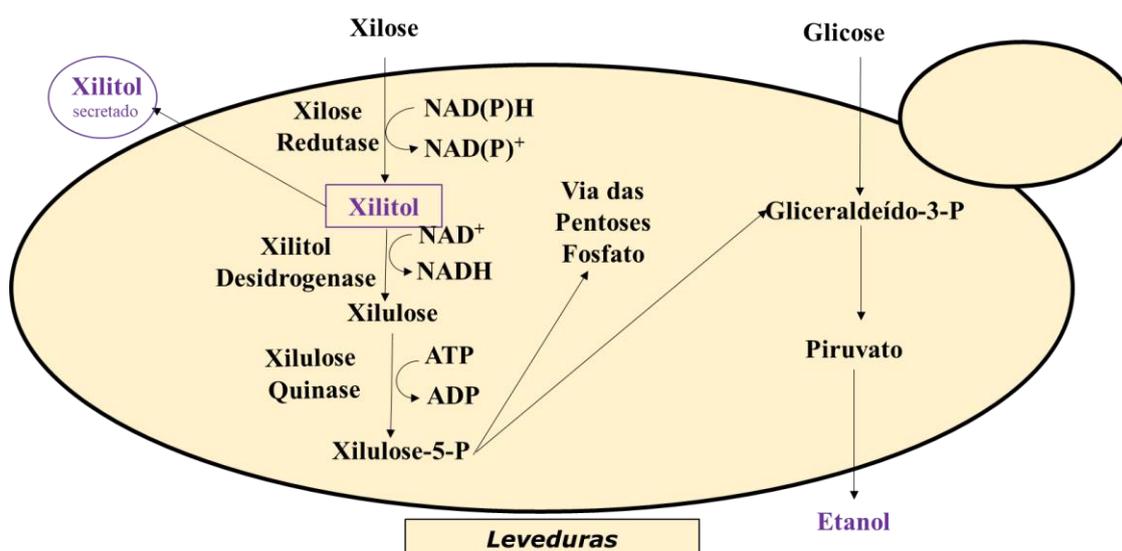


Figura 2. Esquema geral mostrando as rotas de conversão da xilose pela via de oxirredução, e as vias de formação de xilitol, xilulose-5-P e etanol.

Fonte: Adaptado de Wohlbach et al., 2011

2.3.1. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica e inibidores

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma das etapas essenciais para transpor barreiras químicas e físicas que dificultam o acesso aos açúcares nela disponíveis, devido à alta resistência da composição da biomassa lignocelulósica (MOSIER et al., 2005). Os diferentes tipos de pré-tratamento existentes têm como objetivo diminuir a resistência do material com a quebra da lignina, hemicelulose e facilitar a desconstrução do arranjo cristalino da celulose (ALVIRA et al., 2010; MACHADO, 2013).

É necessário adequar o tipo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica conforme a característica apresentada pela matéria-prima selecionada para o processo fermentativo. Cada pré-tratamento selecionado tem uma ação específica para as frações de hemicelulose, celulose e lignina e em geral são realizados um determinando tipo de pré-tratamento para em seguida ser realizada a hidrólise enzimática dos constituintes da biomassa (MACHADO, 2013).

O processo de pré-tratamento mais comumente utilizado em 2011 foi o método físico-químico de explosão a vapor seguido de uma hidrólise ácida (ZAUTSEN, 2011). Nesse tipo de pré-tratamento, a biomassa é exposta a altas temperaturas, em geral de 120 °C a 160 °C, o processo de explosão a vapor consiste basicamente em submeter a

biomassa a alta temperatura e pressão (utilizando água), seguido de uma ruptura mecânica dos materiais pré-tratados, seguida de uma hidrólise ácida com ácido sulfúrico 1,5% diluído em água. (CANILHA et al., 2009; CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008).

Outros tipos de pré-tratamentos variam conforme o tipo de biomassa escolhida e qual fração da lignocelulose se pretende realizar a hidrólise. Alguns desses pré-tratamentos são o pré-tratamento o microbiológico que gera coprodutos de interesse formando quantidades mínimas de resíduos (MACHADO, 2013).

O pré-tratamento químicos que tendem a solubilizar a hemicelulose e lignina elevando a exposição da celulose ao ataque enzimático, sendo a hidrólise de ácido diluído mais eficaz na solubilização da fração hemicelulósica. Pré-tratamento com água em altas temperaturas que geralmente é utilizada entre 130 e 250 °C, pode apresentar resultados de extração da hemicelulose comparáveis aos ácidos diluídos. (CANILHA et al., 2009; CARDOSO et al., 2012; CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008; MACHADO, 2013).

Durante as etapas de pré-tratamento e hidrólise, a biomassa pode sofrer uma perda considerável dos açúcares presentes na matéria-prima e levar à formação e liberação de inibidores, que afetam negativamente o metabolismo microbiano (MEIGHAN, 2016). Esse efeito negativo no microrganismo pode acarretar na queda de produção do produto de interesse, durante os bioprocessos (ALMEIDA et al., 2007). Os inibidores formados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica são agrupados em três classes principais: ácidos orgânicos, compostos furaldeídos e compostos fenólicos, como demonstrados na Figura 3.

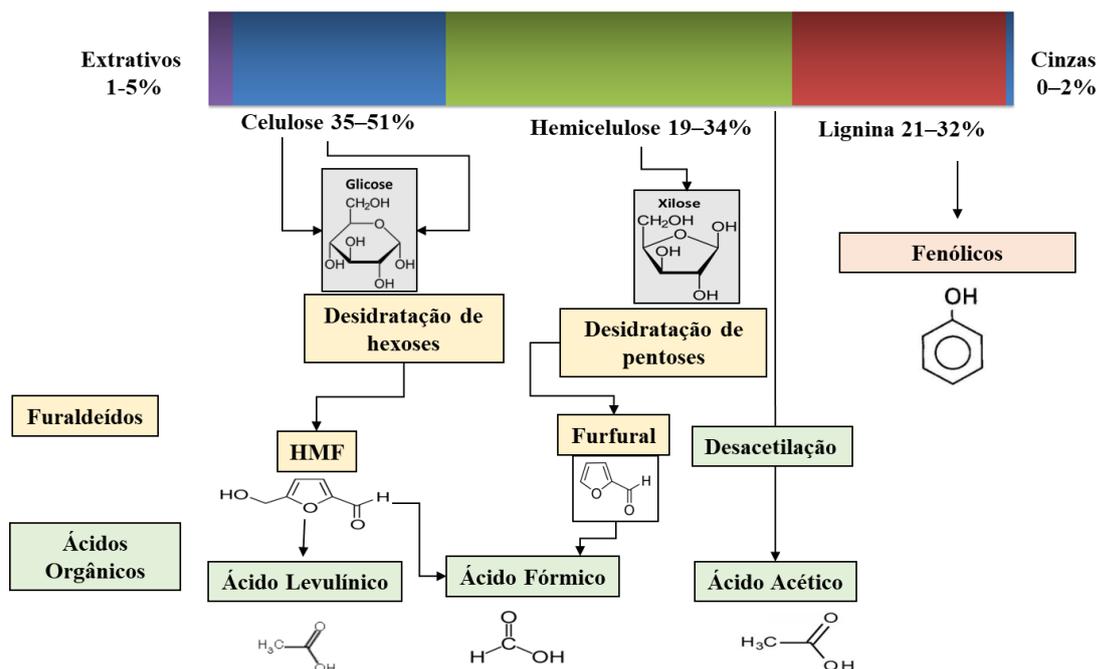


Figura 3. Esquema demonstrando origem dos inibidores a partir do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Fonte: Adaptado de (ALMEIDA et al., 2007)

2.3.1.1. Ácidos orgânicos, Compostos Furaldeídos e Compostos Fenólicos

Os ácidos orgânicos são ácidos naturalmente encontrados em todos os organismos e possuem em sua estrutura um grupo carboxila em geral de baixo peso molecular que são utilizados em seus processos do ciclo de solo como, por exemplo, na destoxificação de metais no solo pelas plantas e absorção de nutrientes por microrganismos (JONES, 1998). São caracterizados por liberarem prótons do seu grupo carboxila em água. São encontrados em suas formas não dissociadas, ou seja, lipossolúveis, sendo capazes de difundir pela membrana citoplasmática (JONES et al., 2003).

Uma vez no citoplasma, os ácidos orgânicos são dissociados devido ao pH do citoplasma (~7,5), e provocam uma redução do pH intracelular em níveis abaixo do limite tolerável pelo microrganismo (FONSECA, 2009). Ao reduzir o pH intracelular do microrganismo, o acúmulo de prótons no citoplasma leva a um efeito inibitório do crescimento microbiano (ALMEIDA et al., 2007). Os principais ácidos orgânicos formados na hidrólise da biomassa lignocelulósica são o ácido acético, o ácido fórmico e o ácido levulínico (CASPETA; CASTILLO; NIELSEN, 2015).

O ácido acético é um importante composto inibitório do hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar, atuando sobre a fase lag do metabolismo microbiano e afetando o pH intracelular (ALMEIDA et al., 2007). A concentração desse composto depende da fonte de carbono e do método de pré-tratamento empregado (DEPARIS et al., 2017). Além do ácido acético, o hidrolisado pode conter outros inibidores como os furaldeídos furfural e HMF, os quais, combinados, podem afetar todo o metabolismo e a fermentação da levedura (ALMEIDA et al., 2008).

Os compostos furaldeídos são estruturas aromáticas de cinco carbonos de baixa solubilidade em água e de aspectos transparentes, tendo os principais compostos desse grupo o furfural e o HMF (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988). O HMF é formado pela desidratação das hexoses, enquanto o furfural é formado da desidratação das pentoses (ALMEIDA et al., 2007; DUNLOP, 1948; ULBRICHT, 1984).

Os furaldeídos (HMF e furfural) provocam a perda da integridade da membrana e atuam sobre a fase lag, do microrganismo elevando o seu tempo de adaptação as condições do meio em que se encontra devido a presença do inibidor. Isso afeta todo o metabolismo microbiano ao longo do processo e como consequência provoca uma queda na produção dos produtos de interesse (AKILLIOGLU; MOGOL; GÖKMEN, 2011; ALMEIDA et al., 2009; BAPTISTA, 2013).

Os compostos fenólicos apresentam um anel aromático em sua estrutura e são gerados a partir da quebra da lignina durante a fase de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (ALMEIDA et al., 2007; CASPETA; CASTILLO; NIELSEN, 2015; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Os compostos mais estudados são a vanilina, o seringaldeído (CORTEZ; ROBERTO, 2010), os ácidos ferúlico e cumárico (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2007; XU et al., 2005).

Estes compostos fenólicos, atuam sobre a membrana citoplasmática, afetando a sua integridade e a capacidade seletiva da membrana (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). A presença dos compostos fenólicos em concentrações elevadas (p. ex. > 1,5 g/L) (LYRA COLOMBI et al., 2017) dentro da célula, atua como inibidor de crescimento agindo durante todo o seu metabolismo, provocando um aumento da fase lag e uma redução do produto de interesse (BORNEMAN; AKIN; VANESELTINE, 1986; CORTEZ; ROBERTO, 2010; LI et al., 2010; WANG et al., 2010).

Esses compostos inibitorios são amplamente encontrado nos hidrolisados lignocelulósicos, como é o caso do inibidores do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar, como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Compostos inibitórios presentes no hidrolisado de cana-de-açúcar.

Tipo de hidrolisado	Inibidor	Concentração (g/L)	Referência
Baraço de cana-de-açúcar	Ácido Acético	2 - 9	González-Ramos et al., 2016
	Ácido Fórmico	0,9 - 2,7	Hasunuma et al ., 2012
	Furfural	1,1 – 2	Martín et al., 2002
	HMF	1,7 - 7	Laandan et al. 2008
	Vanilina	0,5-2,0	Endo et al., 2008
	Seringaldeido	0,5-2,0	Cortez & Roberto, 2010
	Ácido Ferúlico	0,75 – 0,85	Mussato et al., 2007
	Ácido Cumárico	0,67 - 1	Mussato et al., 2007

2.3.2. Metabolismo de inibidores e destoxificação biológica

Os efeitos dos inibidores estão demonstrados no esquema geral da Figura 4. Em geral as células sofrem com a queda de pH intracelular, aumento da fase lag e inibição de todo o metabolismo microbiano (HASUNUMA; KONDO, 2012).

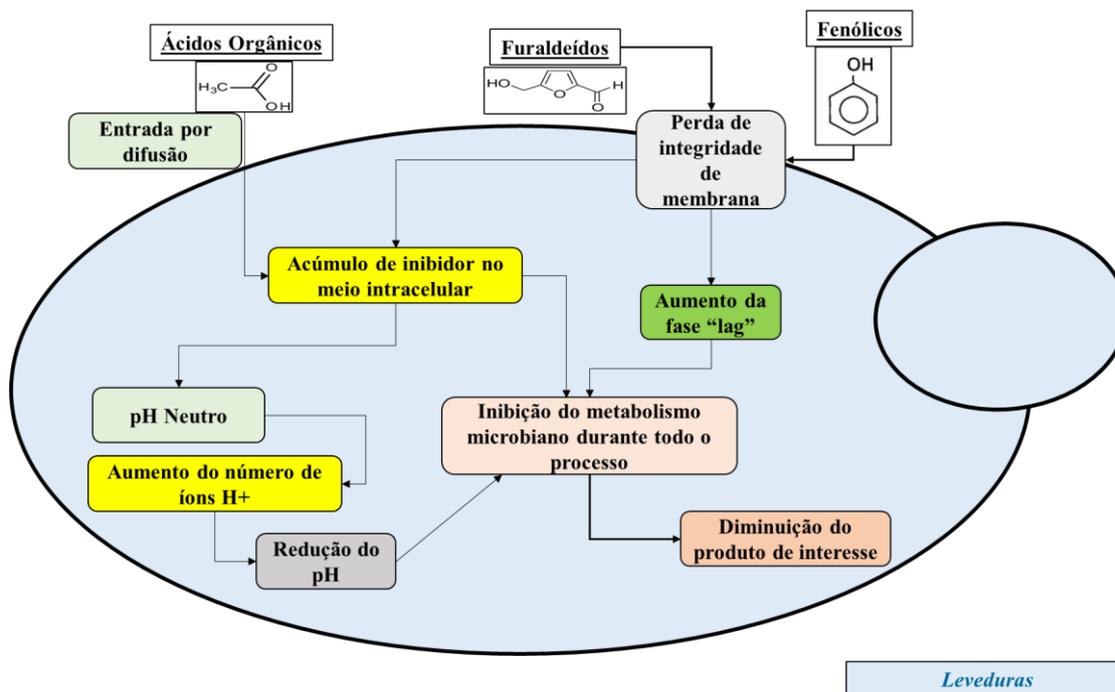


Figura 4. Esquema demonstrando de forma geral o efeito dos inibidores sobre a célula de levedura. Após causar a perda da membrana, acumulam-se no citoplasma, reduzindo o pH neutro da célula com aumento de íons H⁺, isso leva a redução do pH, aumento da fase "lag", inibição do metabolismo microbiano e pôr fim a diminuição do produto de interesse

Fonte: Adaptado de (ALMEIDA et al., 2007; HASUNUMA; KONDO, 2012).

A perda da integridade da membrana, se caracteriza pela sua capacidade de responder a permeabilidade, ou seja, selecionar o que entra e o que sai da célula. Alguns inibidores, como o ácido acético que conseguem entrar por difusão na célula, afetam a produção energética (ATP) afetando até enzimas como a hexoquinase e fosfofrutoquinase na via da glicólise, que necessitam de ATP para realizar etapas do metabolismo celular, e como consequência acarreta no prejuízo do bioprocessos e no desempenho do

microrganismo como um todo (DE MELLO et al., 2019; HASUNUMA; KONDO, 2012; PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1990).

No entanto, já é conhecido na literatura que alguns microrganismos, como as leveduras *S. cerevisiae*, conseguem de diferentes formas responder à presença dos inibidores, conforme esquema geral da Figura 5.

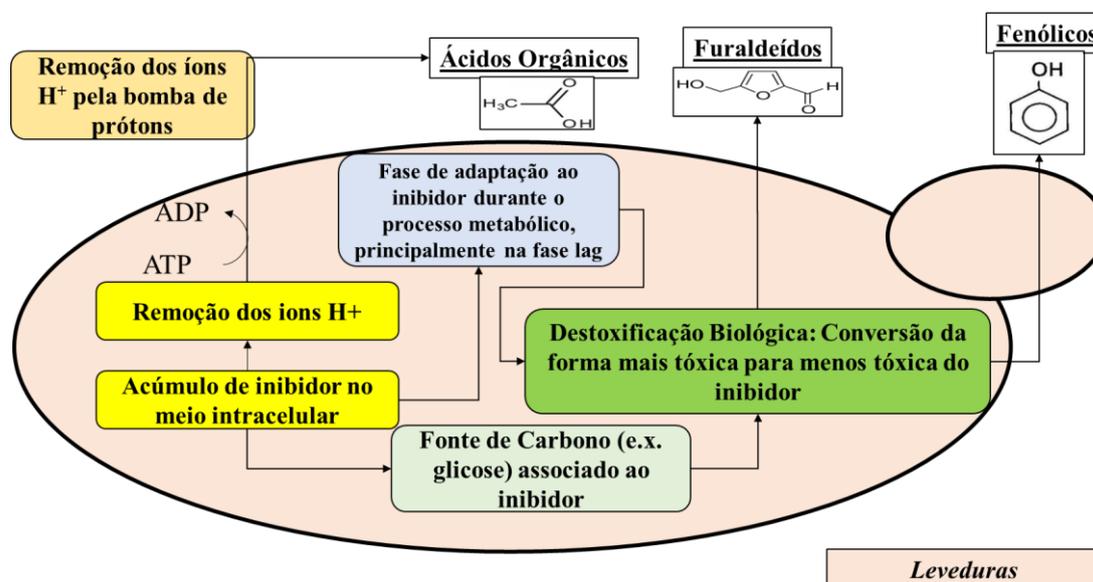


Figura 5. Esquema demonstrando, de forma geral, os mecanismos de resposta aos inibidores sobre a célula de levedura. A célula tende a remover inicialmente os íons H^+ que reduzem o pH através da bomba de prótons (CASPETA; CASTILLO; NIELSEN, 2015). Outra forma é associar o inibidor a fonte de carbono como a glicose de forma a quebrar a estrutura e facilitar a ação da destoxificação biológica (WANG et al., 2010). Ou o microrganismo se adapta ao inibidor e age sobre ele com enzimas redutases auxiliadas por cofatores para destoxificar o inibidor (LIU, 2018).

Linhagens de *S. cerevisiae* são conhecidas por realizar uma atividade de destoxificação biológica auxiliada por atividades enzimáticas e cofatores NADH e NAD(P)H (LAADAN et al., 2008). Essa atividade de destoxificação por leveduras *S. cerevisiae* permite a conversão dos inibidores HMF e furfural para uma forma menos tóxica (LIU, 2018).

O furfural é reduzido a álcool furfúrico por enzimas como Gre2p, Gre3p, Ald4p entre outras (LIU, 2018) e o HMF é reduzido a álcool hidroximetilfurfúrico, por enzimas redutases Gre2p, Ari1p, Adh6p (LIU, 2018), e já se tem uma noção dos genes que

participam da produção dessas enzimas na fase de estresse na presença desses compostos, como *YAP1*, *PDR1*, *PDR3*, *RPN4* e *HSF1* que são genes chaves e reguladores na adaptação a fase lag na presença de HMF, outros genes conhecidos são as *ADH6* e *ADH7* (AKILLIOGLU; MOGOL; GÖKMEN, 2011; MA; LIU, 2010; NGUYEN; IWAKI; IZAWA, 2015; PETERSSON et al., 2006). O foco principal da detoxificação biológica pelas enzimas redutases é reduzir danos causados pelos furaldeídos e proteger a membrana celular de danos futuros e acúmulos desses compostos no interior celular (TAHERZADEH et al., 2000).

Nos compostos fenólicos os produtos da conversão podem ser utilizados como fontes de carbono, por fungos filamentosos, leveduras e bactérias e essa taxa está fortemente influenciada a quantidade de glicose presente no meio que reduz a fase lag potencializando a biodegradação dos compostos fenólicos (SOARES, 2012; WANG et al., 2010). Um exemplo é a vanilina, que ao ser assimilado pela levedura, ativa enzimas capazes de reduzir a composto (YI et al., 2015). Essas enzimas Adh1p, Ari1p por sua vez, convertem a vanilina em vanilina álcool, como demonstrado na Figura 6 (LIU, 2018).

Destoxificação Biológica

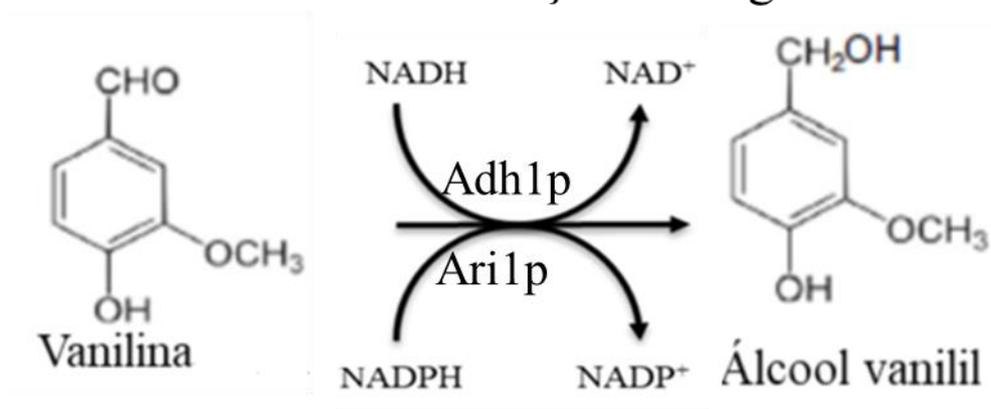


Figura 6. Exemplo de destoxificação de um inibidor fenólico por *S. cerevisiae*, ao utilizar enzimas redutases associadas com carreadores de elétrons NADH e NADPH.

Fonte: Adaptado de (LIU, 2018).

As ações dessas enzimas estão diretamente ligadas à capacidade de expressão gênica em determinada situação de estresse, como acontece com enzimas produzidas pelos genes *YAP1*, *PDR1*, *PDR3*, *PDR5*, *YAP5*, *YAP6*, *ADH7*, *ADH1*, *ADH6*, *ADH3*, *ASG1*, *SKS1*, *GIS4*, *VHF1*, *FDH1*, *ZWF1* and *PAD1* que respondem ao estresse oxidativo na presença de HMF, vanilina, ácidos acético, fórmico e ferúlico durante expressados

durante a fase lag, e dando respostas ao longo do metabolismo da levedura. Algumas dessas enzimas são apresentadas na tabela 3 (CLAUSEN et al., 1994; GONZÁLEZ-RAMOS et al., 2016; HASUNUMA et al., 2011; LIU, 2018; MA; LIU, 2010; NGUYEN et al., 2018; NGUYEN; IWAKI; IZAWA, 2015; NOGAE; JOHNSTON, 1990; PETERSSON et al., 2006; UŁASZEWSKI, 1993; VAGNOLI; BISSON, 1998; YE et al., 2006).

Tabela 3. Genes e enzimas de respostas expressos na presença de inibidores de hidrolisados lignocelulósicos

Genes expressos na presença de inibidores de hidrolisado lignocelulósico				
Genes	Levedura	Enzimas	Inibidores	Referência
<i>PDR1</i>	<i>S. Cerevisiae</i>	Pdr1p	HMF	Ułaszewski, 1993
<i>PDR3</i>		Pdr3p	Furfural/HMF	Ma & Liu, 2010
<i>PDR5</i>		Pdr5p	Furfural/HMF	
<i>YAP5</i>		Yap5p	Furfural/HMF	
<i>YAP6</i>		Yap6p	Furfural/HMF	
<i>ADH7</i>		Adh7p	Furfural/HMF	
<i>ADH1</i>		Adh1p	Furfural/HMF	
<i>YAP1</i>		Yap1p	HMF	
<i>ADH6</i>		Adh6p	HMF	Petersson et al., 2006
<i>ADH3</i>		alcohol dehydrogenase	Ácido Acético	González-Ramos et al., 2016 Vagnoli & Bisson, 1998. Ye et al., 2006
<i>ASG1</i>		H ⁺ ATPase		
<i>SKS1</i>		Hxt2		
<i>GIS4</i>		Ena1		
<i>VHF</i>		vanillin dehydrogenase activity	Vanilina	Nguyen et al., 2018
<i>ADH7</i>		Adh7p		Nguyen et al., 2015
<i>FDH1</i>		formic acid dehydrogenase	Ácido Fórmico	Hasunuma et al., 2011 Noage & Johnston, 1990
<i>ZWF1</i>		Glucose-6-phosphate dehydrogenase		
<i>PAD1</i>		Descarboxilase de ácido fenilacrilico	Ácido Ferúlico	Clausen et al., 1990

Fonte: Criado pelo autor

2.4. Leveduras com potencial biotecnológico

2.4.1. Leveduras *Saccharomyces*

A levedura *S. cerevisiae* é amplamente utilizada em diversos setores industriais, como nos setores alimentícios, na produção de pães e bebidas destiladas, e também na produção de biocombustível, como o bioetanol (REIS, 2011).

Essa levedura apresenta características específicas, como rápido crescimento quando comparada a outras leveduras, capacidade de produzir etanol, suportar variações de temperatura e tolerância a altas concentrações de açúcar (> 55 %) (RUYTERS et al.,

2015) e sobrevivência em níveis baixos de oxigênio (0,5% de saturação) (STECKELBERG; ANDRIETTA, 2001).

As linhagens de leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 e JP1 apresenta ampla adaptação a ambientes industriais, além de serem excelentes produtoras de etanol (ANTONANGELO, 2012; CHANDEL, 2018; DA SILVA FILHO et al., 2005; HOWELL et al., 2004). A *S. cerevisiae* JP1 destaca-se das demais leveduras comerciais utilizadas pela indústria por apresentar um aspecto fisiológico que garante a essa linhagem uma grande adaptação às diferentes condições citadas acima (DELLA-BIANCA et al., 2013; REIS et al., 2012).

Apesar de não ser uma das preferidas de ser usada nas indústrias de fermentação de etanol devido a sua produção de glicerol, que é acumulado no interior celular provocando a queda do etanol produzido no final do bioprocessos, essa adaptação pode vir como uma proteção natural das leveduras *S. cerevisiae* ou até mesmo da *S. cerevisiae* JP1 na presença dos inibidores de hidrolisado lignocelulósico, como por exemplo, na presença de vanilina (DE MELO, 2006; LYRA COLOMBI et al., 2017; REIS et al., 2012)

Em estudos voltados para o uso do hidrolisado as linhagem JP1 e PE-2 avaliadas em hidrolisado de batata doce demonstraram que a linhagem PE-2 apresentou uma viabilidade celular com rendimentos de 4,5 e 6,4% superior a linhagem JP1, no entanto a linhagem JP1 apresenta tolerância a ser afetada por inibidores de hidrolisado como a vanilina numa concentração de 1,5 g/L (LYRA COLOMBI et al., 2017; PAVLAK et al., 2011).

Em estudo com hidrolisado de cana de açúcar além dos inibidores serem um fator limitante no processo metabólico das leveduras, como inibidores ácido acético, Furfural e HMF e outros fatores são tão limitantes quanto. Como é o caso da alta concentração de etanol (44,73 g/L) em um ciclo de fermentação de batelada repetida, mesmo sabendo que algumas leveduras, como a linhagem *S. cerevisiae* JP1 pode tolerar concentrações de até 56,4 g/L, sendo uma excelente cepa para se trabalhar na presença do hidrolisado lignocelulósico (ALMEIDA et al., 2007; DA SILVA FILHO et al., 2005; PEREZ et al., 2018).

A estudos na literatura que confirmam a capacidade natural de linhagens de *S. cerevisiae* de tolerar concentrações variadas conforme o tipo de inibidor. Como é o caso de cepas adaptadas geneticamente e por evolução adaptativa, para tolerar até 9 g/L de ácido acético (GONZÁLEZ-RAMOS et al., 2016) ou testar a viabilidade de crescimento de linhagens industriais na presença de compostos fenólicos (LYRA COLOMBI et al.,

2017). Mesmo assim outro fator limita o uso de leveduras *Saccharomyces* no hidrolisado, que é o não uso natural de xilose como fonte de carbono presente em abundância no hidrolisado lignocelulósico (BERGMANN et al., 2019; DU PLESSIS et al., 2017; MACHADO, 2013).

2.4.2. Leveduras não-*Saccharomyces*

O termo “Leveduras não-*Saccharomyces*” originou-se no livro “*Yeast: A Taxonomic Study*” (KURTZMAN, 2011), em que são agrupadas espécies de leveduras ascomicetas com importante potencial biotecnológico. Essas leveduras são estudadas e aplicadas em diferentes setores industriais, como pesquisas biomédicas, produção heteróloga de proteínas, produção de fármacos, biorremediação, vacinas, entre outros (JOHNSON, 2013).

Dentre algumas espécies de leveduras não-*Saccharomyces* descritas na literatura, que são naturalmente capazes de consumir a xilose e que podem ser ótimos modelos de estudo para tolerância aos inibidores de hidrolisado, destacam-se: *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*), *Meyerozyma guilliermondii* (*Candida guilliermondii*/ *Pichia guilliermondii*), *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora passalidarum* e *Candida tropicalis* sendo essas leveduras da família *Debaryomycetaceae* e podem ser semelhantes quando comparadas entre si conforme figura 7 (CADETE et al., 2009; CÉSAR; BIER, 2007; KURTZMAN; SUZUKI, 2010; NGUYEN et al., 2006; PANDEY et al., 2019; RAO et al., 2006; WOHLBACH et al., 2011).

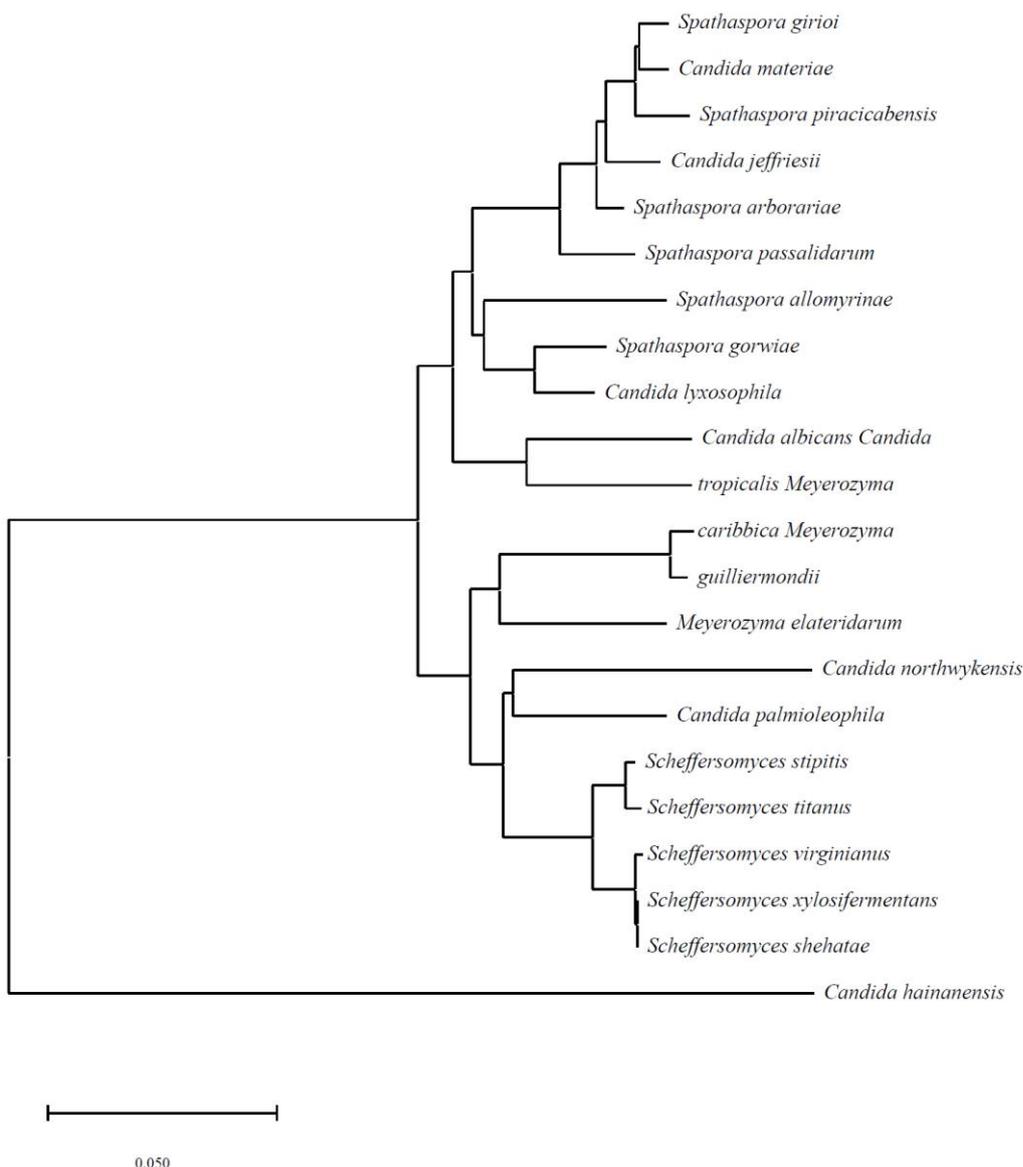


Figura 7. Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). A árvore ideal é mostrada. A árvore é desenhada em escala, com os comprimentos dos ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método da Máxima Verossimilhança Composto (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004) e estão nas unidades do número de substituições de base por site. Esta análise envolveu 22 sequências de nucleotídeos. As posições de códon incluídas foram 1^a + 2^a + 3^a + Não codificantes. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequência (opção de exclusão em pares). Havia um total de 627 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X (KUMAR et al., 2018).

Fonte: Criado pelo autor

A levedura *S. stipitis* é uma levedura aeróbica capaz de crescer, utilizando diferentes fontes de carbono, dentre eles glicose, xilose e galactose. É capaz de produzir etanol em concentrações variadas de xilose como demonstrado na tabela 4. Essa levedura também pode vir a ser utilizada como um modelo de microrganismo, para realizar experimentos de engenharia metabólica, devido à eficiência das enzimas Xilose redutase (XR) e Xilitol desidrogenase (XDH) presentes em seu metabolismo (JIN et al., 2000; LEE et al., 2000; SERPA, 2016; YEON et al., 2011). Para ter um alto desempenho fermentativo, requer condições micro aeróbicas bem controladas no processo de fermentação. Devido a condições como essa, o seu uso se torna difícil em larga escala na indústria (KWEON, 1993).

Tabela 4 Capacidade fermentativa da *S. stipitis* em condições mínimas.

Concentração de Xilose (g/L)	30	50	90	130	170
Peso seco (g/L)	7	7	8,4	7,1	5,1
Concentração de etanol (g/L)	12,3	17,7	29,1	31,8	26,4
Rendimento de etanol (g/g)	0,37	0,36	0,33	0,29	0,26
Xilitol (g/L)	ND*	0,81	4,8	11,8	5,7

* Não detectado

Fonte: Adaptado de (LEE et al., 2000)

A levedura *S. passalidarum* Y-27907 foi isolada de uma amostra de larva de besouro que se alimentava de madeira. Essa levedura não só abrange uma nova espécie, como também um novo gênero (NGUYEN et al., 2006). É naturalmente capaz de consumir xilose e fermentar a etanol, tendo um rendimento superior ao da *S. tipitis*, chegando a 0,42 g/g (CAMPOS, 2015).

Nesse sentido, a levedura *S. arborariae* foi isolada de uma amostra de madeira podre coletada no Parque Nacional da Serra do Cipó, localizada em Minas Gerais – Brasil. Essa levedura como pertencente ao gênero *Spathaspora* apresenta características semelhantes à espécie *S. passalidarum*, pois ambas são capazes de consumir e converter xilose a etanol.

Outro aspecto é a capacidade excelente de fermentar xilose que tendo um rendimento semelhante ao da *S. passalidaum* chegando a 0,32 g/g como demonstrado na tabela 5 (CADETE et al., 2009; CAMPOS, 2015).

Tabela 5. Tabela comparativa entre leveduras fermentadoras de xilose.

Levedura	<i>S. stiptis</i>	<i>S. passalidarum</i>	<i>S. arborariae</i>
Concentração de Xilose (%)	10	10	10
Yet (g/g)	0,37	0,42	0,32
Glicerol (g/L)	*ND	*ND	1,46
Xilitol (g/L)	*ND	*ND	1,04

***ND = Não Detectado**

Fonte: Adaptado de (CAMPOS, 2015).

Por sua vez, a levedura *M. guilliermondii*, apresenta semelhanças com outras leveduras do gênero *Candida*, quanto ao seu crescimento e capacidade de consumir diferentes fontes de carbono (MAGUIRE et al., 2013). O genoma da *M. guilliermondii* apresenta diferenças, como por exemplo uma sequência de 10,6 Mb de genoma sequenciado quando comparado ao de outras leveduras dos gêneros *Candida* e *Pichia* que tem genes maiores cerca de 15,4 Mb (WOHLBACH et al., 2011). Devido a essas diferenças em seu genoma, do nome original *C. guilliermondii* passou a ser classificada como *P. guilliermondii* e depois como *M. guilliermondii* (KURTZMAN; SUZUKI, 2010).

Diferentes leveduras do gênero *Candida* são consideradas patogênicas em humanos, sendo que cerca de 90% das infecções são atribuídas a cinco espécies principais, sendo elas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (PFALLER; DIEKEMA, 2007; SILVA et al., 2012).

Dentre essas cinco leveduras, a *C. tropicalis*, apesar de ser uma levedura considerada patogênica em humanos, possui algumas linhagens que podem ser isoladas de amostras de solo (RAO et al., 2004) e apresentam um alto potencial biotecnológico, uma vez que a levedura é capaz de consumir a xilose a partir do hidrolisado lignocelulósico, como é o caso da espécie *C. tropicalis* JA2 (MORAIS JUNIOR et al., 2019).

As leveduras possuem como fonte de carbono principal a glicose para realizar diversos bioprocessos. No entanto seja por engenharia metabólica seja naturalmente algumas linhagens podem consumir e fermentar xilose como fonte de carbono. Soares (2015) descreveu que leveduras consumidoras de xilose tem o potencial de produzir

xilitol ao consumir xilose enquanto que leveduras fermentadoras de xilose possuem o potencial de produzir etanol ao consumir xilose.

No estudo de Soares et al., 2020 foi demonstrado que as leveduras não-*Saccharomyces* sendo elas *S. passalidarum* e *S. stipitis* são sensíveis a diferentes inibidores de hidrolisado lignocelulósico dentre eles o ácido acético, HMF, furfural e a vanilina em concentrações que variam de 0,5 a 4 g/L e mesmo assim na presença do hidrolisado de cana de açúcar foi possível obter 23 g/L e 17 g/L de etanol pela *S. passalidarum* e *S. stipitis* respectivamente.

No uso de hidrolisado de bagaço de cana outro subproduto a ser obtido é o xilitol, sendo assim algumas linhagens de não – *Saccharomyces* apresentam um bom potencial biotecnológico para a produção de xilitol como, por exemplo, a levedura *M. guilliermondii* B12 que tem um rendimento de até $Y_{p/s} = 0,60$ g/g no hidrolisado de bagaço de cana de açúcar mesmo sendo considerado sensível a concentração de ~6g/L de ácido acético que é um inibidor de hidrolisado lignocelulósico (CARNEIRO; E SILVA; ALMEIDA, 2019).

A levedura *C. tropicalis* JA2 foi selecionada por seu desempenho de crescimento em hidrolisado de bagaço de cana chegando a rendimentos de 0,47 g/g além de consumo de xilose ser eficiente. Esta levedura é capaz de produzir 109,5 g/L de xilitol na presença de hidrolisado com um rendimento de 0,86 g/g e produtividade de 2,81 g/L (MORAIS JUNIOR et al., 2019).

2.4.3. Sequenciamento de DNA de levedura

O DNA ribossômico de leveduras usado para a identificação de diferentes espécies é composto pelas seguintes estruturas: uma subunidade menor 18S, o espaço interno transcrito 1 (ITS1), a subunidade do gene 5.8S, o espaço interno transcrito 2 (ITS2) o gene 28S onde se encontra a região de domínio D1/D2 e uma subunidade maior 28S (ATKINS; CLARK, 2004; SOARES, 2015).

A região do gene ITS é um dos genes mais favoráveis para a identificação de leveduras uma vez que esta região apresenta aproximadamente 800 pares de base além de apresentar ampla variabilidade entre espécies, o que facilita essa região ser amplificada com primers universais tais como NL1/NL4 e ITS1/ITS4, conforme demonstrado na

figura 8 (ATKINS; CLARK, 2004; KURTZMAN; ROBNETT, 1998; MIRHENDI et al., 2006; SOARES, 2015).

Essas regiões conservadas D1/D2 e ITS5.8S, são usadas para a construção dos banco de dados conhecidos como o YEASTip que contém uma série de sequência de outras leveduras para comparação e construção de árvores filogenéticas (TRICHEZ et al., 2019; WEISS et al., 2013). Atualmente a identificação de leveduras tem mais de uma abordagem chegando a incluir outras metodologias de identificação como por proteína como, por exemplo, por espectrometria de massas ou pela junção de metodologias como a caracterização fisiológica e perfis fermentativos (SOARES, 2015).

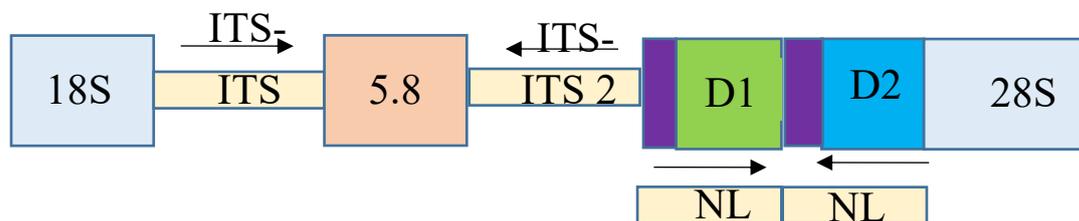


Figura 8. Região do DNA ribossômico utilizado na identificação de leveduras. Em destaque a região D1/D2 que fica dentro do 28S.

Fonte: Criado pelo autor.

Em 2015 no trabalho realizado por Soares (2015) intitulado “**Caracterização de leveduras consumidoras de xilose por espectrometria de massa MALDI-TOF**”, foram selecionadas cerca de 10 linhagens selvagens de leveduras consumidoras de xilose. Dentre as dez leveduras duas se destacaram como ótimas consumidoras de xilose sendo identificadas inicialmente como cepas JA1 e JA9. As identificações e o desempenho dessas linhagens serão avaliados neste trabalho.

3. Justificativa

Ao se trabalhar com hidrolisado lignocelulósico como fonte de matéria-prima em bioprocessos, visando obter produtos de alto valor agregado, é necessário o uso em conjunto de microrganismos adaptados a condições específicas, como as estabelecidas pelos parâmetros industriais tais como, tolerar variação de pH, suportar altas temperatura, tolerar altas concentrações de açúcares (>100 g/L) entre outros.

O hidrolisado como fonte de carbono, apresenta açúcares como a xilose em grande quantidade cerca de 30%, além da presença de diferentes inibidores que variam em quantidade conforme a biomassa e o pré-tratamento escolhidos.

Apesar de já existir na literatura estudos que demonstram estratégias na destoxificação dos inibidores presentes no hidrolisado, ainda não se tem um organismo-modelo capaz de consumir a xilose e ser capaz de tolerar de forma gradativa aos inibidores de hidrolisado.

Este trabalho se justifica, então, por trazer estratégias na busca por conhecer a resposta fisiológica a tolerância aos inibidores, bem como na busca por organismos-modelos também capazes de consumir a xilose.

4. Capítulo I: Identificação de cepas isoladas de madeira em decomposição

4.1.1. Objetivo Geral

Identificar taxonomicamente e caracterizar o perfil fermentativos de novas cepas de leveduras isoladas de madeira em decomposição do Cerrado Brasileiro.

4.1.2. Objetivos específicos:

4.1.2.1. Identificar as linhagens de leveduras selvagens JA1 e JA9, isoladas de amostras de madeira em decomposição;

4.1.2.2. Caracterizar e identificar o potencial biotecnológico de produção de xilitol das leveduras JA1 e JA9 por meio do perfil fermentativo em meios suplementados com: xilose, misturas de xilose e glicose, e em hidrolisado de cana-de-açúcar;

5. Metodologia

5.1. Microrganismos utilizado no estudo

As leveduras selvagens utilizadas neste experimento foram obtidas por meio do isolamento de uma amostra de madeira em decomposição na propriedade da Embrapa Cerrados, Brasília – Distrito Federal, Brasil (15°35'36.1"W047°44'28.2") (SOARES, 2015).

As leveduras foram isoladas em meio de cultura sólido Yeast Peptone Dextrose/ Extrato de levedura peptona Dextrose (YPD) 20g/L, composto por extrato de levedura 1% peptona bacteriológica 2%, glicose 2% e foram nomeadas JA1 e JA9.

Foram usadas como leveduras controles nos experimentos de fermentação as linhagens *Spathaspora passalidarum* Y-27907 e *Meyerozyma guilliermondii* Y-324 e *Candida tropicalis* JA2 (MORAIS JUNIOR et al., 2019; NGUYEN et al., 2006; WOHLBACH et al., 2011).

5.1.1. Identificação de levedura

A identificação de leveduras foi realizada por análise do domínio D1/D2 e na região ITS-5.8S da subunidade maior do RNAr, (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). O domínio D1/D2 foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase usando os primers NL1 (5-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3) e NL4 (5 -GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3) e a região ITS foi amplificada usando os iniciadores ITS-1(5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) e ITS-4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) a partir do DNA genômico.

O DNA amplificado foi purificado e sequenciado (Eurofins Genomics, em Louisville, KY, EUA). As sequências parciais do domínio D1/D2 e a região ITS foram depositadas em DDBJ/EMBL/GenBank com os números de acesso MK193860 e MK193858 (JA1) MK193861 e MK193859 (JA9), respectivamente. Essas análises foram realizadas por Débora Trichez e colaboradores (KURTZMAN, 2011; KURTZMAN; ROBNETT, 1998; TRICHEZ et al., 2019).

5.1.2. Análise filogenética

As sequências para a árvore filogenética foram selecionadas com base nas similaridades das regiões D1/D2 e ITS baixadas do banco de dados YeastIP (WEISS et al., 2013). Para a construção da árvore, todas as sequências foram alinhadas, usando o programa MAFFT v7.245 (KATO; STANDLEY, 2013), com a opção “auto” para cada região separadamente e, em seguida, concatenados para filogenia, usando o programa FastTree (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2009).

5.1.3. Fermentação sobre condição de oxigênio limitado

As cepas foram inoculadas em placas de YPD e, em seguida, foram transferidas para 100 mL de meio mineral definido suplementado com 40 g/L de xilose e/ou no meio contendo mistura de 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose em agitação de 200 rpm, em uma temperatura de 28 °C.

Pré-culturas na fase exponencial foram colhidas e centrifugadas a 6000 g por 5 minutos (Centrífuga Heraeus Megafuge 16R Thermo Fisher). Em seguida, foram ressuspendidas em 10 mL do meio de fermentação e usada para inocular em uma OD 600 nm inicial ~0,5 (<0,3 g/L) em um biorreator INFORS (INFORS HT Multifors) com um volume de trabalho de 1L em um biorreator de 1,5L.

A composição do meio de fermentação foi semelhante ao da pré-cultura, contendo 10 mg/L de ergosterol, 420 mg/L de Tween-80, algumas gotas de polipropileno glicol como antiespuma e xilose a 40 g/L ou mistura de 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose.

O fluxo de ar foi mantido em 0,1L/min⁻¹ no biorreator e o pH foi mantido a 5,5 por adição de 3M KOH. A temperatura foi ajustada para 28 °C e a velocidade do agitador foi mantida em 400 rpm. As densidades celulares foram determinadas por absorvância em 600 nm e correlacionado com o peso seco das células.

Para calcular o peso seco, foram coletadas amostras de 5 mL de suspensão celular e estas foram centrifugadas, lavadas com água destilada e seco por 48 horas a 65 °C. As medições foram realizadas em duplicata e o peso celular foi calculado como a diferença entre as amostras com e sem células. Por último, as amostras foram coletadas para análise posterior de metabólitos. Todos os ensaios de fermentação foram realizados em duplicatas biológicas.

5.1.4. Fermentação em hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar

O hidrolisado da biomassa de cana-de-açúcar foi preparado por explosão a vapor, seguida de hidrólise ácida da fração hemicelulósica. A composição foi determinada como 1,8 g/L de glicose, 27,8 g/L de xilose, 0,7 g/L de celobiose, 6 g/L de ácido acético, 0,66 g/L de furfural e 0,11 g/L de HMF (TRICHEZ et al., 2019).

As culturas e os inóculos foram obtidos em meio YP contendo 40 g/L de xilose em frascos de Erlenmeyer, em um agitador rotativo a 28 °C e 200 rpm, por, aproximadamente, 24 horas. As células em fase exponencial foram recuperadas por centrifugação a 4000 g por dez minutos. (centrífuga Heraeus Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific) e suspensas em meio de fermentação para atingir ~ 10 g/L de biomassa inicial.

O meio de fermentação foi composto por hidrolisado de cana-de-açúcar não destoxificado numa concentração de 30% e para isso foi suplementado com 2g/L de YNB, 4g/L de uréia, glicose e xilose, nas concentrações de 8 g/L e 40 g/L respectivamente. O valor de pH foi ajustado para 5,5 com KOH. Os frascos contendo 50 mL de cultura foram incubados a 28 °C a 200 rpm. As amostras foram coletadas durante a fermentação para a quantificação de biomassa e metabólitos. As experiências foram realizadas em duplicatas biológicas.

5.1.5. Análise de HPLC

Após as fermentações, as amostras coletadas foram centrifugadas por 5 minutos a 10,000 g e 250 µL foram transferidas para um tubo vials contendo 500 µL de água ultrapura. Os metabólitos extracelulares foram quantificados por HPLC, utilizando um Sistema Waters (Marca: Waters Acquity UPLC, modelo: H Class, USA), equipado com uma coluna Animex HPX-87H (300 x 7,8 mm, 9 µm, Bio-rad) acoplada a Detector de RI para quantificação de ácidos orgânicos. A fase móvel era H₂SO₄ 5 mM, usada a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min, na temperatura da coluna de 45 ° C por 40 minutos, com um volume de injeção de 10 µL. Foram utilizados os seguintes padrões para estabelecer a curva padrão dos compostos desejados das amostras, sendo eles: glicose 10 g/L; xilose 20 g/L; glicerol 5 g/L; ácido acético 5 g/L; etanol 10 g/L e xilitol 10 g/L, em seguida foi feita uma diluição seriada de até 7x para estabelecer a curva padrão (SOARES, 2015).

5.1.6. Cálculo de rendimento e produtividade

Foram usados as seguintes equações para estabelecer os parâmetros de rendimento como, por exemplo, rendimento de etanol (Y_{et}) usando a fórmula $Y = \frac{\text{Produto formado}}{\text{açúcar consumido}}$ (g/g). A produtividade volumétrica (g/L.h^{-1}) foi calculada usando a produção de etanol, glicerol e xilitol versus o tempo (SEHNEM et al., 2017). As densidades celulares foram determinadas por medições de absorvância a 600 nm e correlacionadas ao peso seco da célula. Para medições de peso seco celular, as amostras de suspensão celular foram centrifugadas 10,000 g por 5 minutos (Marca: Eppendorf, modelo: Mini Spin Plus), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado, seco e pesado para cálculo de biomassa.

6. Resultados e Discussão

6.1. Identificação de levedura

As linhagens de leveduras identificadas previamente como JA1 e JA9, isoladas de amostras de madeira em decomposição obtidas no Cerrado de Brasília tiveram seus perfis de crescimento avaliados em meios mínimos suplementados com xilose como fonte de carbono. Por apresentar crescimento em xilose as linhagens JA1 e JA9, foram selecionadas para identificação molecular. Para identificação das linhagens, foram selecionadas análises dos domínios D1/D2 e região ITS-5.8S da subunidade maior. O gene do rRNA revelou que os novos isolados pertencem aos clados *Spathaspora* e *Meyerozyma*, respectivamente (Figura 9).

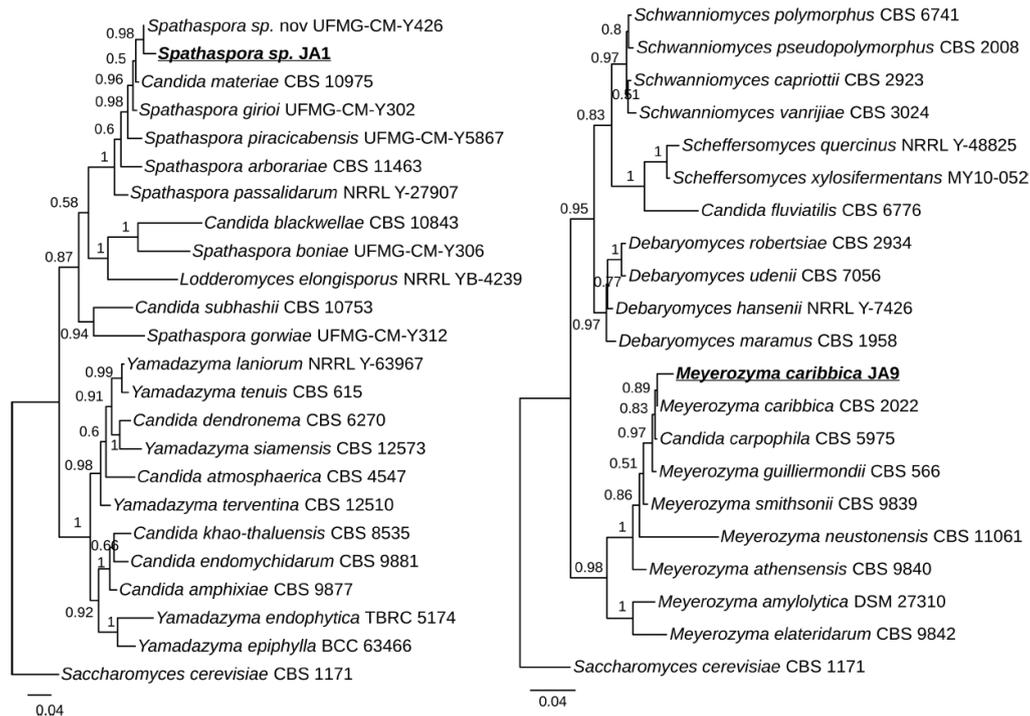


Figura 9. Posição filogenética de *Spathaspora sp.* JA1 e *M. caribbica* JA9 com base nas regiões ITS e nos domínios D1/D2 do gene LSU do RNAr. As sequências foram alinhadas usando MAFFT e árvore filogenética inferida, usando FastTree. Os valores de suporte são mostrados ao lado do respectivo nó. A barra mostra o número, a posição e substituições por nucleotídeos (TRICHEZ et al., 2019).

A cepa JA1 apresentou uma região idêntica de nucleotídeos para o domínio D1/D2, enquanto para a região ITS foi diferenciada apenas por 14 nucleotídeos em comparação com as novas espécies, representado por *Spathaspora sp. Nov.* UFMG-CM-Y426 (identificados pelo número KX101231.1 para ITS e KX0970522.1 para D1/D2). Além disso, a sequência D1/D2 da cepa JA1 se diferenciou apenas em quatro substituições nucleotídicas do parente descrito mais próximo: a linhagem *Candida materiae* CBS 10975T, figura 9 (BARBOSA et al., 2009).

A cepa JA9 demonstrou um domínio D1/D2 idêntico ao de *M. caribbica* CBS 2022 e *M. guilliermondii* ATCC 62620T (KURTZMAN; SUZUKI, 2010). A análise da região ITS apresentou maior semelhança com *M. caribbica* CBS 2022 com 4 substituições nucleotídicas. Com base nessas informações, a cepa JA9 foi identificada como *M. caribbica* JA9 e JA1 foi tratada como espécie não descrita, sendo nomeada como *Spathaspora sp.* JA1 (Figura 9).

Dessa forma, foi construída uma árvore filogenética baseada no alinhamento concatenado das regiões ITS e o domínio D1/D2, demonstrando a posição das novas linhagens isoladas nos clados independentes de *Spathaspora* e *Meyerozyma* (Figura 9). O gênero *Spathaspora* foi descrito anteriormente por Nguyen et al. (2006) e contém leveduras fermentadoras de xilose, geralmente associadas com substratos de madeira em decomposição e insetos (CADETE; ROSA, 2018; NGUYEN et al., 2006).

O gênero *Meyerozyma* foi proposto por Kurtzman & Suzuki (2010) para agrupar leveduras como *M. guilliermondii* e *M. caribbica*, espécies que são amplamente encontradas nos ambientes naturais, como por exemplo, restos de madeira em decomposição (KURTZMAN; SUZUKI, 2010; VAUGHAN-MARTINI et al., 2005).

6.2. Assimilação de xilose

Uma análise inicial mostrou que as linhagens *Spathaspora sp.* JA1 e *M. caribbica* JA9 podem consumir xilose e produzir xilitol. Para avaliar o desempenho fisiológico das leveduras, foram realizados ensaios de fermentação, utilizando as novas leveduras isoladas e duas espécies já descritas na literatura, sendo elas *S. passalidarum* NRRL Y-27907 e *M. guilliermondii* NRRL Y-324. Essas leveduras foram selecionadas como controle com base em seus altos rendimentos de produção de etanol (pobre produtor de xilitol) e xilitol, respectivamente (BARBOSA et al., 1988; CADETE et al., 2016a; CADETE; ROSA, 2018; DE ARRUDA et al., 2011).

Assim, as fermentações foram realizadas em biorreatores, sob condições limitadas de oxigênio, utilizando xilose a 4% ou uma mistura de xilose 2% e glicose 2% como fonte de carbono. Tanto a linhagem JA1 quanto a JA9 foram capazes de usar xilose e glicose como fonte de carbono para crescimento (Figura 10). No entanto, a produção de etanol foi observada apenas quando a glicose estava presente no meio (Figura 10). Dentre as linhagens avaliadas, somente a *S. passalidarum* foi capaz de fermentar os dois substratos com eficiência e produzir grandes quantidades de etanol onde o rendimento de etanol na xilose, $Y_{et} = 0,48 \pm 0,01$ g/g e na mistura de açúcar, $Y_{et} = 0,43 \pm 0,01$ g/g.

Nos ensaios de assimilação da xilose, *S. passalidarum* apresentou a maior taxa de consumo de xilose. Essa cepa consumiu todo o açúcar em, aproximadamente, 50 horas, com um consumo específico de xilose de 0,138 g/g.h, enquanto *Spathaspora sp.* JA1, *M. caribbica* JA9 e *M. guilliermondii* apresentaram taxas de consumo de xilose de 0,082,

0,036 e 0,029 g/g.h, respectivamente, e o açúcar residual estava presente no final do cultivo. Desses ensaios fermentativos, o xilitol foi o principal produto obtido das leveduras isoladas, enquanto acetato e glicerol foram produzidos em concentrações menores ($< 1,0$ g/L).

No final do cultivo, a linhagem *Spathaspora sp.* JA1 produziu $22,62 \pm 6,33$ g/L de xilitol, quase duas vezes maior que a quantidade produzida pela *M. caribbica* JA9, a segunda linhagem produtora mais eficiente (Tabela 5). Além disso, os rendimentos de xilitol foram significativamente maiores para *Spathaspora sp.* JA1 ($0,75 \pm 0,01$ g/g) e *M. caribbica* JA9 ($0,54 \pm 0,11$ g/g) do que a para a linhagem da levedura controle *M. guilliermondii* ($0,44 \pm 0,02$ g/g) (Tabela 5), reconhecida na literatura como forte produtora de xilitol (BARBOSA et al., 1988; CADETE et al., 2016b, 2016a; DE ARRUDA et al., 2011). Estudos anteriores já relataram que diferentes espécies de *Spathaspora* são capazes de assimilar xilose com capacidade diferente de eficiências (CADETE et al., 2009, 2012, 2016a, 2016b; LOPES et al., 2016; NGUYEN et al., 2006).

Embora algumas linhagens, como *S. passalidarum*, *S. arborariae* e *S. xylofermentans*, principalmente, fermentem xilose e produzam etanol sob condições limitadas de oxigênio, outras convertem xilose em xilitol (Tabela 5). Entre essas, os melhores rendimentos de xilitol relatados até agora foram 0,56 g/g de xilose para *S. roraimanensis*; 0,47 g/g de xilose para *S. brasiliensis*; 0,67 g/g para *C. tropicalis* e 0,63 g/g para *Debaryomyces hansenii* (CADETE et al., 2013, 2016b, 2016a; MATTAM et al., 2016; PRAKASH et al., 2011).

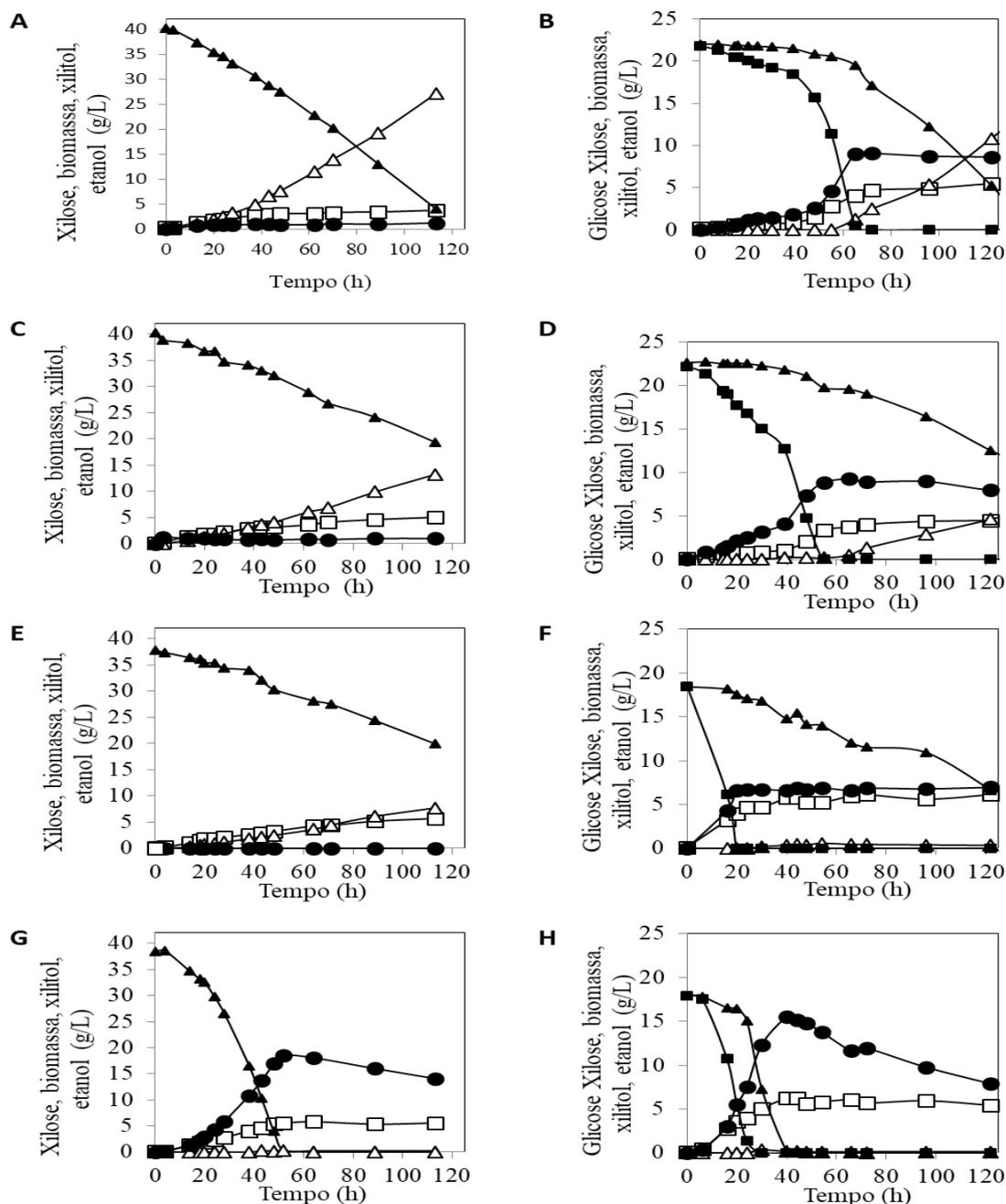


Figura 10. Consumo de açúcar e formação de produtos pelas leveduras *Spathaspora sp.* JA1 (A) e (B), *M. caribbica* JA9 (C) e (D), *M. guilliermondii* (E) e (F) e *S. passalidarum* (G) e (H) durante a fermentação em condições limitadas de oxigênio em xilose (coluna da esquerda) Consumo de açúcar e formação de produtos pelas leveduras *Spathaspora sp.* JA1 (A) e (B), *M. caribbica* JA9 (C) e (D), *M. guilliermondii* (E) e (F) e *S. passalidarum* (G) e (H) durante a fermentação em condições limitadas de oxigênio em xilose (coluna da esquerda) e na mistura de glicose e xilose (coluna da direita). Xilose (▲); glicose (■); xilitol (Δ); etanol (●); biomassa (□). As experiências foram realizadas em duplicatas biológicas (TRICHEZ et al., 2019)

Tabela 5. Produção de xilitol por diferentes leveduras

Microorganismo	Conc. Final de xilitol (g/L)	Rendimento xilitol (g/g)	Produtividade [g/(l.h)]	Ref
<i>Spathaspora sp. JA1</i>	22,62 ± 6,33	0,75 ± 0,01	0,20 ± 0,06	Este
<i>M. caribbica JA9</i>	11.37 ± 2.60	0.54 ± 0.11	0.10 ± 0.03	Este
<i>S. passalidaum</i>	0.19 ± 0.06	0.01 ± 0.01	0.003 ± 0.00	Este
<i>M. guilliermondii</i>	8.25 ± 1.92	0.44 ± 0.02	0.063 ± 0.01	Este
<i>Spathaspora sp UFMG-XMD-16.2</i>	7.8	0.21	0.16	Cadete
<i>S. brasiliensis UFMG-CM-Y353</i>	11.9	0.47	-	Cadete
<i>S. brasiliensis UFMG-CM-Y477</i>	27.4	0.56	-	Cadete
<i>S. amazonensis</i>	34.24	0.75	0.476	Cadete
<i>C. guilliermondii FTI20037</i>	50.5	0.81	0.60	de Arru
<i>C. tropicalis 1004</i>	17	0.57	-	Barbos
<i>C. tropicalis</i>	-	0,45	-	Rao e
<i>C. tropicalis MTCC 25 057</i>	-	0,67	0,7	Mattam
<i>Debaryomyces hansenii</i>	22,4	0,63	0,23	Prakash

Fonte: Adaptado de (TRICHEZ et al., 2019)

6.3. Fermentação de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar

Para avaliar a capacidade dos novos isolados JA1 e JA9 de fermentar hidrolisado de biomassa, foram realizados ensaios de fermentação utilizando hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar não destoxificado, contendo glicose (8 g/L) e xilose (40 g/L), com alta concentração de ácido acético (6 g/L) (TRICHEZ et al., 2019).

Estudos com a linhagem *C. tropicalis* demonstram que essa espécie é capaz de produzir xilitol com altos rendimentos e produtividades em meio fermentativo, contendo hidrolisado (CADETE et al., 2012; GUAMÁN-BURNEO et al., 2015; MATTAM et al., 2016). Portanto, com base nesses dados, a *C. tropicalis* isolada por nosso grupo foi utilizada como controle nesta experimento. Em um segundo trabalho ela recebeu o nome de *C. tropicalis* JA2 (MORAIS JUNIOR et al., 2019).

Sob as condições testadas, todas as linhagens, exceto a *S. passalidarum*, foram capazes de consumir toda a glicose disponível no hidrolisado de cana-de-açúcar, enquanto apenas *C. Tropicalis* e *Spathaspora sp.* JA1 foram capazes de consumir completamente toda a xilose disponível (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros de fermentação de leveduras fermentadoras de xilose em hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar.

Levedura	Consumo de açúcar (%)*		Produtos (g/L)			Rendimento (g/g)		Produtividade (g/L.h)	
	Glicose	Xilose	Biomassa	Xilitol	Etanol	Xilitol**	Etanol***	Xilitol	Etanol
<i>Spathaspora sp.</i> JA1	100	99	13,00 ± 1,15	22,62 ± 0,59	10,67 ± 0,73	0,58 ± 0,08	0,23 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,21 ± 0,01
<i>M. caribbica</i> JA9	100	89	20,69 ± 2,59	17,33 ± 0,11	5,69 ± 0,08	0,44 ± 0,06	0,12 ± 0,02	0,33 ± 0,00	0,11 ± 0,00
<i>S. passalidarum</i>	24	3	2,64 ± 0,13	0,22 ± 0,32	0,46 ± 0,46	-	-	-	-
<i>M. guilliermondii</i>	100	75	9,53 ± 2,22	12,95 ± 1,52	8,57 ± 0,46	0,42 ± 0,07	0,22 ± 0,02	0,25 ± 0,03	0,16 ± 0,01
<i>C. tropicalis</i>	100	100	7,58 ± 2,16	23,66 ± 1,52	8,60 ± 0,79	0,54 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,84 ± 0,05	0,31 ± 0,03

Os valores correspondem às médias e desvio-padrão de duas repetições biológicas calculadas ao longo de 64 horas de fermentação, exceto *C. tropicalis* (28h). * Porcentagem de açúcar consumido (%): As concentrações iniciais de glicose e xilose foram de, aproximadamente, 8 e 40 g/L respectivamente. ** Rendimento xilitol: correlação entre o xilitol produzido e xilose consumida. *** Rendimento de etanol: correção entre etanol produzido e açúcar consumido (TRICHEZ et al., 2019)

A *C. tropicalis* apresentou maior taxa de consumo de xilose, seguida pela *Spathaspora sp.* JA1, *M. caribbica* JA9 e *M. guilliermondii*. A *Spathaspora sp.* JA1 e *C. tropicalis* apresentaram os maiores rendimentos de xilitol ($0,59 \pm 0,08$ e $0,54 \pm 0,01$, respectivamente) e concentração final ($22,62 \pm 0,59$ e $23,66 \pm 1,52$ g/L, respectivamente) entre as cinco linhagens avaliadas.

Já o xilitol produzido para *M. caribbica* JA9 e *M. guilliermondii* foi de 0,44 g/g e 0,42 g/g, respectivamente. O etanol também foi um dos principais metabolitos obtidos durante a fermentação do hidrolisado. O maior valor de etanol obtido foi pela *Spathaspora sp.* JA1 (10,67 g/L), seguido por *C. tropicalis* (8,60 g/L), *M. guilliermondii* (8,57 g/L) e *M. caribbica* JA9 (5,69 g/L).

Dentre as cinco linhagens, a *S. passalidarum* demonstrou ser mais sensível à presença dos inibidores de hidrolisado, uma vez que praticamente nenhum crescimento ou consumo de açúcar foi observado durante 72 horas de cultivo. Dados da literatura demonstram que essa levedura teve um atraso no consumo de açúcar em fermentação do hidrolisado AFEX, contendo 1,5 g/L de ácido acético (LONG et al., 2012). Por fim, a falta de desempenho da *S. passalidarum* nesse experimento pode ser relacionada diretamente com a alta concentração de ácido acético presente no meio.

O desempenho da *Spathaspora sp.* JA1 no meio mineral (Figura 10) e no hidrolisado de cana-de-açúcar não destoxificado (Tabela 6) sugere que essa linhagem tem um grande potencial como produtor de xilitol, utilizando recursos renováveis. Essa levedura apresentou rendimentos e produção de xilitol semelhantes à obtida pela *C. tropicalis*, que foi avaliada nas mesmas condições (Tabela 6). No entanto, se colocada em condições otimizadas, como temperatura, pH, aeração e destoxificação do meio, o desempenho da *Spathaspora sp.* JA1 pode ser melhorado.

A relação da assimilação de xilose em leveduras não-*Saccharomyces* com genes ortólogos estão presentes nas linhagens *Spathaspora sp.* JA1 e *M. caribbica* JA9. No trabalho de Trichez et al. (2019) foram relatados uma série de genes que codificam proteínas putativas que estão envolvidas no consumo de substratos, como proteínas, carboidratos e aminoácidos.

Outro fator importante no metabolismo dessas linhagens *Spathaspora sp.* JA1 e *M. caribbica* JA9, são as enzimas responsáveis pela assimilação da xilose. Em leveduras a xilose é reduzida a xilitol por uma xilose redutase (XR) que é geralmente uma enzima dependente dos cofatores NAD(P)H⁺ (ALMEIDA et al., 2007, 2009; LIU et al., 2004; LIU, 2018). A preferência pela enzima XR ao NAD(P)H já havia sido observado

anteriormente, essa preferência tem relação direta com a dependência que a levedura apresenta ao metabolizar xilose em xilitol utilizando a enzima XR e cofatores NADPH (CADETE et al., 2016a; SERPA, 2016; VERAS; PARACHIN; ALMEIDA, 2017).

Uma análise realizada do genoma que codificam a XR (gene XYL1) das linhagens JA1 e *S. passalidarum* ou *M. caribbica* JA9 e *M. guilliermondii*, revelaram que existe uma região bem conservada e bem significativa na orientação e na ordem dos genes realizados em ambas comparações. A identificação feita no trabalho de Trichez et al., (2019) demonstrou que a *Spathaspora sp.* JA1 só possui uma cópia do gene XYL1, semelhante a outras espécies já caracterizadas, como a *S. arborariae* e *S. xylofermentans* (CADETE et al., 2016b; LOPES et al., 2017).

As linhagens *Spathaspora sp.* JA1 e *M. caribbica* JA9 isoladas de amostras em decomposição de madeira do Cerrado Brasileiro, representaram linhagem com alto potencial biotecnológico para a produção de xilitol perante ao hidrolisado mesmo na presença de 6 g/L de ácido acético, que foi o principal inibidor de crescimento para as demais leveduras avaliadas como foi o caso da linhagem *S. passalidarum* (TRICHEZ et al., 2019). Um estudo sobre a tolerância aos inibidores de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar foi realizado de forma mais aprofundada no capítulo II deste trabalho.

7. Capítulo II: Tolerância de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* a inibidores de hidrolisados lignocelulósicos.

7.1. Objetivo geral:

Avaliar desempenho de tolerância e mecanismos de respostas de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*.

7.1.1. Objetivos específicos:

7.1.1.1. Comparar o crescimento de 14 linhagens de leveduras sendo sete *Saccharomyces* e sete não - *Saccharomyces*, na presença de diferentes inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico;

7.1.1.2. Caracterizar fisiologicamente por meio de análises dos perfis fermentativos das leveduras que apresentaram melhores desempenhos na presença dos inibidores.

8. Metodologia

8.1. Microrganismos utilizados no estudo

Foram selecionadas para este trabalho 14 linhagens de leveduras de interesse biotecnológico da coleção da Embrapa Agroenergia (Coleção de trabalho de microrganismos e microalgas da Embrapa Agroenergia: Microrganismos e microalgas aplicados à agroenergia e biorefinarias), sendo sete leveduras *Saccharomyces* e sete não-*Saccharomyces*.

Dentre as linhagens de leveduras *Saccharomyces*, duas são linhagens industriais, sendo elas *S. cerevisiae* CAT-1 (ANTONANGELO, 2012; CHANDEL, 2018) e JP1 (DA SILVA FILHO et al., 2005; REIS et al., 2012), e as demais são linhagens selvagens, isoladas de amostras de usinas sucroalcooleiras (dados não publicados), sendo elas *S. cerevisiae* A11, A12, B1.1, G06 e G10.

As linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* foram *Candida tropicalis* JA2, isolada de amostra em madeira em decomposição do cerrado (MORAIS JUNIOR et al., 2019), *Meyerozyma caribbica* JA9 e *Spathaspora sp.* JA1 isoladas de madeira em decomposição do Cerrado Brasileiro em Brasília – DF (TRICHEZ et al., 2019), *Spathaspora arborariae* HMIG-1A Y-48658, isolada de madeira em decomposição em Minas Gerais (CADETE et al., 2009) *Wickerhamomyces anomalus* 740 isolada de amostra de usina sucroalcooleira (CARNEIRO; E SILVA; ALMEIDA, 2019), *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 (SU; WILLIS; JEFFRIES, 2015) e *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 (NGUYEN et al., 2006) essas duas cepas foram cedidas atenciosamente da coleção ARS-NRRL (Peoria, USA);.

8.2. Meio de cultura

Para fins de comparação entre as leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* os experimentos realizados neste trabalho usaram como fonte de carbono a glicose, uma vez que as *Saccharomyces* não consomem xilose. Foi definido, então, como meio de cultura padrão o meio complexo YPD.

O meio complexo YPD é constituído de extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2% e glicose 2%. Foi testado o perfil de crescimento e fermentação na

presença individual de cada inibidor para avaliar o mecanismo de tolerância de cada levedura.

Também foi utilizado para avaliar o perfil fermentativo das leveduras não-*Saccharomyces* o meio complexo YPX, que é constituído de extrato de levedura 1%, peptona bacteriológica 2% e xilose 2%.

8.3. Inibidores presentes em hidrolisados lignocelulósicos

Com base na tabela 2 p. 17, foram selecionados para este trabalho oito inibidores (SIGMA – ALDRICH) que são mais encontrados no hidrolisado lignocelulósico do bagaço de cana-de-açúcar em três concentrações para comparar do perfil de tolerância entre as *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*. Essas concentrações estão ilustradas na tabela 7. O HMF 5 g/L foi escolhido por ser considerado menos tóxico que o furfural em concentrações equimolares (PIENKOS; ZHANG, 2009).

Tabela 7. Inibidores de hidrolisado e suas respectivas concentrações utilizadas no perfil de crescimento, estabelecidas com base em concentrações encontradas na literatura, sendo uma mínima e uma máxima e um terceira para fins comparativos.

Classe	Inibidor	Concentração (g/L)			Referências
Ácidos Orgânicos	Ácido Acético	1	5	10	González-Ramos et al. 2016
	Ácido Fórmico				Almeida et al. 2007
Furaldeido	Furfural	0,5	1	3	Laadan et al. 2008
	HMF	0,5	1	5	Pienkos & Zhang , 2009
	Vanilina				Cortez & Roberto, 2010
Fenólicos	Seringaldeido	0,5	0,75	1,5	Fonseca, 2009
	Ácido Ferúlico				Hasunuma & Kondo, 2012
	Ácido Cumárico				Mussatto et al. 2007

Fonte: Criado pelo autor

8.4. Curvas de crescimento

As curvas de crescimento foram realizadas em microplacas de ELISA de 96 poços de fundo chato (marca: OLEN, modelo: K30-5096P), a uma temperatura de 28 °C em estufa sem agitação, em meio YPD, e esse meio foi suplementado com ou sem a presença de inibidores de hidrolisado (Tabela 7) com um intervalo de leitura de 4 horas para averiguar o crescimento celular (DE MELLO et al., 2019; KURTZMAN, 2011; MADIGAN, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2010).

Foi utilizado para a leitura das curvas de crescimento o equipamento Epoch 2 – (marca: BioTek, modelo: microplate reader). O crescimento das leveduras foi acompanhado por medições densidade óptico (OD) em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 600 nm. A curva de crescimento foi acompanhada em um período de 72 horas, tendo uma OD inicial 0,1.

Para as análises das curvas de crescimento, inicialmente foi realizado um pré-inoculo em tubos falcons de 50 mL, contendo um volume final de 10 mL de meio YPD por 24 horas. Após 24 horas, as leveduras foram inoculadas em microplacas de ELISA 96 poços. Os inoculos foram realizados em duplicatas biológicas e triplicatas técnicas, tendo um controle positivo (meio de cultura sem a presença do inibidor) e um controle negativo (meio de cultura sem a levedura).

8.5. *Heat map* (Mapa de calor)

De forma a exibir os perfis de crescimento das leveduras, foi realizada a construção de mapas de calor (heat map), que representam de forma visual cores que demonstram os resultados obtidos. Para tanto, as médias dos percentuais de crescimento microbiano na presença do inibidor foram estimadas por meio da média das triplicatas técnicas e das médias das duplicatas biológicas, de forma a obter uma média final e uma média real.

Para se obter a média real da taxa de crescimento microbiano na presença dos inibidores, foram obtidas médias finais de cada inibidor em cada concentração a partir das médias das triplicatas técnicas e duplicatas biológicas. Essas médias finais dos inibidores foram subtraídas da média final do controle positivo, normalizando os valores de cada levedura na presença dos inibidores e nas respectivas concentrações testadas para o tempo de 72 horas de crescimento.

Entre essa faixa de 0 a 72 horas, foi escolhido como tempo ideal o ponto de 24 horas de crescimento. Este tempo foi escolhido, pois foi o ponto em que as leveduras apresentavam estar saindo da fase exponencial e entrando na fase estacionária da sua curva de crescimento.

Os valores de OD obtidos no meio com inibidor foram fixados em 0 a 50% (inibido), OD < 0,5 até 1 e meio sem inibidor 100% (não inibido) OD ~ 1,5. Os valores de crescimento medidos na presença de inibidores foram expressos em termos de percentil.

8.6. Fermentações em condições de aeróbicos

As fermentações foram realizadas com as leveduras *S. cerevisiae* B1.1, G06, JP1, *C. tropicalis* JA2, *Meyerozyma sp.* JA9, *W. anomalus* 740 por serem as mais tolerantes aos inibidores mais tóxicos avaliados, sendo a *Spathaspora sp.* JA1 foi selecionado pelo seu bom desempenho nos ensaios de fermentação realizados no capítulo I Tabela 6 p.48. O pré-inoculo foi cultivado por 24 horas em meio YPD e YPX (não-*Saccharomyces*), em Erlenmeyer de 250 mL, em um volume final de 50 mL.

Após as 24 horas de crescimento foi inoculado o volume proporcional para iniciar a fermentação a uma OD ~ 5. Para as fermentações foram escolhidos três inibidores, sendo eles: ácido acético (5g/L), HMF (3 g/L) e vanilina (1,5 g/L). As fermentações foram realizadas em meio líquido YPD/YPX com a presença dos inibidores em um volume final de 50 mL, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, a temperatura de 28 °C em agitação constante de 200 rpm por 72 horas

Durante as fermentações, foram retiradas amostras a cada quatro horas para análises de HPLC, um volume de 750 µL, centrifugados a 14000 g durante dez minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi congelado e o *pellet* foi descartado. As fermentações foram realizadas em duplicatas biológicas.

8.7. Análise de HPLC/UHPLC

Após as fermentações, as amostras coletadas foram centrifugadas por 5 minutos a 10,000 g e 250 µL foram transferidas para um tubo vials contendo 500 µL de água ultrapura. Os metabólitos extracelulares foram quantificados por HPLC, utilizando um Sistema Waters (Marca: Waters Acquity UPLC, modelo: H Class, USA), equipado com uma coluna Animex HPX-87H (300 x 7,8 mm, 9 µm, Bio-rad) acoplada a Detector de RI para quantificação de compostos orgânicos. A fase móvel era H₂SO₄ 5 mM, usada a uma

taxa de fluxo de 0,6 mL/min, na temperatura da coluna de 45 ° C por 40 minutos, com um volume de injeção de 10 µL, em seguida foi feita uma diluição seriada de até 7x para estabelecer a curva padrão (SOARES, 2015).

O UHPLC 1290 Agilent equipado com coluna Acquity UPLC HSS T3 (2,1 x 150 mm, 1,8 µm Acquity) acoplado ao detector DAD 280 nm foi utilizado para quantificação de vanilina. Volume de injeção utilizado foi de 1 µL. A fase móvel A = ácido fórmico 0,1% e B = Acetonitrila. Gradiente: 0 min (90% de A e 10% de B), 5 minutos (80% de A e 20% de B), 7,5 minutos (75% de A e 25% de B) e 12,5 minutos (55% de A e 45% de B). A uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min, na temperatura da coluna de 40° C por 20 minutos (NETO, 2019).

As curvas de calibração foram utilizadas para quantificar os seguintes metabólitos: glicose, xilose, xilitol, glicerol, ácido acético, HMF, vanilina e etanol. Foram utilizados os seguintes padrões para estabelecer a curva padrão dos compostos desejados das amostras, sendo eles: glicose 10 g/L; xilose 20 g/L; glicerol 5 g/L; ácido acético 5 g/L; etanol 10 g/L e xilitol 10 g/L (SOARES, 2015) e foram adicionados os compostos ácido fórmico 5 g/L, HMF 5 g/L e vanilina 1,5 g/L (CORTEZ; ROBERTO, 2010; NETO, 2019; PIENKOS; ZHANG, 2009). Para se estabelecer uma boa curva calibração para as análises de HPLC, o equipamento utilizado deve estabelecer uma relação, que segue as diretrizes das normas, dos parâmetros de calibração do fabricante, levando em conta a incerteza oriunda da preparação das soluções da curva de calibração (BAHIA FILHO et al., 2011).

9. Resultados e Discussão

9.1. Desempenho das leveduras na presença dos inibidores de hidrolisado

Para avaliar a tolerância de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* a diferentes inibidores de hidrolisado lignocelulósico, 14 linhagens de leveduras foram cultivadas na presença de oito inibidores comumente presentes em hidrolisados lignocelulósicos. Foram utilizadas sete leveduras *S. cerevisiae* (A11, A12, B1.1, CAT-1, JP1, G06 e G10) e sete leveduras não-*Saccharomyces* (*C. tropicalis* JA2, *Spathaspora* sp. JA1, *M. caribbica* JA9, *W. anomalus* 740, *S. stipitis*, *S. passalidarum* e *S. arborariae*)

Foram testadas em três concentrações distintas de ácido acético, ácido fórmico, HMF, furfural, vanilina, seringaldeído, ácido ferúlico e ácido cumárico. As concentrações de cada composto foram baseadas nas concentrações mais baixas e mais altas para diferentes hidrolisados descritos na literatura e uma terceira concentração para fins de comparação.

Como as linhagens de *Saccharomyces* não são capazes de consumir xilose, a glicose foi escolhida como a única fonte de carbono para comparação de todas as linhagens. Como esperado, todas as linhagens cresceram no meio sem inibidor, com todas as cepas entrando na fase estacionária após 24 horas de crescimento (Figura 11 e Figura 12), escolhido para representar esses dados os resultados em ácido acético, os demais gráficos podem ser consultados no Apêndice A.

Algumas linhagens de não-*Saccharomyces*, a exemplo da *M. caribbica* JA9, apresentam inibição durante a fase de lag, tendo um crescimento inicial após 48 horas de cultivo. A curva de crescimento pode variar conforme o tipo de inibidor presente no meio e sua respectiva concentração como, por exemplo, o ácido acético 5 g/L (Figura 12).

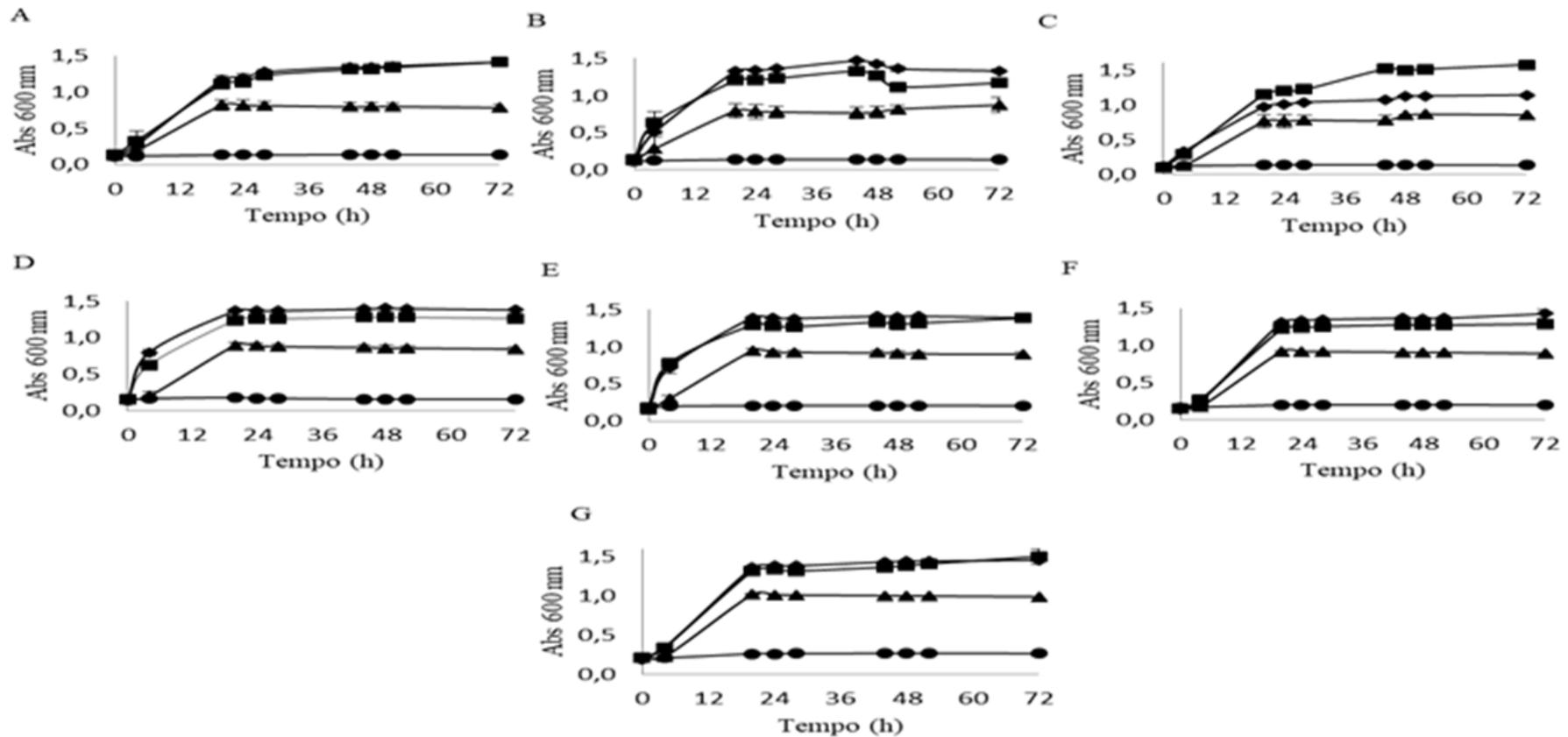


Figura 11. Curva de crescimento das leveduras *Saccharomyces* em ácido acético em microplaca de ELISA 96 poços com intervalo de crescimento de 4h de uma leitura para outra em OD 600 nm. Crescimento de (A) *S. cerevisiae* A11. (B) *S. cerevisiae* A12. (C) *S. cerevisiae* JP1. (D) *S. cerevisiae* CAT-1. (E) *S. cerevisiae* B1.1. (F) *S. cerevisiae* G06. (G) *S. cerevisiae* G10, em meio YPD 20 g/L suplementado com e sem ácido acético. Ácido acético 1 g/L (■), 5 g/L (▲) e 10 g/L (●); sem ácido acético (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

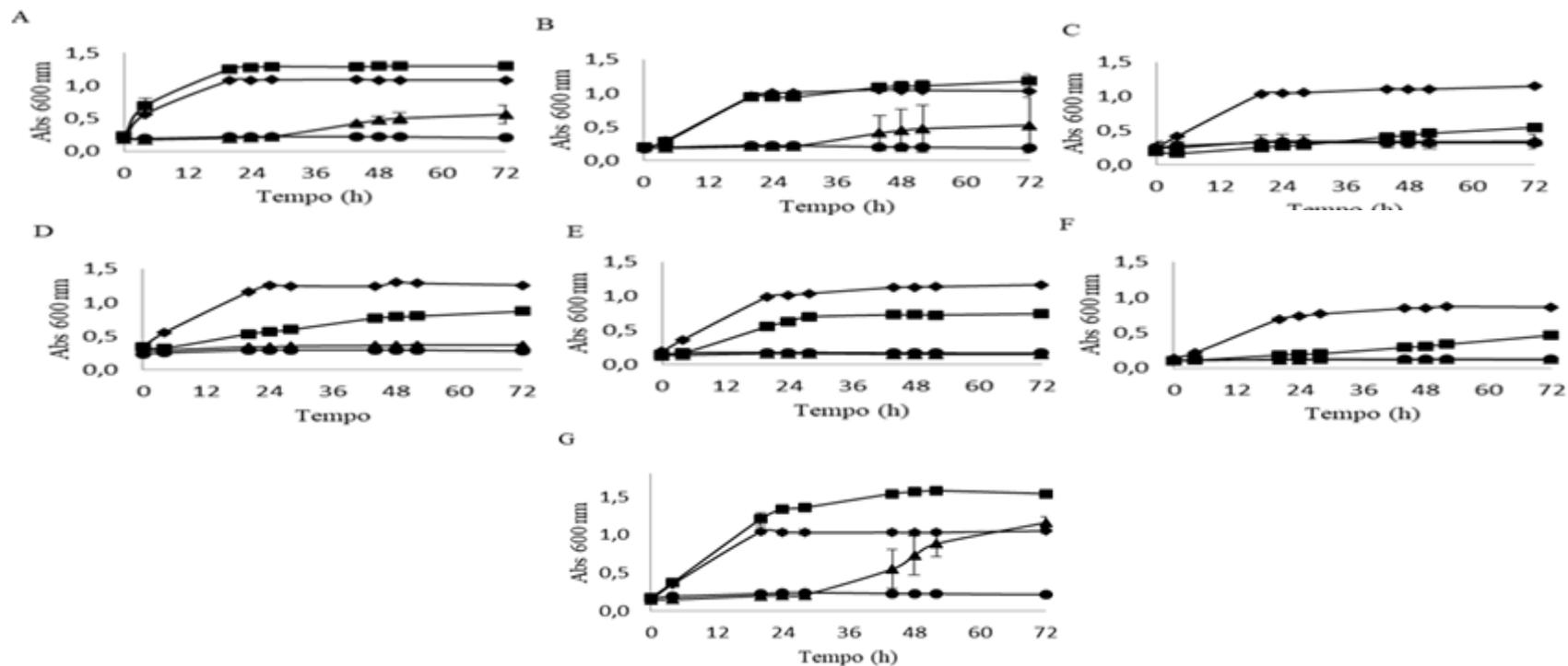


Figura 12. Curva de crescimento das leveduras não-*Saccharomyces* em ácido acético em microplaca de ELISA 96 poços com intervalo de crescimento de 4h de uma leitura para outra em OD 600 nm. Crescimento de (A) *C. tropicalis* JA2. (B) *M. caribbica* JA9. (C) *S. arborariae*. (D) *S. passalidarum*. (E) *S. stipitis*. (F) *Spathaspora sp.* JA1. (G) *W. anomalus* 740, em meio YPD 20 g/L suplementado com e sem ácido acético. Ácido acético 1 g/L (■), 5 g/L (▲) e 10 g/L (●); sem ácido acético (◆). Assim, os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicatas técnicas e duplicatas biológicas.

Para facilitar a comparação dos efeitos inibitórios das três concentrações testadas dos oito diferentes inibidores, um *heat map* foi construído (Figura 13). Com base nas curvas de crescimento, observou-se que a maioria das leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* entraram na fase estacionária de crescimento após 24 horas. Por essa razão, foi estabelecido este tempo para a construção do *heat map*.

Dos três grupos de inibidores, os ácidos orgânicos (ácidos acético e fórmico) foram os mais tóxicos nas concentrações avaliadas (Figura 13). Mesmo na concentração mais baixa (1g/L), ambos os ácidos inibiram o crescimento de algumas leveduras. Do grupo das não-*Saccharomyces* apenas *C. tropicalis* JA2, *M. caribbica* JA9 e *W. anomalus* 740 não sofreram inibição na menor concentração.

Na concentração mediana (5 g/L) e na concentração mais alta (10 g/L) de ácidos orgânicos, todas as leveduras foram fortemente inibidas, exceto as cepas de *Saccharomyces* que apresentaram algum crescimento em 5 g/L de ácido acético (Figura 13). Considerando a molaridade, o ácido fórmico (1 g/L igual a x 0,021 mol/L) foi mais inibidor do que o ácido acético (1 g/L igual a x 0,016 mol/L) para todas as leveduras (Figura 13).

Em geral, o grupo com o menor impacto no crescimento das leveduras foram os furaldeídos, uma vez que somente o HMF na concentração mais alta, demonstrou um efeito inibitório mais forte sob o crescimento das leveduras comparado as três concentrações de furfural. Este demonstrou ter ação somente sobre o crescimento da *Spathaspora sp.* JA1 (acima de 80%) na concentração mais alta (3 g/L). Por outro lado, o HMF mostrou forte ação inibitória para as não-*Saccharomyces* na concentração 5 g/L (Figura 13).

Desse modo, o grupo de compostos fenólicos apresentou efeitos inibitórios intermediários quando comparados aos ácidos orgânicos e aos furaldeídos. Vanilina e seringaldeído tiveram maior ação inibitória comparados com o ácido ferúlico e ácido cumárico, tanto para as leveduras *Saccharomyces* quanto para as não-*Saccharomyces*.

As leveduras *Saccharomyces* demonstram ser tolerantes aos quatro compostos fenólicos testados, com exceção da *S. cerevisiae* A12, que foi afetada pela vanilina 1,5 g/L. As leveduras não-*Saccharomyces* foram afetadas pelas três concentrações de vanilina e seringaldeído, mostrando tolerância apenas para ácido cumárico e ácido ferúlico, exceto para a concentração mais alta (1,5 g/L).

Em geral, as linhagens de *Saccharomyces* demonstraram mais tolerância do que as não-*Saccharomyces* para todos os compostos avaliados, isso pode acontecer devido as

características de robustez das *Saccharomyces* a serem avaliadas durante as etapas de fermentação industrial. No entanto, as cepas de cada grupo puderam ser diferenciadas. Ao analisar as não-*Saccharomyces* na presença de inibidores, os testes demonstram que as mais tolerantes são as linhagens *C. tropicalis* JA2, *M. caribbica* JA9 e *W. anomalus* 740 (Figura 13).

Essas leveduras mostraram tolerância às concentrações mais baixas testadas para furfural e HMF e às concentrações mais baixas para os compostos fenólicos, excetuando-se a vanilina e seringaldeído. As leveduras *S. passalidarum*, *S. arborariae*, *Spathaspora sp.* JA1 e *S. stiptis* demonstraram sofrer inibição em todas as concentrações testadas de ácidos orgânicos, furaldeídos e nas concentrações dos compostos fenólicos.

Entre as *S. cerevisiae*, as linhagens B1.1, G06 e JP1 pareceram ser mais tolerantes, uma vez que essas leveduras não apresentaram inibição ou baixa inibição na presença dos quatro compostos fenólicos nas três concentrações testadas. Foram afetadas apenas nas concentrações altas dos ácidos orgânicos (10 g/L) e 5 g/L para ácido fórmico e apresentaram inibição para os furaldeídos na alta concentração avaliada: 3 g/L e 5 g/L para furfural e HMF, respectivamente. Por outro lado, as consideradas menos tolerantes foram as cepas de *S. cerevisiae* A11, A12, G10 e CAT-1, que sofreram inibição na presença de pelo menos 50% de vanilina 1,5 g/L.

A concentração para ácido acético escolhida foi de 5 g/L, por ser uma faixa que já causa inibição nos dois grupos de levedura, mas não interrompe completamente o seu desempenho. O HMF e a vanilina foram escolhidos de acordo com o *heat map*, por serem os compostos mais tóxicos em seus respectivos grupos e provocarem maior inibição nos dois grupos de leveduras.

As concentrações determinadas foram de 3 g/L para HMF, por ter um efeito similar à concentração mais alta de furfural, e também por causar efeito inibitório sem afetar completamente o desempenho fermentativo das leveduras. Para a vanilina, foi escolhida a concentração 1,5 g/L, por causar efeito inibitório similar a ambos os grupos de leveduras.

Entre as 14 linhagens de leveduras, sete linhagens foram selecionadas para a caracterização do perfil fermentativo, sendo três *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* JP1, B1.1 e G06) e quatro não-*Saccharomyces* (*M. caribbica* JA9, *C. tropicalis*, *W. anomalus* 740 e *Spathaspora sp.* JA1). Apesar de a linhagem *Spathaspora sp.* JA1 ser considerada sensível aos inibidores, ela foi selecionada; por apresentar grande potencial como consumidor de xilose e produtora de xilitol (Tabela 6).

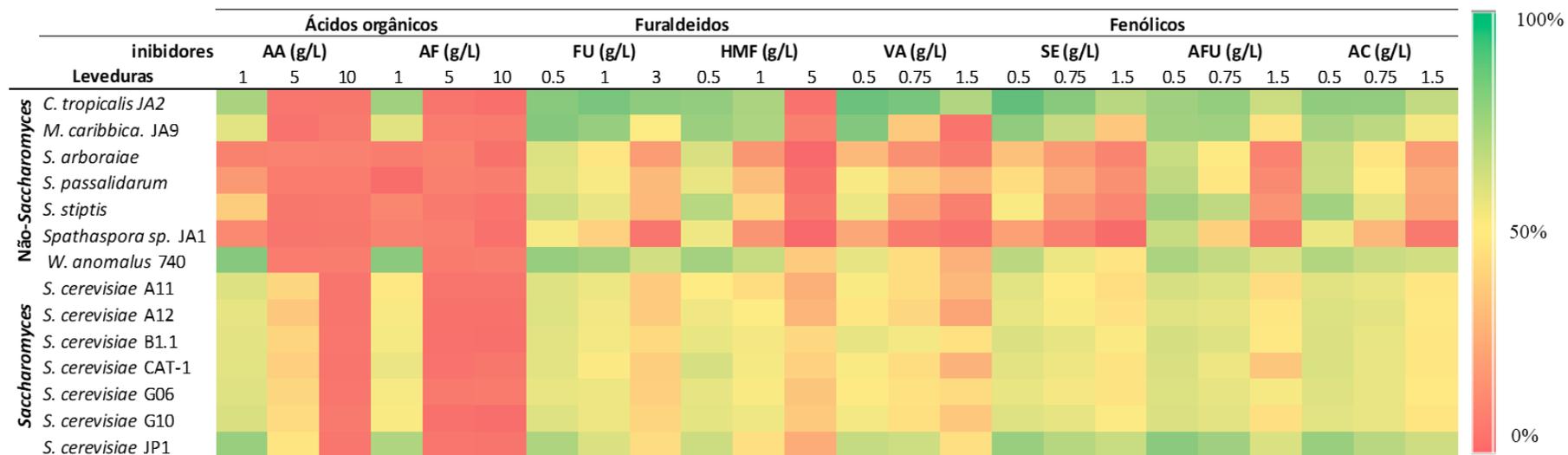


Figura 13. *Heat map*, mostrando o escore inibitório de oito inibidores em três concentrações diferentes no crescimento de leveduras em meio YPD 20 g/L definido após 24 horas. Todos os valores foram normalizados com o crescimento em meio sem inibidor (OD600 24h - OD600 0h). ex. 100% OD600 ~1,5 (não inibida) enquanto 0% é igual a OD600 < 0,5 (completamente inibida). AA (ácido acético); AF (ácido fórmico); FU (furfural); HMF (5-hidroximetil-furfural); VA (valinina); SE (seringaldeido); AFU (ácido ferúlico); AC (ácido cumárico).

9.2. Fermentações comparativas em glicose na presença de inibidores (*Saccharomyces*).

Inicialmente foi realizado os perfis fermentativos de três linhagens leveduras *Saccharomyces* para se comparar o efeito dos inibidores de hidrolisado sobre o metabolismo das leveduras. As fermentações foram realizadas em duplicatas biológicas sob condições aeróbicas em meio complexo YPD, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo um volume final de 50 mL.

Das sete linhagens de *Saccharomyces* analisadas (Figura 13), três foram selecionadas para a fermentação sendo elas: *S. cerevisiae* B1.1, G06 e JP1. Nesse sentido, os inibidores selecionados foram ácido acético (AA), HMF e vanilina (VA), nas concentrações 5, 3 e 1,5 g/L, respectivamente. O perfil fermentativo das leveduras também foi avaliado na ausência de inibidor, para fins comparativos com os demais perfis adquiridos.

Na presença de 5 g/L de AA, as três cepas aumentaram levemente a produção de etanol nas primeiras oito primeiras horas de fermentação, isso ocorre porque a levedura tem a tendência a produzir etanol quando o inibidor se acumula no interior celular levando a uma produção elevada de etanol.

Enquanto diminuíram a produção de biomassa em 24 horas de fermentação. *S. cerevisiae* G06 e JP1 mostraram um consumo de glicose ligeiramente melhor do que B1.1. Após oito horas de fermentação, consumiram cerca de 50% da glicose disponível, enquanto o B1.1 consumiu aproximadamente 23% da glicose disponível. De qualquer forma, as cepas G06 e JP1 foram capazes de consumir completamente toda a glicose em cerca de 24 horas de fermentação, enquanto a B1.1 apresentou glicose residual nas 24 horas de fermentação (Figura 14).

As três cepas de *Saccharomyces* acima mencionadas mostraram perfis fermentativos semelhantes na presença de HMF (Fig. 14). Da mesma forma, na presença de AA, o consumo de açúcar foi levemente alterado nas primeiras oito horas de fermentação, tendo todo o açúcar consumido após 24 horas.

A produção de biomassa e etanol não foi modificada, mas uma ligeira produção de glicerol foi observada (Fig. 14). O glicerol produzido durante a fermentação inicial de oito horas para *S. cerevisiae* G06 foi de 1,88 g/L em comparação com 2,4 g/L e 3,5 g/L para JP1 e B1.1, respectivamente. Todas essas três cepas de *S. cerevisiae* podem converter

todos os HMF presentes no meio em cerca de oito horas de fermentação, apresentando tolerância semelhante a este composto.

A vanilina não reduziu o consumo de açúcar e diminuiu a produção final de biomassa para todas as três cepas. Entretanto, a produção de etanol foi menos afetada pelo inibidor, com *S. cerevisiae* G06, JP1 e B1.1 produzindo 2,99 g/L, 5,3 g/L e 5,2 g/L de etanol em oito horas de fermentação, respectivamente. As três cepas foram capazes de converter toda VA presente no meio e produzir etanol em 24 horas (Figura 14).

A tolerância de *S. cerevisiae* e não-*Saccharomyces* a ácidos orgânicos, furaldeídos e compostos fenólicos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos foi comparada pela primeira vez neste estudo. Os resultados demonstraram uma resposta dose dependente de todas as leveduras aos inibidores, ou seja, a resposta da levedura ao inibidor varia conforme a quantidade de inibidor presente no meio.

A resposta dose-dependente das leveduras aos inibidores lignocelulósicos foi demonstrada especialmente para as cepas de *S. cerevisiae* e *S. stipitis* (ALMEIDA et al., 2009; LIU; SLININGER; GORSICH, 2005) no entanto, poucos estudos avaliaram e compararam a tolerância de outras leveduras.

Quando Pandey et al. (2019) compararam a tolerância das várias cepas de *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *S. stipitis*, *C. sheatae*, *C. lusitaniae*, *C. albicans*, *W. anomalus*, *O. thermophile*, *C. glabrata*, *P. kudriavzevii*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* em relação a furfural, HMF, ácido acético e etanol, uma cepa de *S. cerevisiae* destacou-se como a mais promissora para fermentação hidrolisado lignocelulósico.

Nossos resultados aqui demonstrados confirmaram os dados anteriormente apresentados por Pandey et al., (2019) o qual demonstrou a capacidade mais forte de cepas de *Saccharomyces* de suportar inibidores de hidrolisados lignocelulósicos.

Nesse sentido, a levedura *S. cerevisiae* é capaz de tolerar e destoxicar inibidores de hidrolisados, como no estudo apresentado por Akillioglu et al. (2011), em que esta levedura apresentou potencial de degradação do HMF durante o processo de fermentação.

As cepas de *S. cerevisiae* G06 e B1.1 foram isoladas como contaminantes em moinhos industriais, elas também podem ter sido selecionadas quanto à robustez. De fato, essas três cepas apresentaram resposta muito semelhante aos inibidores avaliados (Fig. 12). Resultados semelhantes foram observados para *Saccharomyces* isolados de cepas adaptadas na presença de ácido acético, mostrando tolerâncias variáveis, incluindo cepas capazes de suportar concentrações de ácido acético tão altas quanto 9 g/L (GONZÁLEZ-RAMOS et al., 2016).

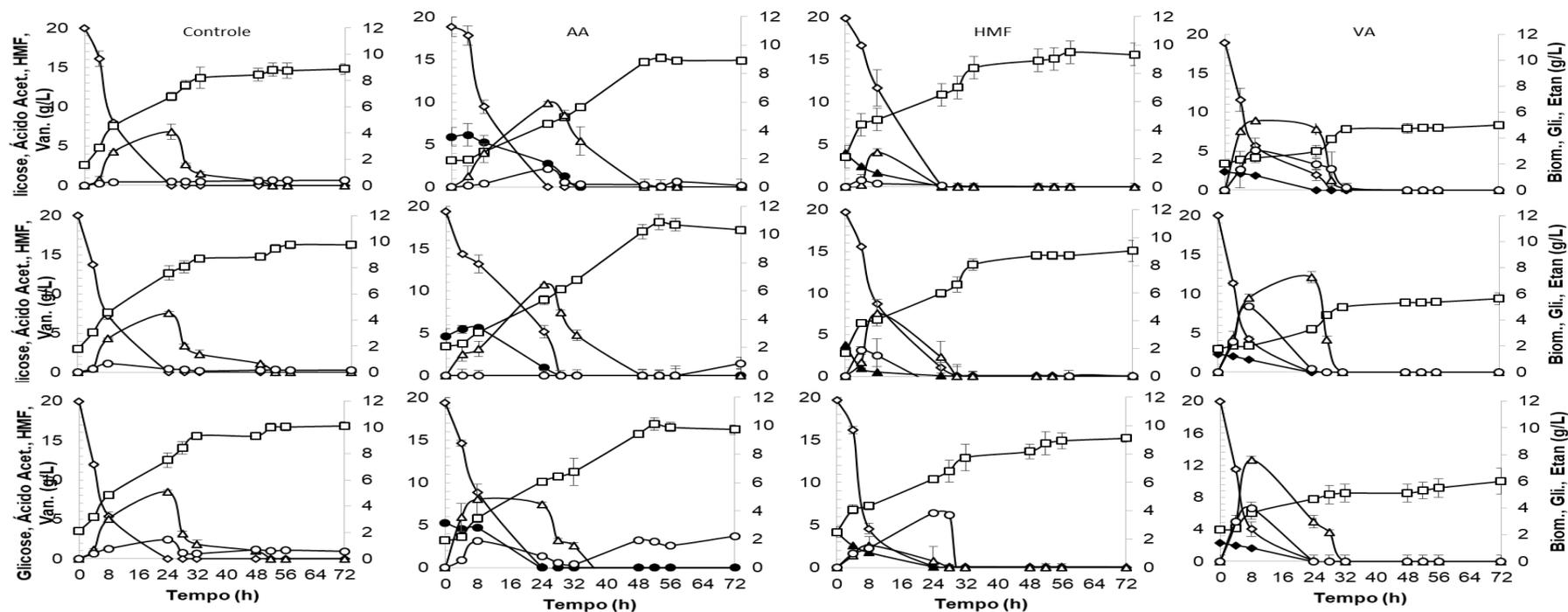


Figura 14. Fermentação de levedura em glicose na presença e ausência de inibidores. Primeira linha: *S. cerevisiae* JP1. Segunda linha: *S. cerevisiae* B1.1. Terceira linha: *S. cerevisiae* G06. Primeira coluna: controle (sem presença de inibidor no meio). Segunda coluna: ácido acético 5 g/L. Terceira coluna: HMF 3g/L. Quarta coluna: vanilina 1,5 g/L. Glicose g/L (\diamond); Biomassa g/L (\square); Glicerol g/L (\circ); Etanol g/L (Δ); HMF g/L (\blacktriangle); Vanilina g/L (\blacklozenge); ácido acético g/L (\bullet). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de duplicata biológica.

9.3. Fermentações comparativas em glicose na presença de inibidores (não-*Saccharomyces*)

Os desempenhos fermentativos de não-*Saccharomyces* *C. tropicalis* JA2, *M. caribbica* JA9, *Spathaspora sp.* JA1 e *W. anomalus* 740 foram avaliados na presença de AA 5 g/L, HMF 3 g/L e VA 1,5 g/L. Na ausência de inibidores, leveduras não-*Saccharomyces* consumiram toda a glicose no meio e produziram principalmente biomassa, etanol e glicerol. A presença de AA afetou a assimilação de açúcar e o crescimento de todas as linhagens de leveduras. No entanto, *C. tropicalis* JA2 e *W. anomalus* 740 foram capazes de apresentar consumo de glicose após oito horas de incubação, mesmo com um consumo mais lento por essas leveduras (Figura 15).

As cepas *C. tropicalis* JA2 e *W. anomalus* 740 foram capazes de consumir toda a glicose e o AA presentes no meio nas primeiras 48 horas de fermentação. Apesar da redução na taxa de consumo de açúcar, ambas as cepas apresentaram produção de metabólitos semelhante, quando comparadas à fermentação sem inibidores. Por outro lado, *Spathaspora sp.* JA1 e *M. caribbica* JA9 mostraram um consumo de açúcar muito lento e não foram capazes de consumir a glicose mesmo após 72 horas de fermentação (Figura 15).

Na presença de HMF, todas as leveduras não-*Saccharomyces* mostraram uma capacidade de desintoxicação, pois converteram todo o HMF em, aproximadamente, oito horas de fermentação (Figura 15). Como as leveduras *Saccharomyces*, as leveduras não-*Saccharomyces* não foram inibidas por 3 g/L de HMF nas condições testadas. O crescimento aeróbio das leveduras pode ter ajudado na desintoxicação rápida desse composto (Figura 15).

Quando na presença de VA, apenas *C. tropicalis* JA2 não apresentou redução na formação de biomassa (Figura 14). A redução da formação de biomassa das leveduras *Spathaspora sp.* JA1, *M. caribbica* JA9 e *W. anomalus* 740 foi correlacionada com o atraso no consumo de glicose, que levou cerca de 36 horas. Mesmo que a VA fosse convertida em Álcool Vanilil em aproximadamente, em 12 horas de fermentação apenas a *C. tropicalis* JA2 apresentou consumo de açúcar mas a formação de biomassa não esta semelhante ao do controle (Figura 15).

De acordo com o estudo de Ruyters et al. (2015), as leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* apresentaram alto potencial biotecnológico para processos

fermentativos uma vez que, são tolerantes a altas concentrações de açúcar (> 55%) para glicose e podem tolerar a presença de HMF nas concentrações de 2 a 7 g/L.

De acordo com o estudo de Blomqvist et al. (2011), a levedura *Dekkera bruxellensis* apresentou melhor crescimento e tolerância quando comparada a uma cepa de *S. cerevisiae* na presença dos inibidores furfural e HMF, nas concentrações 1,5 g/L e 1,65 g/L, respectivamente. No estudo comparativo de não-*Saccharomyces* apresentado por Mukherjee et al. (2017), leveduras como *W. anomalus* e *C. tropicalis* podem tolerar uma concentração de até 5 g/L de HMF, enquanto *S. cerevisiae* é inibida por HMF a uma concentração de 5 g/L, mesmo que o HMF seja considerado menos tóxico do que furfural em concentração equimolar (PIENKOS; ZHANG, 2009).

Neste trabalho, mostrou que essas leveduras foram inibidas na concentração de 5 g/L de HMF, as curvas de crescimento e as fermentações mostraram a capacidade de destoxificar o composto, ou seja, converte-lo da sua forma toxica para uma forma menos toxica e agressiva ao metabolismo da levedura quando estava na concentração de 3 g/L (LIU, 2018; NGUYEN et al., 2018; NGUYEN; IWAKI; IZAWA, 2015; SOARES, 2012). Leveduras não-*Saccharomyces*, por exemplo, *C. guilliermondii*, são inibidas por compostos fenólicos acima de 2 g/L de vanilina e 2 g/L de seringaldeído (CORTEZ; ROBERTO, 2010).

Esses dados foram confirmados neste trabalho, uma vez que leveduras não-*Saccharomyces*, como *W. anomalus* 740, sofreram inibição do crescimento na presença de 1,5 g/L de vanilina, mas, nessa concentração elas também tinham a capacidade de desintoxicar esse inibidor. Por sua vez, a levedura *C. tropicalis* JA2 tolerou essa mesma concentração e também teve a capacidade de desintoxicar a vanilina.

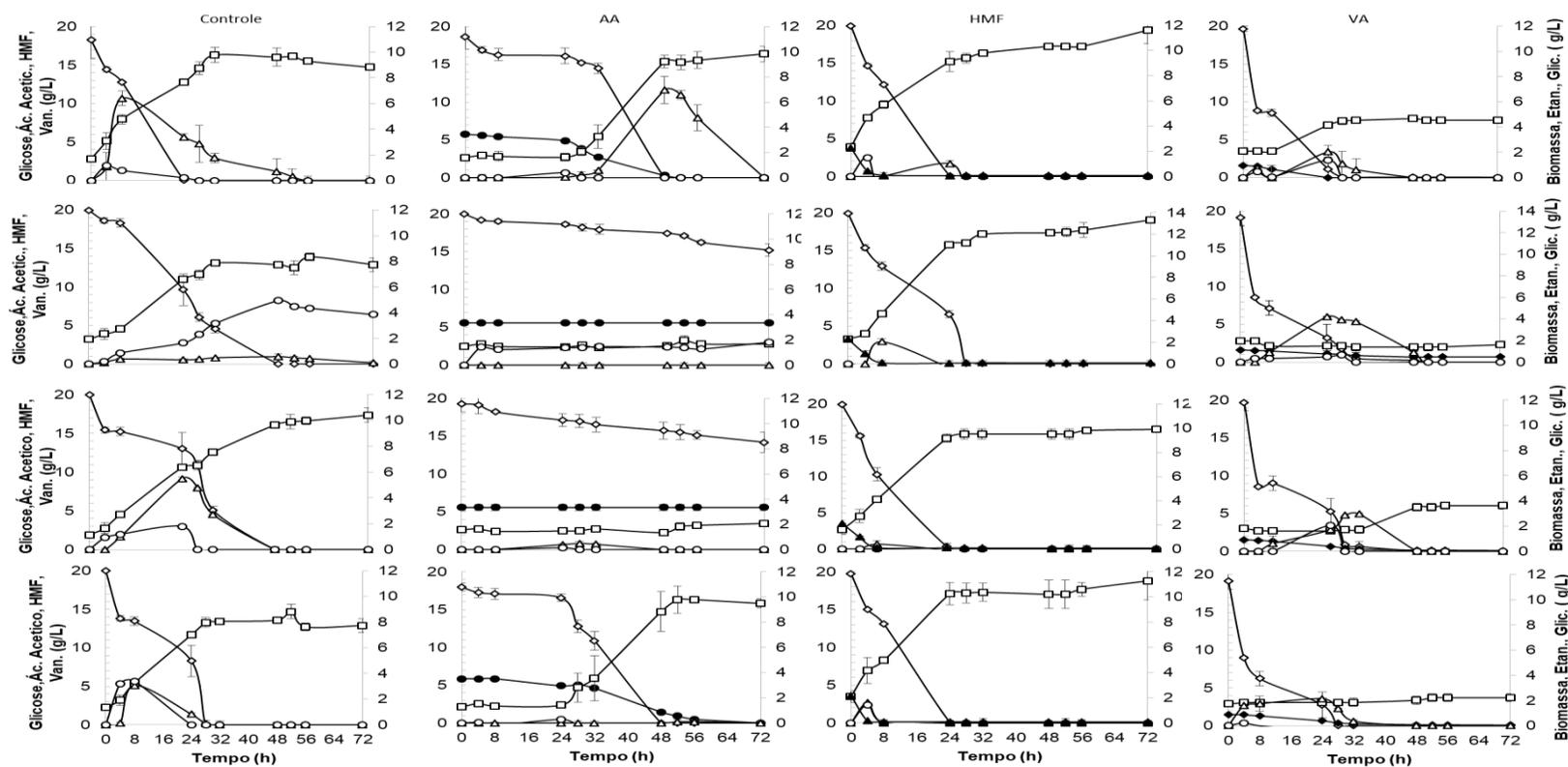


Figura 15. Fermentação de levedura em glicose na presença e ausência de inibidores. Primeira linha: *C. tropicalis* JA2. Segunda linha: *Spathaspora* sp. JA1. Terceira linha: *M. caribbica* JA9. Quarta linha: *W. anomalus* 740. Primeira coluna: controle (sem presença de inibidor no meio). Segunda coluna: ácido acético 5 g/L. Terceira coluna: HMF 3 g/L. Quarta coluna: vanilina 1,5 g/L. Glicose g/L (\diamond); Biomassa g/L (\square); Glicerol g/L (\circ); Etanol g/L (Δ); HMF g/L (\blacktriangle); Vanilina g/L (\blacklozenge); ácido acético g/L (\bullet). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de duplicata biológica.

9.4. Fermentações comparativas em xilose na presença de inibidores (não-*Saccharomyces*).

Os desempenhos fermentativos de não-*Saccharomyces* *C. tropicalis* JA2, *M. caribbica* JA9, *Spathaspora sp.* JA1 e *W. anomalus* 740 foram avaliados na presença de AA 5 g/L, HMF 3 g/L e VA 1,5 g/L. No perfil dos controles as quatro leveduras apresentaram capacidade de consumir xilose e produzir biomassa. Somente as linhagens *C. tropicalis* JA2 e *W. anomalus* 740 produziram cerca de 3 g/L de xilitol (Figura 16). Comparado aos inibidores nenhuma das quatro leveduras apresentou capacidade de tolerar com eficiência os inibidores avaliados. Os desempenhos fermentativos de *C. tropicalis* JA2, *M. caribbica* JA9, *Spathaspora sp.* JA1 e *W. anomalus* 740 na presença de AA 5 g/L, HMF 3 g/L e VA 1,5 g/L também foram avaliados usando xilose como única fonte de carbono.

Na presença de AA 5 g/L, apenas *C. tropicalis* JA2 apresentou consumo de xilose e produziu principalmente biomassa e xilitol durante a fermentação, enquanto as leveduras *Spathaspora sp.* JA1, *M. caribbica* JA9 e *W. anomalus* 740 tiveram um consumo de xilose pobre ou nenhum e, conseqüentemente, menor produção de metabólitos e biomassa (Figura 16).

Na presença de HMF e VA, houve um erro experimental na análise inicial da xilose, pois o meio possuíam apenas 10 g/L de açúcar disponível em comparação ao experimento controle, que possuía 20 g/L de xilose disponível, não sendo possível a produção de metabólitos nas mesmas proporções que o perfil controle e AA assim uma comparação bem definida e de informações detalhadas sobre esses inibidores ficou comprometida.

Na análise de HMF 3 g/L, pode-se verificar que leveduras não-*Saccharomyces* foram capazes de converter esse inibidor da sua forma mais tóxica (HMF) para a sua forma menos tóxica, desaparecendo completamente, ao mesmo tempo em que consumiam xilose. *C. tropicalis* JA2 e *M. caribbica* JA9 foram capazes de consumir completamente a xilose em cerca de 30 horas, enquanto *Spathaspora sp.* JA1 e *W. anomalus* 740 levaram, aproximadamente, 48 horas. Além disso, essas quatro leveduras podem produzir baixos níveis de metabólitos, < 2 g/L dos metabólitos (etanol, glicerol e xilitol), mesmo após 72 horas de fermentação na presença de HMF (Figura 16).

Por fim, analisando os perfis fermentativos de não-*Saccharomyces* na presença de 1,5 g/L VA, é possível observar que todas as leveduras foram fortemente afetadas por

esse inibidor (Figura 16). No entanto foram capazes de consumir a xilose disponível no meio e produzir biomassa. As leveduras passaram a consumir xilose somente após 32 horas de cultivo e a formação de biomassa pobre foi observada até 72 horas de cultivo. Ao final do processo de fermentação de 72 horas, as quatro leveduras produziram metabólitos em uma quantidade < 3 g/L.

Entre as leveduras não-*Saccharomyces*, *C. tropicalis* JA2, *M. caribbica* JA9 e *W. anomalus* 740 mostraram o melhor desempenho de crescimento na avaliação por microtitulação. No entanto, quando os desempenhos fermentativos dessas três linhagens foram avaliados, *M. caribbica* JA9 mostrou taxas reduzidas de consumo de açúcar e pouca formação de produto na presença de ácido acético, ao contrário das outras duas.

Esses resultados podem ser explicados pelo isolamento e seleção de *C. tropicalis* JA2 e *W. anomalus* 740 com base na utilização de xilose em hidrolisados lignocelulósicos, enquanto *M. caribbica* JA9 foi selecionado apenas pela capacidade de utilização de xilose (CARNEIRO; E SILVA; ALMEIDA, 2019; MORAIS JUNIOR et al., 2019; PANDEY et al., 2019; TRICHEZ et al., 2019).

Durante a fermentação da glicose, as leveduras não-*Saccharomyces* produziram etanol e glicerol apenas nas primeiras horas de fermentação e, após um período aproximado de 24 horas, começaram a usar etanol e glicerol como fontes secundárias de carbono para continuar investindo no crescimento da biomassa. O mesmo pode ser observado no trabalho de Nandal; Sharma & Arora. (2020), cujo estudo demonstrou rápido consumo de glicose (entre 24 e 48 horas) e gerou alto rendimento de etanol e crescimento de biomassa por *C. tropicalis* Y6 e *Pichia stipitis*.

Durante a fermentação de xilose, as leveduras apresentaram baixa produção de etanol e glicerol. Tal fato está de acordo com relatos da literatura, nos quais cerca de 1% das leveduras não-*Saccharomyces* que utilizam xilose como fonte de carbono chegam a produzir etanol, mesmo após consumir toda a xilose disponível no meio. Quando há mistura de glicose e xilose no meio de cultura, as leveduras não-*Saccharomyces* preferem a glicose como carbono primário para investir em crescimento e produção de metabólitos (NANDAL; SHARMA; ARORA, 2020).

As cepas *S. stipitis*, *S. passalidarum*, *S. arborariae* e *Spathaspora* sp. JA1 foram mais afetadas pelos inibidores, mostrando pouco crescimento em placas de microtitulação. Outros resultados indicaram que *S. stipitis* e *S. passalidarum* apresentam bons desempenhos fermentativos em hidrolisados e compostos únicos (CADETE et al., 2016b; RA et al., 2013; SU et al., 2018; SU; WILLIS; JEFFRIES, 2015), mas

comparações diretas não foram realizadas. Tendo em vista que variações experimentais, como tamanho do inóculo, concentrações de açúcar e inibidor, causam interferências diretas no desempenho das leveduras, a comparação exclusiva realizada neste estudo destacou a robustez de *C. tropicalis* JA2 e *W. anomalus* 740 em relação a inibidores derivados de hidrolisados lignocelulósicos.

Considerando as concentrações de inibidores normalmente encontradas nos hidrolisados de biomassa e utilizadas neste estudo, dentre os oito inibidores avaliados, os ácidos acético e fórmico foram os mais tóxicos para leveduras de *Saccharomyces*, enquanto os ácidos cumárico e ferúlico foram os menos tóxicos. Além do ácido acético e ácido fórmico, leveduras não-*Saccharomyces* também apresentaram maior sensibilidade ao HMF e à vanilina.

Apesar de concentrações não-equimolares de inibidores terem sido empregadas neste estudo, esses resultados indicaram importantes limiares para o desempenho da levedura em cada inibidor. Como a composição dos hidrolisados é variável e depende da biomassa e dos processos empregados em seus pré-tratamentos e hidrólise (ALMEIDA et al., 2007), esses resultados podem indicar o perfil químico desejável dos hidrolisados a serem obtidos.

No estudo apresentando por Morais Junior et al. (2019), a *C. tropicalis* JA2 foi selecionada como uma cepa tolerante ao hidrolisado de cana-de-açúcar, indicando, assim, a sua eficiência de produção de xilitol, tendo o hidrolisado enriquecido com xilose. Já a *W. anomalus* 740 é apresentada no estudo de Carneiro et al. (2019) como um tolerante a inibidores de hidrolisado enriquecido com xilose e uma produtora de xilitol. Esses dados foram confirmados no presente estudo para ambas as leveduras.

Neste trabalho, a vanilina, na concentração de 1,5 g/L, demonstrou-se tóxica para as leveduras não-*Saccharomyces*, afetando o crescimento da biomassa, porém quase não afetou o crescimento das leveduras *Saccharomyces*.

Assim, foi comprovado pelos dados obtidos que os ácidos orgânicos, os furaldeídos e compostos fenólicos em altas concentrações têm maior efeito inibitório sobre o perfil de crescimento em duas das quatro leveduras não-*Saccharomyces*. Além disso, foi demonstrado que leveduras não-*Saccharomyces* são mais sensíveis que as *Saccharomyces*, o que está de acordo com dados previamente reportados por (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Nossos resultados confirmam dados anteriores apresentados com o por exemplo Almeida et al. (2009), que demonstrou que diferentes linhagens de leveduras

Saccharomyces apresentam diferentes graus de tolerância aos inibidores presente no hidrolisado lignocelulósico. O mesmo foi observado para as leveduras não-*Saccharomyces*.

Os furaldeídos HMF e furfural, em conjunto, apresentam uma sinergia que provoca um maior efeito inibitório sobre o metabolismo das leveduras (ALMEIDA et al., 2009). No entanto, em um estudo apresentado por Silva et al. (2015), os inibidores HMF e furfural, quando analisados separadamente, não apresentaram inibição significativa sobre o crescimento da levedura *P. stipitis*. Neste trabalho, quando esses inibidores foram avaliados de maneira separada, o HMF demonstrou maior efeito inibitório em relação ao furfural sobre as leveduras não-*Saccharomyces* nas concentrações de 5 e 3 g/L, respectivamente.

No estudo apresentado por Endo et al. (2008), a vanilina demonstrou ser tóxica em concentrações altas (> 3 g/L) para as leveduras *Saccharomyces*, inibindo quase 50% o crescimento da levedura quando comparado com concentrações menores. O estudo apresentado por Cortez & Roberto (2010) demonstra que há inibição completa de crescimento da levedura *C. guilliermondii* quando esta se encontra na presença de vanilina até 3 g/L, tendo a xilose como fonte de carbono. Neste trabalho, foi demonstrado que, com a vanilina abaixo de 2 g/L, pode ocorrer o consumo pelas leveduras não-*Saccharomyces* devido à baixa concentração no meio, apesar de ela afetar o crescimento da biomassa na presença de xilose e glicose como fonte de carbono.

A tolerância aos inibidores e o desempenho das células durante a fermentação estão diretamente ligados ao estresse de adaptação imposto pela fonte de carbono utilizada. Desse modo, o efeito do substrato no metabolismo do microrganismo afeta o seu comportamento quando este está em contato com um inibidor de hidrolisado (JOHANSSON; XIROS; LARSSON, 2014).

Neste trabalho, essa relação foi apresentada na comparação entre as fermentações que utilizaram glicose e xilose como fonte de carbono na presença e na ausência de inibidores. As fermentações em xilose demonstraram que as leveduras não-*Saccharomyces* necessitavam de mais tempo de adaptação na fermentação tanto para consumo, quanto para se adaptar à toxicidade do inibidor presente no meio de cultura, quando comparadas na presença de glicose.

Por fim, as análises do *heat map* demonstraram que, dentre os oito inibidores testados nesse trabalho, os ácidos orgânicos são altamente tóxicos, com destaque para o ácido fórmico, para ambos os grupos de leveduras, e os ácidos ferúlico e ácido cumárico

são considerados os menos tóxicos para ambos os grupos de leveduras. No caso, a *C. tropicalis* JA2 mostrou-se a linhagem mais tolerante das não-*Saccharomyces* e a *Spathaspora sp.* JA1 como a levedura menos tolerante.

Um mecanismo de saber como ocorrer a resposta de tolerância aos inibidores são as expressões genicas ligadas diretamente ao estado de estresse em que a levedura se encontra. No trabalho de Ma & Liu (2010), foi listado uma lista de genes que são super-expressados quando a levedura se encontra na presença de HMF. Alguns desses genes são os *YAP1*, *PDR1*, *PDR3*, *RPN4* e *HSF1* que são genes chaves e reguladores na adaptação a fase lag na presença de HMF, outros genes conhecidos são as ADH6 e ADH7 (MA; LIU, 2010; NGUYEN; IWAKI; IZAWA, 2015; PETERSSON et al., 2006).

Já para outros inibidores como o ácido acético alguns genes já são conhecidos como responsáveis por responder ao estresse oxidativo na presença do inibidor sendo eles ASG1, ADH3, SKS1 e GIS4 (GONZÁLEZ-RAMOS et al., 2016). Por fim para compostos fenólicos alguns genes e enzimas são conhecidos devido à grande variedade de compostos que podem ser gerados com a quebra da lignina. Pegando como exemplo a vanilina que é a mais estudada na literatura, o gene ADH7 é produzido como resposta a tolerância na presença do inibidor, enquanto a enzima vanillin dehydrogenase activity atua na resposta de catalises de reação ao estresse auxiliadas com cofatores NAD⁺ (NGUYEN; IWAKI; IZAWA, 2015; SGD, 2020).

Recentemente em um estudo elaborado por Nguyen et al (2018) o gene expresso VFH1 (YII056C) promove a formação da proteína de forma significativa em situação de alto estresse causado pela presença de vanilina. Além disso já foi demonstrado na literatura que o promotor VFH1 permitiu a síntese de proteínas de outros genes incluindo GFP e ALD6 também sob estresse severo de vanilina, por exemplo, numa concentração acima de 3 g/L para leveduras *S. cerevisiae*. Também é sabido que esse gene VHF1 é induzido pela presença dos inibidores furfural e HMF em diferentes concentrações durante a fase de estresse oxidativo da fase lag (NGUYEN et al., 2018; SGD, 2020).

Em conclusão, este trabalho mostrou a resposta dose-dependente de leveduras em relação a oito diferentes inibidores derivados de hidrolisados lignocelulósicos. Entre as quatorze leveduras comparadas, as linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram tolerância maior, mas, mesmo entre elas, algumas linhagens com tolerâncias mais altas puderam ser identificadas. Entre sete espécies de não-*Saccharomyces*, *C. tropicalis* JA2 e *W. anomalous* 740 apareceram como as mais tolerantes, enquanto as cepas de *Spathaspora* pareciam muito sensíveis aos diferentes compostos. Esses resultados podem estar

relacionados aos processos de isolamento e seleção dessas leveduras. Uma comparação cuidadosa das respostas de tolerância aos inibidores deve ser realizada no futuro para explicar os desempenhos obtidos neste estudo.

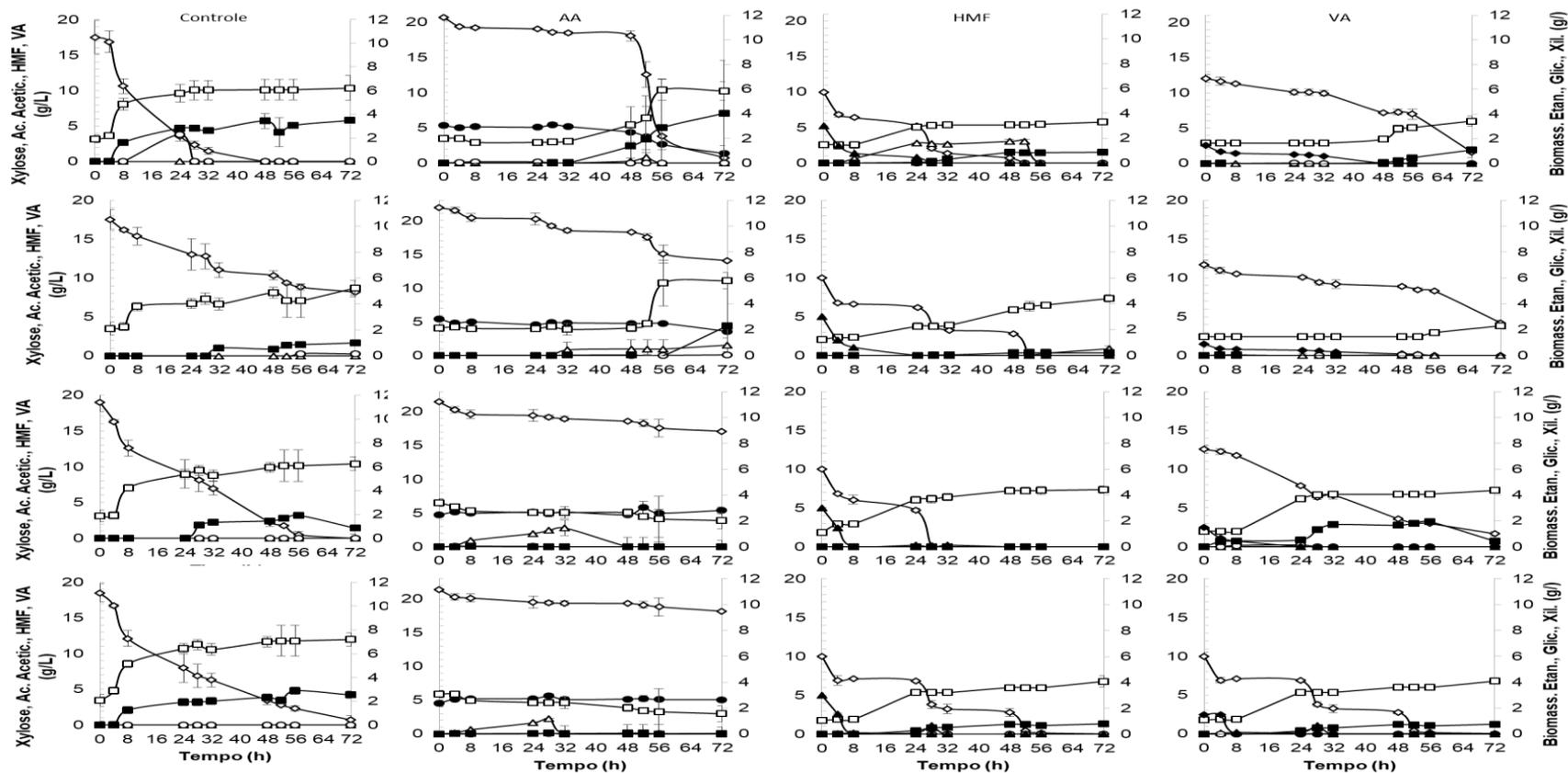


Figura 16. Fermentação de levedura em xilose na presença e ausência de inibidores. Primeira linha: *C. tropicalis* JA2. Segunda linha: *Spathaspora* sp. JA1. Terceira linha: *M. caribbica* JA9. Quarta linha: *W. anomalus* 740. Primeira coluna: controle (sem presença de inibidor no meio). Segunda coluna: ácido acético 5 g/L. Terceira coluna: HMF 3g/L. Quarta coluna: vanilina 1,5 g/L; Xilose g/L (\diamond); Biomassa g/L (\square); Glicerol g/L (\circ); Etanol g/L (Δ); HMF g/L (\blacktriangle); Vanilina g/L (\blacklozenge); ácido acético g/L (\bullet); xilitol (\blacksquare). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de duplicata biológica.

10. Conclusões

Os resultados de caracterização e potencial biotecnológico das leveduras *Spathaspora sp.* JA1 e *M. caribbica* JA9 foram avaliados nesse trabalho demonstraram que essas duas linhagens apresentam capacidade de consumir xilose e produzirem xilitol na presença do hidrolisado lignocelulósico.

Os resultados experimentais demonstram que é possível obter linhagens de leveduras não-*Saccharomyces* com diferentes graus de tolerância a diferentes inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico. Também é possível demonstrar que ambos os grupos de leveduras apresentaram diferentes graus de tolerância aos inibidores avaliados neste trabalho.

Entre os dois grupos de leveduras avaliados, o grupo das *Saccharomyces* demonstrou-se mais tolerante aos inibidores de hidrolisado, sendo mais afetadas principalmente pelos ácidos orgânicos, com destaque para o ácido fórmico, o qual, numa concentração de 5 g/L, interfere em seu crescimento.

Dentre as leveduras avaliadas neste experimento, destacam-se como mais tolerantes aos inibidores as linhagens *C. tropicalis* JA2, *W. anomalus* 740, *S. cerevisiae* G06, B1.1 e JP1. Essas leveduras apresentaram melhores taxas de crescimento e produtividade de metabólitos como o etanol e glicerol tanto no perfil fermentativo quanto nas curvas de crescimento.

Dessa maneira, os perfis fermentativos das leveduras demonstram que todas as leveduras avaliadas na presença de inibidores ocorrem a destoxificação biológica, cuja ação se torna importante para a ação de adaptação da levedura aos inibidores de hidrolisado lignocelulósico.

11. Referência

- AKILLIOGLU, H. G.; MOGOL, B. A.; GÖKMEN, V. Degradation of 5-hydroxymethylfurfural during yeast fermentation. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 28, n. 12, p. 1629–1635, 2011.
- ALBUQUERQUE, T. L. DE et al. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1779–1789, 2014.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Mini-Review Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 82, p. 340–349, 2007.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. NADH- vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 939–945, 2008.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 625–638, 2009.
- 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.
- ANDRADE, E. T. DE; CARVALHO, S. R. G. DE; SOUZA, L. F. DE. Programa Do Proálcool E O Etanol No Brasil. **Engevista**, v. 11, n. 2, p. 127–136, 2010.
- ANTONANGELO, A. Genotipagem de leveduras presentes no processo industrial de produção de álcool combustível e estudo do polimorfismo de genes envolvidos no processo fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae*. **Aleph**, p. 80 f., 2012.
- ATKINS, S. D.; CLARK, I. M. Fungal molecular diagnostics: A mini review. **Journal of Applied Genetics**, v. 45, n. 1, p. 3–15, 2004.
- BAÊTA, B. E. L. Aproveitamento energético a partir da digestão anaeróbia de hidrolisado hemicelulósico gerado pelo pré-tratamento por auto-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar considerando o contexto da biorrefinaria. p. 0–60, 2016.
- BAHIA FILHO, O. et al. Desvendando a medição nos ensaios químicos: 1. A curva analítica ou de calibração. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 3, p. 251–261, 2011.
- BAPTISTA, C. V. R. Efeitos inibitórios do hidroximetilfurfural na fermentação

alcoólica : avaliação por Citometria de Fluxo. 2013.

BARBOSA, A. C. et al. *Candida materiae* sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood in the Atlantic rain forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2104–2106, 2009.

BARBOSA, M. F. S. et al. Screening of yeasts for production of xylitol from d-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 241–251, 1988.

BERGENSTRÄHLE, M. et al. Simulation studies of the insolubility of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 14, p. 2060–2066, 2010.

BERGMANN, J. C. et al. Biotechnological Application of Non-conventional Yeasts for Xylose Valorization. In: SIBIRNY, A. (Ed.). . **Nonconventional Yeasts: from Basic Research to Application**. 1. ed. [s.l.] Springer International Publishing, 2019. p. 23–74.

BIER, M. C. J. et al. Crescimento e consumo de Xilose de *Candida guilliermondii* na fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar. **Evidência**, v. 7, n. 2, p. 119–130, 2007.

BLOMQUIST, J. et al. Fermentation of lignocellulosic hydrolysate by the alternative industrial ethanol yeast *Dekkera bruxellensis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 73–78, 2011.

BORNEMAN, W. S.; AKIN, D. E.; VANESELTINE, W. P. Effect of Phenolic Monomers on Ruminal Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 1331–1339, 1986.

CADETE, R. M. et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 8, p. 1338–1342, 2009.

CADETE, R. M. et al. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

CADETE, R. M. et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* 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, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 421–431, 2013.

CADETE, R. M. et al. The yeast *Scheffersomyces amazonensis* is an efficient xylitol producer. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, 2016a.

- CADETE, R. M. et al. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016b.
- CADETE, R. M.; ROSA, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. **Yeast**, v. 35, n. 2, p. 191–199, 2018.
- CAMPOS, V. J. **CHARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2015.
- CANILHA, L. et al. Sacarificação Da Biomassa Lignocelulósica Através De Pré-Hidrólise Ácida Seguida Por Hidrólise Enzimática: Uma Estratégia De “Desconstrução” Da Fibra Vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, p. 48–54, 2009.
- CARDOSO, W. S. et al. Pré-tratamento de biomassa para produção de etanol de segunda geração. **Revista Analytica**, n. 56, p. 64–78, 2012.
- CARNEIRO, C. V. G. C.; E SILVA, F. C. DE P.; ALMEIDA, J. R. M. Xylitol production: Identification and comparison of new producing yeasts. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, p. 1–15, 2019.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 11, p. 849–864, 2008.
- CASPETA, L.; CASTILLO, T.; NIELSEN, J. Modifying yeast tolerance to inhibitory conditions of ethanol production processes. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, n. NOV, p. 1–15, 2015.
- CÉSAR, M.; BIER, J. *Guilliermondii* Na Fermentação Submersa Utilizando-Se Bagaço De Cana-De-Açúcar. p. 119–130, 2007.
- CHANDEL, A. K. **Advances in Sugarcane Biorefinery Technologies , Commercialization , Policy Issues and Paradigm Shift for Bioethanol and By-Products**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.
- CLAUSEN, M. et al. PAD1 encodes phenylacrylic acid decarboxylase which confers resistance to cinnamic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 142, n. 1, p. 107–112, 1994.
- CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1858–1865, 2010.

- DA SILVA FILHO, E. A. et al. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 481–486, 2005.
- DE ARRUDA, P. V. et al. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, v. 22, n. 4, p. 815–822, 2011.
- DE MELLO, F. DA S. B. et al. Static microplate fermentation and automated growth analysis approaches identified a highly-aldehyde resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, n. October 2018, p. 49–58, 2019.
- DE MELO, H. F. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2006.
- DELLA-BIANCA, B. E. et al. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry ? p. 979–991, 2013.
- DEPARIS, Q. et al. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. **FEMS yeast research**, v. 17, n. 4, p. 1–35, 2017.
- DU PLESSIS, H. et al. Effect of *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces* yeasts and malolactic fermentation strategies on fermentation kinetics and flavor of Shiraz wines. **Fermentation**, v. 3, n. 4, p. 1–24, 2017.
- DUNLOP, A. P. Furfural Formation and Behavior. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 204–209, 1948.
- ENDO, A. et al. Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, p. 1–6, 2008.
- FERREIRA, A. D. et al. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, v. 28, n. May, p. 547–554, 2011.
- FONSECA, B. G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.
- FUGITA, T. Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. **Aleph**, 2010.
- GONZÁLEZ-RAMOS, D. et al. A new laboratory evolution approach to select for

- constitutive acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of causal mutations. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2016.
- GUAMÁN-BURNEO, M. C. et al. Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* f.a., sp. nov. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 108, n. 4, p. 919–931, 2015.
- HASUNUMA, T. et al. Efficient fermentation of xylose to ethanol at high formic acid concentrations by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 997–1004, 2011.
- HASUNUMA, T.; KONDO, A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1207–1218, 2012.
- HOWELL, K. S. et al. Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 315–320, 2004.
- JIN, Y. S. et al. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing genes for xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Pichia stipitis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 564–567, 2000.
- JOHANSSON, E.; XIROS, C.; LARSSON, C. Fermentation performance and physiology of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* during growth in high gravity spruce hydrolysate and spent sulphite liquor. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.
- JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts - The ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 503–517, 2013.
- JONES, D. L. Jones 1998. p. 25–44, 1998.
- JONES, D. L. et al. Organic acid behavior in soils - Misconceptions and knowledge gaps. **Plant and Soil**, v. 248, n. 1–2, p. 31–41, 2003.
- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.
- KOTTER, P.; CIRIACY, M. Microbiology Biotechnology Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 776–783, 1993.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across

- computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.
- KURTZMAN, C. P. **The Yeast, “A Taxonomic Study”**. 5. ed. Amsterdam: [s.n.].
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Kurtzman, Robnett - 1998 - Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subu.pdf. v. 98, n. 183584, p. 331–371, 1998.
- KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera Babjeviella, Meyerozyma, Millerozyma, Priceomyces, and Scheffersomyces. **Mycoscience**, v. 51, n. 1, p. 2–14, 2010.
- KWEON, S. H. Determination of optimum conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Kor. J. Biotechnol. Bioeng.**, v. 8, n. 5, p. 452–456, 1993.
- LAADAN, B. et al. Identification of an NADH-dependent 5-hydroxymethylfurfural-reducing alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 25, p. 191–198, 2008.
- LEE, T. et al. A Parametric Study on Ethanol Production from Xylose by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 5, n. 1, p. 27–31, 2000.
- LI, Y. et al. Growth kinetics and phenol biodegradation of psychrotrophic *Pseudomonas putida* LY1. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6740–6744, 2010.
- LIU, Z. L. et al. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 345–352, 2004.
- LIU, Z. L. L. Understanding the tolerance of the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* against a major class of toxic aldehyde compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 13, p. 5369–5390, 2018.
- LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; GORSICH, S. W. Enhanced Biotransformation of Furfural and Hydroxymethylfurfural by Newly Developed Ethanologenic Yeast Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, n. 1–3, p. 0451–0460, 2005.
- LONG, T. M. et al. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5492–5500, 2012.
- LOPES, D. D. et al. Draft Genome Sequence of the D-Xylose-Fermenting Yeast *Spathaspora xylofermentans* UFMG-HMD23.3. **genome Announcements**, v. 5, n. 33, p. 2, 2017.

LOPES, M. R. et al. Genomic analysis and D-xylose fermentation of three novel *Spathaspora* species: *Spathaspora girioi* sp. nov., *Spathaspora hagerdaliae* f. a., sp. nov. and *spathaspora gorwiae* f. a., sp. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 4, p. 1–12, 2016.

LYRA COLOMBI, B. et al. EFEITO DE COMPOSTOS INIBIDORES NA BIOCONVERSÃO DE GLICOSE EM ETANOL POR LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*. **Engevista**, v. 19, n. 2, p. 339, 2017.

MA, M.; LIU, Z. L. Comparative transcriptome profiling analyses during the lag phase uncover YAP1, PDR1, PDR3, RPN4, and HSF1 as key regulatory genes in genomic adaptation to the lignocellulose derived inhibitor HMF for *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 660, 2010.

MACHADO, C. M. M. **Microrganismos na Produção de Biocombustíveis Líquidos**. 1a. ed. Brasília - DF: Embrapa agroenergia, 2013.

MAGUIRE, S. L. et al. Comparative genome analysis and gene finding in *Candida* species using CGOB. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 6, p. 1281–1291, 2013.

MATTAM, A. J. et al. Cellulolytic enzyme expression and simultaneous conversion of lignocellulosic sugars into ethanol and xylitol by a new *Candida tropicalis* strain. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.

MEIGHAN, B. N. Fracionamento De Bagaço De Cana-De-Açúcar Por Processo Hidrotérmico E Organossolve No Contexto Da Biorrefinaria Lignocelulósica. **Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental Mestrado em Engenharia Ambiental**, 2016.

MIRHENDI, H. et al. A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important *Candida* Species. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 47, p. 225–229, 2006.

MORAIS JUNIOR, W. G. et al. Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *Candida tropicalis* JA2 strain. **Yeast**, v. 36, n. 5, p. 349–361, 2019.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673–686, 2005.

MOURO, A. **Fermentação De Xilose E Celobiose Por Leveduras Isoladas Da Biodiversidade Brasileira**. [s.l.] Universidade de Santa Catarina, 2012.

MUKHERJEE, V. et al. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. **Biotechnology for**

Biofuels, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2017.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. **Industrial Crops and Products**, v. 25, n. 2, p. 231–237, 2007.

NANDAL, P.; SHARMA, S.; ARORA, A. Bioprospecting non-conventional yeasts for ethanol production from rice straw hydrolysate and their inhibitor tolerance. **Renewable Energy**, v. 147, p. 1694–1703, 2020.

NETO, C. B. S. **DEGRADAÇÃO DE GOSSIPOL POR MACROFUNGOS E ANÁLISE DO SECRETOMA DE PANUS LECOMTEI DURANTE CRESCIMENTO EM CAROÇO DE ALGODÃO**. [s.l.] UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 2019.

NGUYEN, N. H. et al. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p. 1232–1241, 2006.

NGUYEN, T. T. M. et al. The VFH1 (YLL056C) promoter is vanillin-inducible and enables mRNA translation despite pronounced translation repression caused by severe vanillin stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 35, n. 7, p. 465–475, 2018.

NGUYEN, T. T. M.; IWAKI, A.; IZAWA, S. The ADH7 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is vanillin-inducible and enables mRNA translation under severe vanillin stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. DEC, p. 1–11, 2015.

NOGAE, I.; JOHNSTON, M. Isolation and characterization of the ZWF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Gene**, v. 96, n. 2, p. 161–169, dez. 1990.

OLIVEIRA, B. C. Complexidade em biorrefinarias. p. 125, 2016.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312–331, 1996.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 375–380, 1990.

PANDEY, A. K. et al. Evaluation of divergent yeast genera for fermentation-associated stresses and identification of a robust sugarcane distillery waste isolate *Saccharomyces cerevisiae* NGY10 for lignocellulosic ethanol production in SHF and SSF.

Biotechnology for Biofuels, v. 12, n. 1, p. 1–23, 2019.

PAVLAK, D. M. M. et al. ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO DE BATATA-DOCE UTILIZANDO DIFERENTES LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae*. **Quim. Nova**, v. 34, n. 1, p. 82–86, 2011.

PEREZ, C. et al. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA UTILIZANDO *Saccharomyces cerevisiae* RECOMBINANTE IMOBILIZADA. p. 2027–2030, 2018.

PETERSSON, A. et al. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. **Yeast**, v. 23, n. 6, p. 455–464, 2006.

PETRECHEN, G. P. **CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS DA CASTANHA DO BRASIL (*Bertholletia excelsa*), PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SEUS COMPÓSITOS COM POLIPROPILENO**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2017.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PIENKOS, P. T.; ZHANG, M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 743–762, 2009.

PRAKASH, G. et al. Microbial production of xylitol from d-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3304–3308, 2011.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. Fasttree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 7, p. 1641–1650, 2009.

RA, C. H. et al. Biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) by *Scheffersomyces stipitis* during ethanol fermentation of hydrolysate of the seaweed *Gelidium amansii*. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 421–425, 2013.

RAO, R. S. et al. Xylitol production by *Candida* sp.: Parameter optimization using Taguchi approach. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 951–956, 2004.

RAO, R. S. et al. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates

- by *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1974–1978, 2006.
- REIS, V. C. B. et al. Genetic characterization and construction of an auxotrophic strain of *Saccharomyces cerevisiae* JP1, a Brazilian industrial yeast strain for bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 11, p. 1673–1683, 2012.
- RODRIGUES, J. A. R. Do Engenho a Biorrefinaria. A Usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1242–1254, 2011.
- RUYTERS, S. et al. Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 39–48, 2015.
- SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Mol Biol Evol**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.
- SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 5, p. 315–318, 1988.
- SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270–5295, 2008.
- SEHNEM, N. T. et al. Bioconversion of soybean and rice hull hydrolysates into ethanol and xylitol by furfuraldehyde-tolerant strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, and their cofermentations. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 7, n. 2, p. 199–206, 2017.
- SERPA, J. DE F. PRODUÇÃO DA ENZIMA XILOSE REDUTASE POR *Candida tropicalis* ATCC750 USANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DO BAGAÇO DE CAJU. 2016.
- SGD. **Saccharomyces Genome Database**. Disponível em: <<http://www.yeastgenome.org/>>.
- SILVA, A. DE S.; OLIVEIRA JUNIOR, A. M.; ABUD, A. K. DE S. VIABILIDADE CELULAR DE *Pichia stipitis* CULTIVADA EM MEIO MÍNIMO E SOBRE A PRESENÇA DE INIBIDORES. **Anais do Simpósio Nacional de Bioprocessos**, v. XX, n. September, 2015.
- SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.

SOARES, C. E. V. F. **CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS CONSUMIDORAS DE XILOSE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI – TOF.** [s.l.]

Universidade Católica de Brasília, 2015.

SOARES, C. E. V. F.; ALMEIDA, J. R. M. Leveduras não- *Saccharomyces* tolerantes a diferentes compostos químicos de hidrolisado lignocelulósico. **V Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia: Anais**, v. 5, p. 2, 2018.

SOARES, L. B. et al. Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-*saccharomyces* species.

Biomass and Bioenergy, v. 137, n. April, p. 105549, 2020.

SOARES, L. C. D. S. R. **Destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para utilização em processos fermentativos.** [s.l.]

Universidade de São Paulo, 2012.

STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas.** [s.l.: s.n.].

SU, Y. K. et al. *Spathaspora passalidarum* selected for resistance to AFEX hydrolysate shows decreased cell yield. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 6, p. 1–14, 2018.

SU, Y. K.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 457–469, 2015.

TAHERZADEH, M. J. et al. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 701–708, 2000.

TAMURA, K.; NEI, M.; KUMAR, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 30, p. 11030–11035, 2004.

TRICHEZ, D. et al. Physiological and comparative genomic analysis of new isolated yeasts *Spathaspora* sp. JA1 and *Meyerozyma caribbica* JA9 reveal insights into xylitol production. **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 4, p. 1–15, 1 jun. 2019.

UŁASZEWSKI, S. Interactions between the gene products of *pma1* encoding plasma membrane H(+)-ATPase, and *pdr1* controlling multiple drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta biochimica Polonica**, v. 40, n. 4, p. 487–496, 1993.

ULBRICHT, R. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions.

Fundamental and Applied Toxicology, v. 4, n. 5, p. 843–853, 1984.

VAGNOLI, P.; BISSON, L. F. The SKS1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is required for long-term adaptation of *snf3* null strains to low glucose. **Yeast (Chichester, England)**, v. 14, n. 4, p. 359–369, mar. 1998.

VAUGHAN-MARTINI, A. et al. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 4–5, p. 463–469, 2005.

VERAS, H. C. T.; PARACHIN, N. S.; ALMEIDA, J. R. M. Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2017.

WANG, L. et al. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel fungal strain *Paecilomyces variotii* JH6. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, n. 1–3, p. 366–371, 2010.

WEISS, S. et al. YeastIP: A database for identification and phylogeny of *Saccharomycotina* yeasts. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 1, p. 117–125, 2013.

WOHLBACH, D. J. et al. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 32, p. 13212–13217, 2011.

XU, F. et al. Determination of cell wall ferulic and p-coumaric acids in sugarcane bagasse. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 207–217, 2005.

YE, T. et al. Gis4, a new component of the iron homeostasis system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 10, p. 1611–1621, 2006.

YEON, J. H. et al. Bioethanol production from the hydrolysate of rape stem in a surface-aerated fermentor. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 109–114, 2011.

YI, X. et al. Transcriptome analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 reveals mechanisms of tolerance and detoxification of phenolic aldehyde inhibitors from lignocellulose pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2015.

ZAMPIERI, D. **EXPRESSÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO EM *Penicillium echinulatum***. [s.l.] Universidade de Caxias do Sul, 2011.

ZAMPIERI, D. **Expressão gênica e atividades de celulasas, β -glicosidasas, xilanases e swoleninas de *Penicillium echinulatum* S1M29**. [s.l.] UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL, 2015.

ZANCANARI, J. S. Produção de Xilitol : Revisão das pesquisas relacionadas à sua

produção nos últimos anos e principais aplicações. p. 39, 2012.

ZAUTSEN, R. R. M. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO SIMULTÂNEA DE ETANOL E INIBIDORES PROVENIENTES DE CALDO HIDROLÍTICO DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA. [s.l.]

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2011.

Apêndice A: Curvas de crescimento na presença de inibidores das leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*

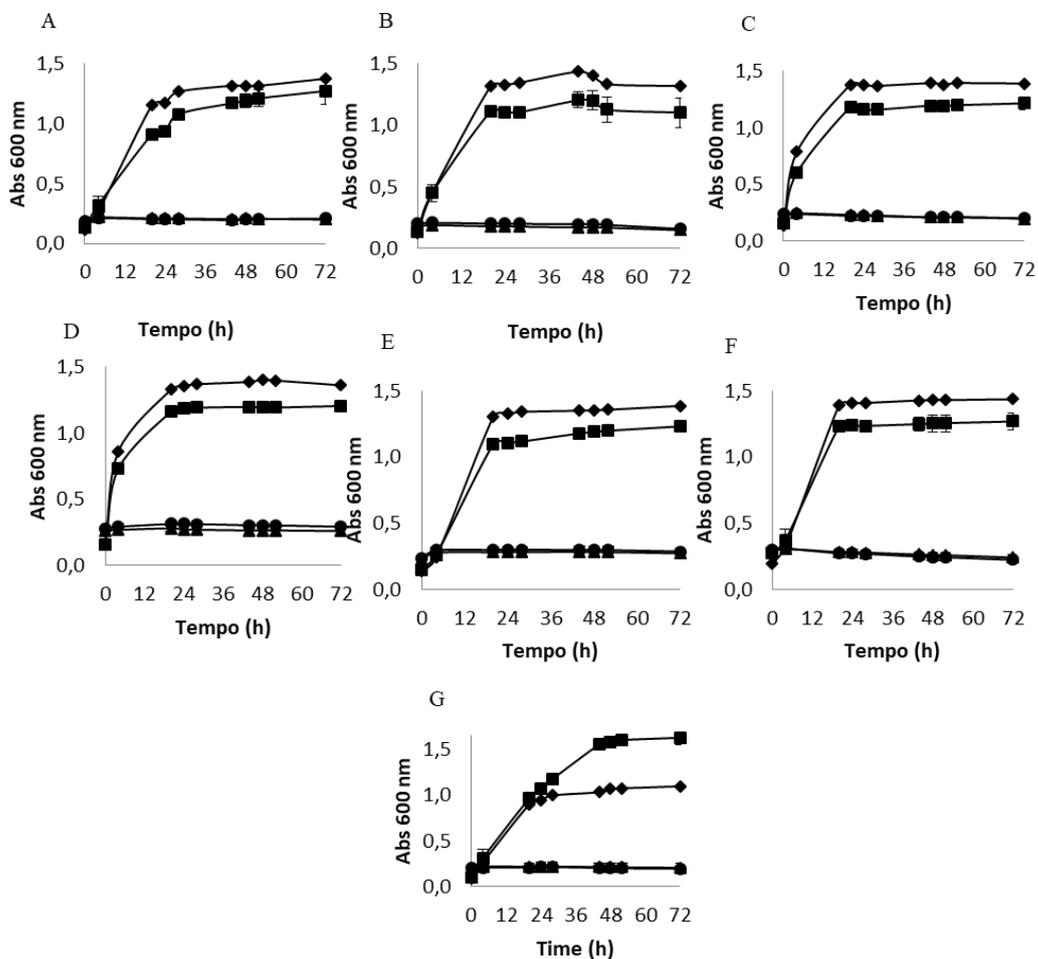


Figura 1. Curva de crescimento (A) *S. cerevisiae* A11; (B) *S. cerevisiae* A12; (C) *S. cerevisiae* B1.1 (D) *S. cerevisiae* CAT-1; (E) *S. cerevisiae* G06; (F) *S. cerevisiae* G10; (G) *S. cerevisiae* JP1. Ácido fórmico 1 g/L (■), 5 g/L (▲) e 10 g/L (●); sem ácido fórmico (♦). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

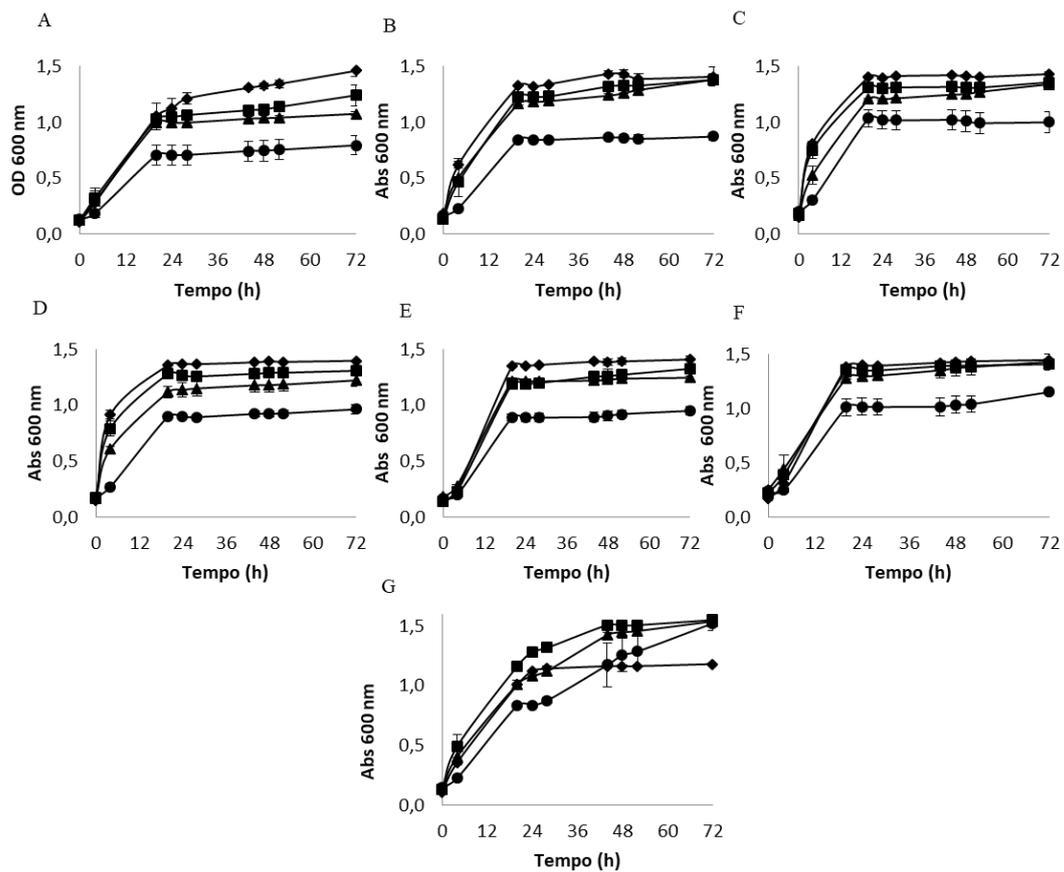


Figura 2. Curva de crescimento (A) *S. cerevisiae* A11; (B) *S. cerevisiae* A12; (C) *S. cerevisiae* B1.1 (D) *S. cerevisiae* CAT-1; (E) *S. cerevisiae* G06; (F) *S. cerevisiae* G10; (G) *S. cerevisiae* JP1. Furfural 0,5 g/L (■), 1 g/L (▲) e 3 g/L (●); sem furfural (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

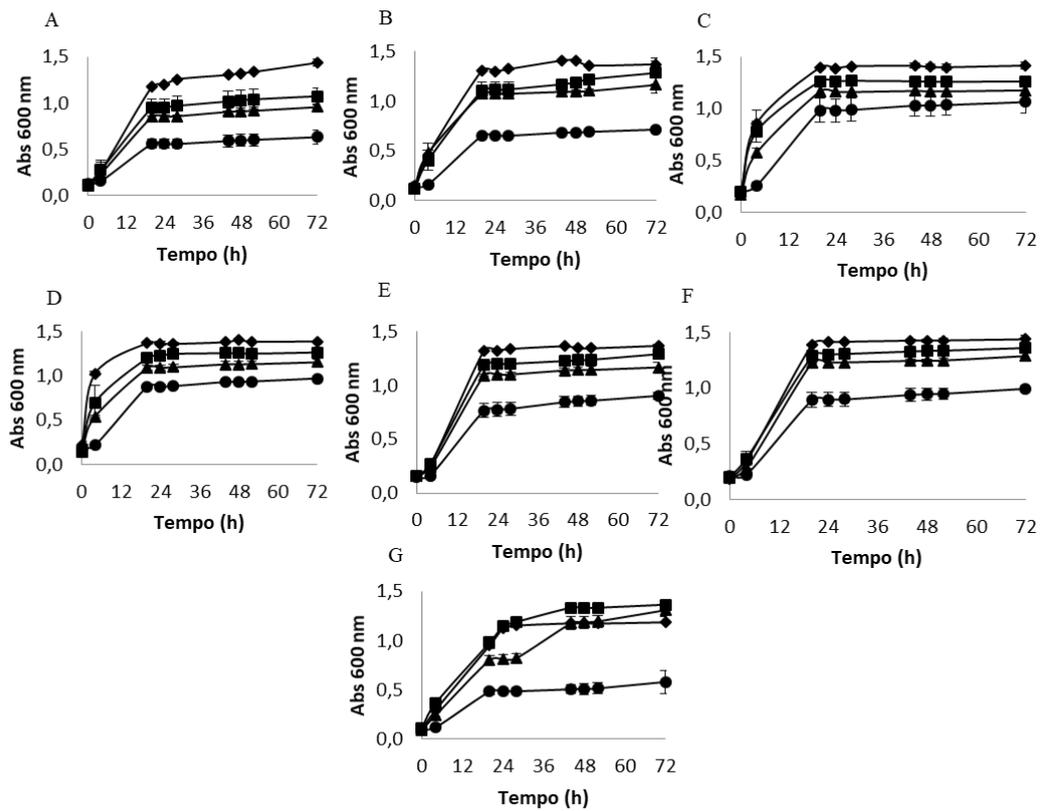


Figura 3. Curva de crescimento (A) *S. cerevisiae* A11; (B) *S. cerevisiae* A12; (C) *S. cerevisiae* B1.1 (D) *S. cerevisiae* CAT-1; (E) *S. cerevisiae* G06; (F) *S. cerevisiae* G10; (G) *S. cerevisiae* JP1. HMF 0,5 g/L (■), 1 g/L (▲) e 3 g/L (●); sem HMF (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

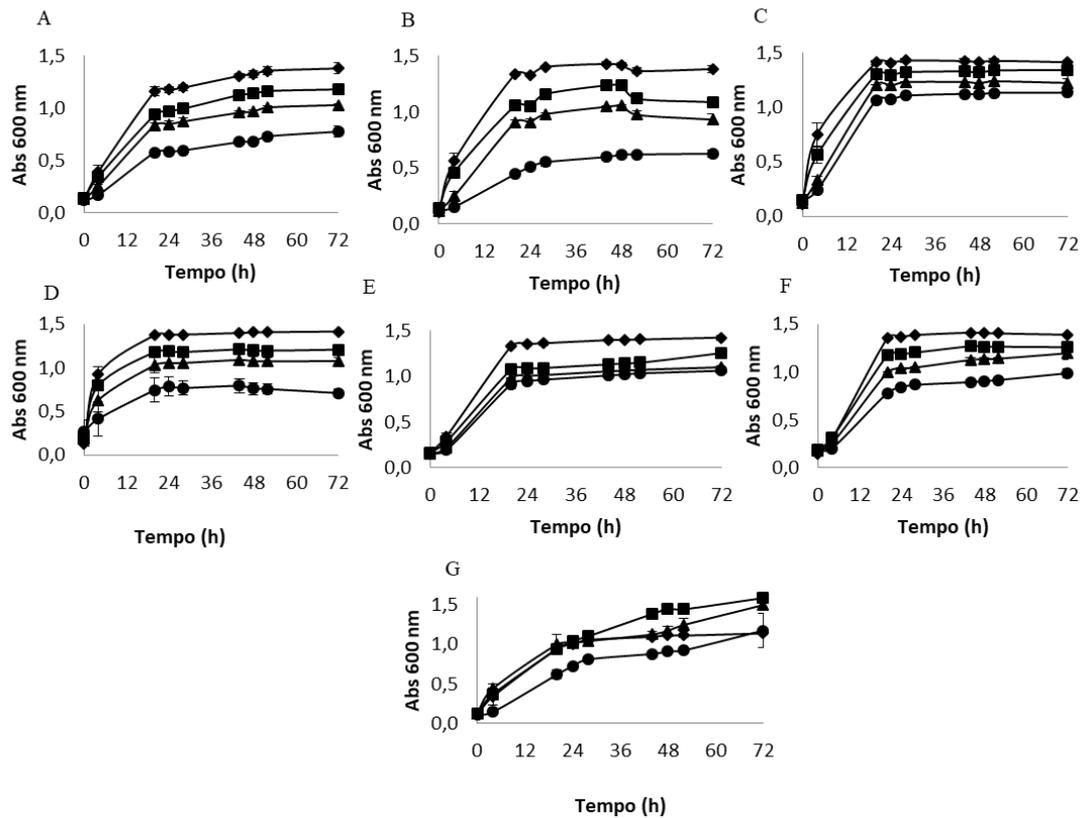


Figura 4. Curva de crescimento (A) *S. cerevisiae* A11; (B) *S. cerevisiae* A12; (C) *S. cerevisiae* B1.1 (D) *S. cerevisiae* CAT-1; (E) *S. cerevisiae* G06; (F) *S. cerevisiae* G10; (G) *S. cerevisiae* JP1. Vanilina 0,5 g/L (■), 0,75 g/L (▲) e 1,5 g/L (●); sem vanilina (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

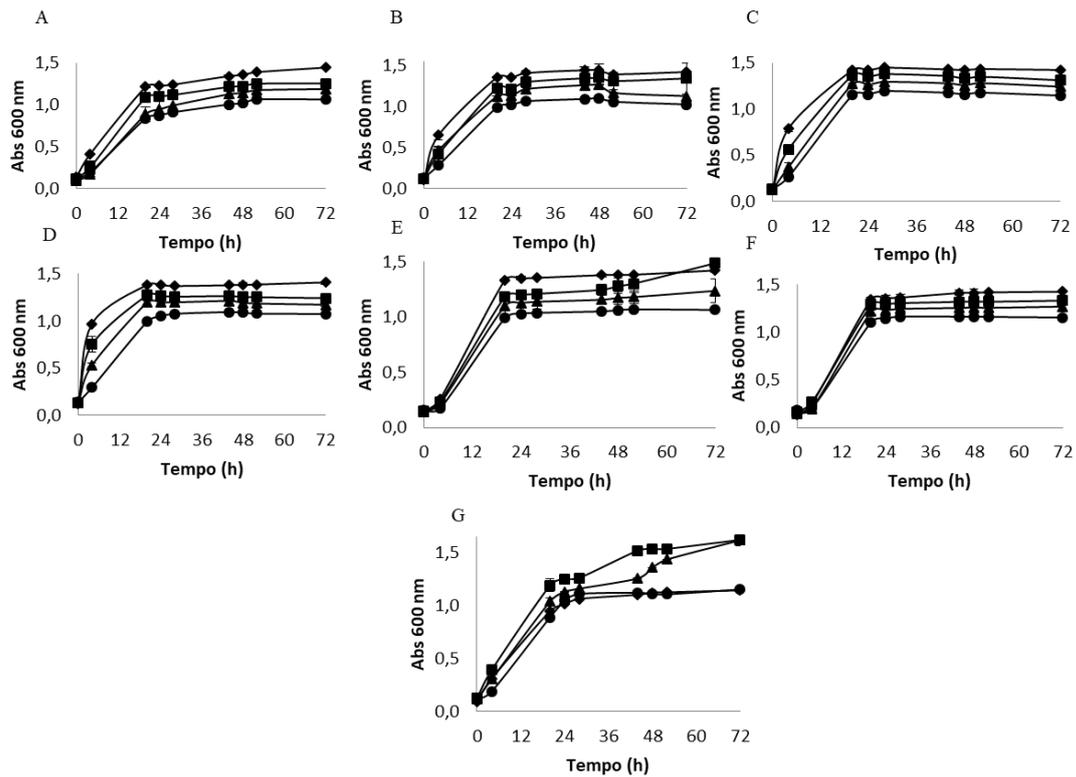


Figura 5. Curva de crescimento (A) *S. cerevisiae* A11; (B) *S. cerevisiae* A12; (C) *S. cerevisiae* B1.1 (D) *S. cerevisiae* CAT-1; (E) *S. cerevisiae* G06; (F) *S. cerevisiae* G10; (G) *S. cerevisiae* JP1. Seringaldeido 0,5 g/L (■), 0,75 g/L (▲) e 1,5 g/L (●); sem Seringaldeido (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

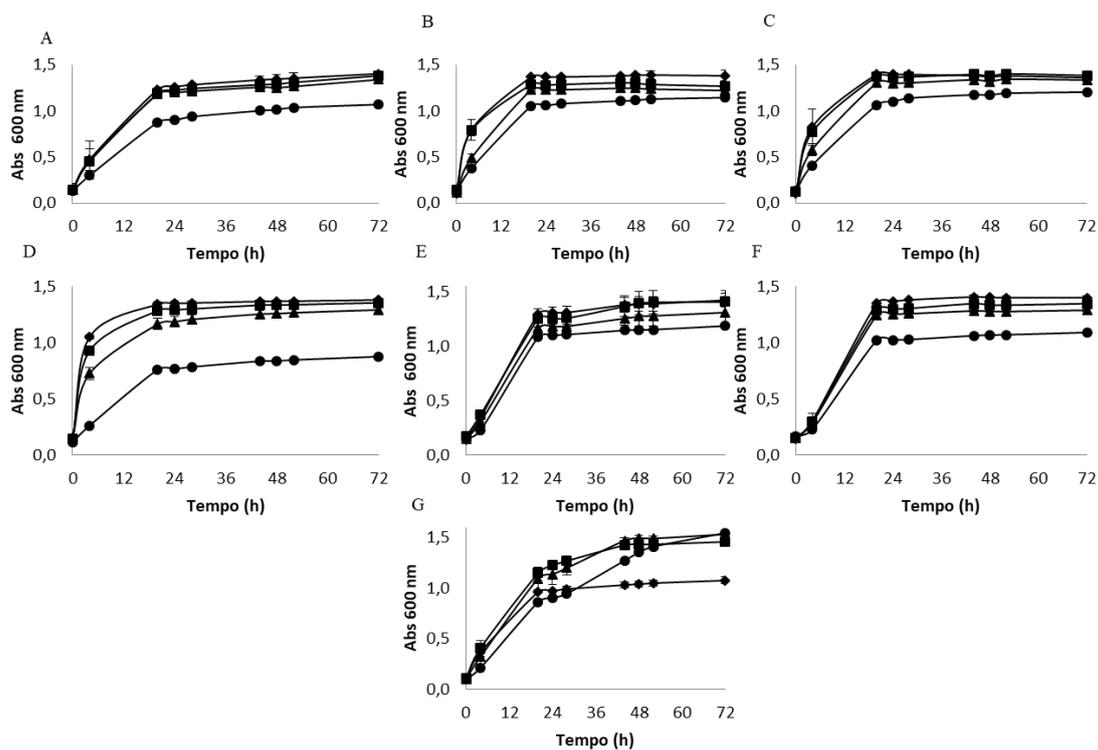


Figura 6. Curva de crescimento (A) *S. cerevisiae* A11; (B) *S. cerevisiae* A12; (C) *S. cerevisiae* B1.1 (D) *S. cerevisiae* CAT-1; (E) *S. cerevisiae* G06; (F) *S. cerevisiae* G10; (G) *S. cerevisiae* JP1. Ácido ferúlico 0,5 g/L (■), 0,75 g/L (▲) e 1,5 g/L (●); sem ácido ferúlico (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

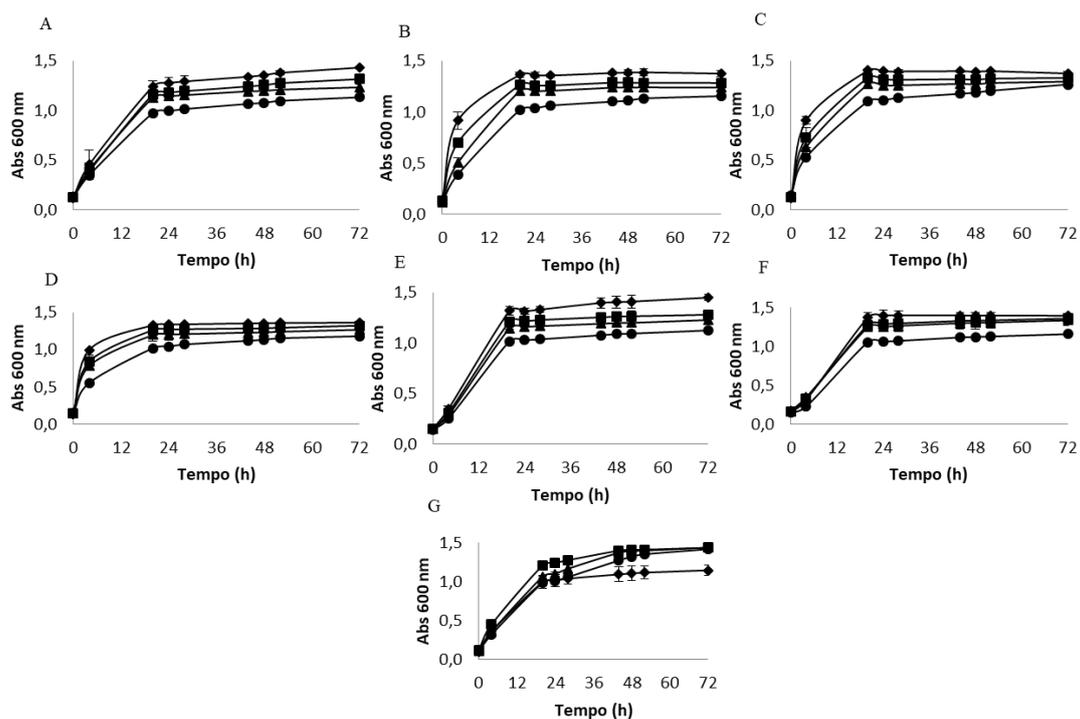


Figura 7. Curva de crescimento (A) *S. cerevisiae* A11; (B) *S. cerevisiae* A12; (C) *S. cerevisiae* B1.1 (D) *S. cerevisiae* CAT-1; (E) *S. cerevisiae* G06; (F) *S. cerevisiae* G10; (G) *S. cerevisiae* JP1. Ácido cumárico 0,5 g/L (■), 0,75 g/L (▲) e 1,5 g/L (●); sem ácido cumárico (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

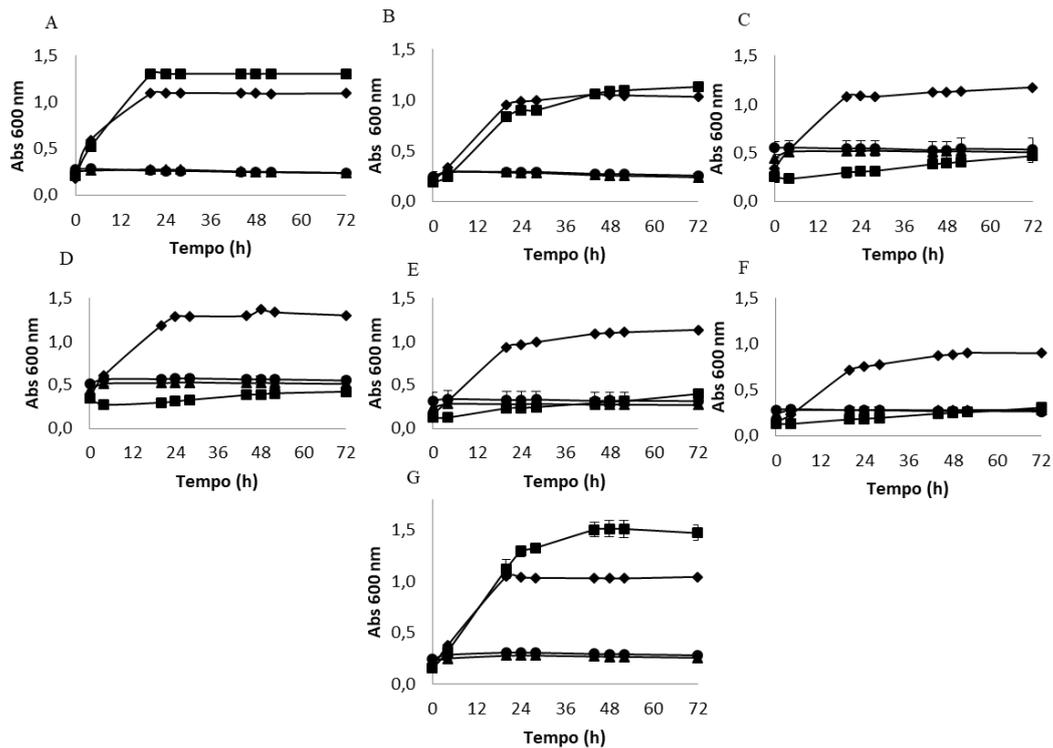


Figura 8. Curva de crescimento (A) *C. tropicalis* JA2; (B) *M. caribbica* JA9; (C) *S. arborariae* (D) *S. passalidarum*; (E) *S. stipitis*; (F) *Spathaspora sp.* JA1; (G) *W. anomalus* 740. Ácido fórmico 1 g/L (■), 5 g/L (▲) e 10 g/L (●); sem ácido fórmico (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

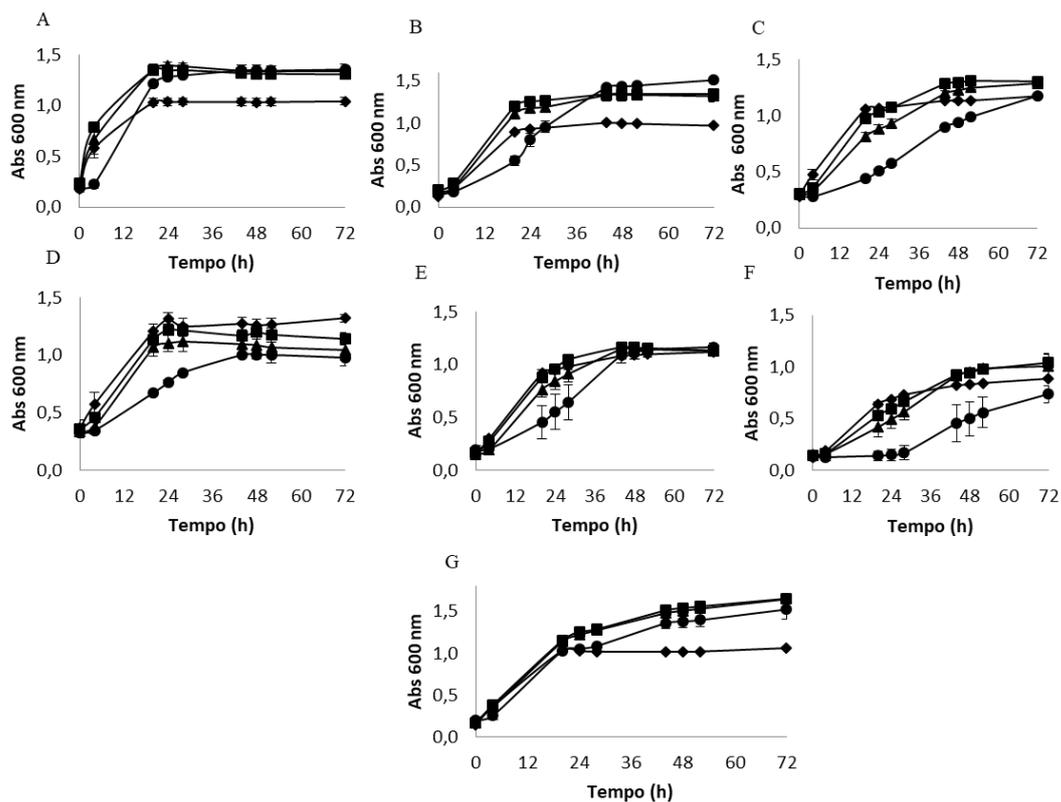


Figura 9. Curva de crescimento (A) *C. tropicalis* JA2; (B) *M. caribbica* JA9; (C) *S. arborariae* (D) *S. passalidarum*; (E) *S. stipitis*; (F) *Spathaspora sp. JA1*; (G) *W. anomalus* 740. Furfural 0,5 g/L (■), 1 g/L (▲) e 3 g/L (●); sem furfural (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

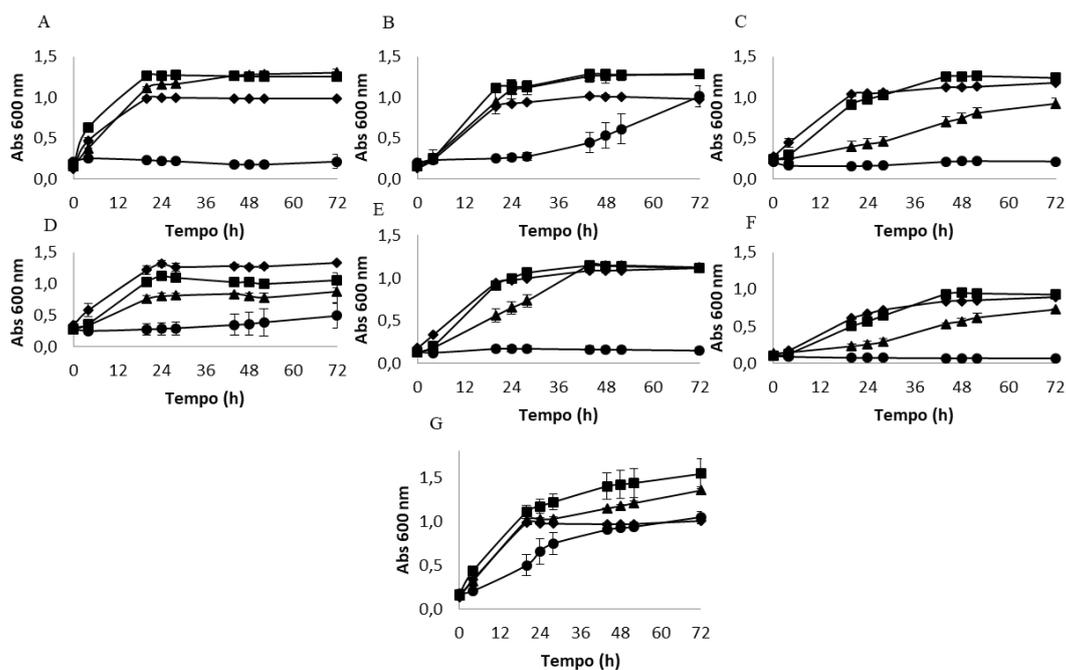


Figura 17. Curva de crescimento (A) *C. tropicalis* JA2; (B) *M. caribbica* JA9; (C) *S. arborariae* (D) *S. passalidarum*; (E) *S. stipitis*; (F) *Spathaspora* sp. JA1; (G) *W. anomalus* 740. HMF 0,5 g/L (■), 1 g/L (▲) e 3 g/L (●); sem HMF (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

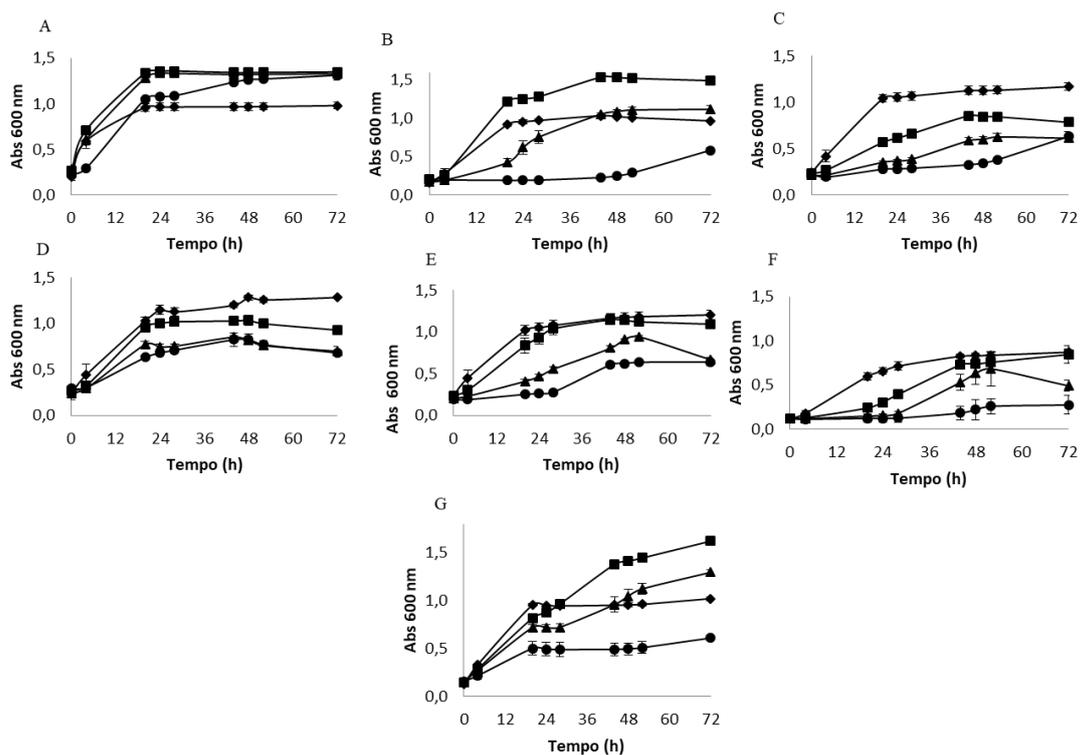


Figura 11. Curva de crescimento (A) *C. tropicalis* JA2; (B) *M. caribbica* JA9; (C) *S. arborariae* (D) *S. passalidarum*; (E) *S. stipitis*; (F) *Spathaspora sp.* JA1; (G) *W. anomalus* 740. Vanilina 0,5 g/L (■), 0,75 g/L (▲) e 1,5 g/L (●); sem vanilina (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

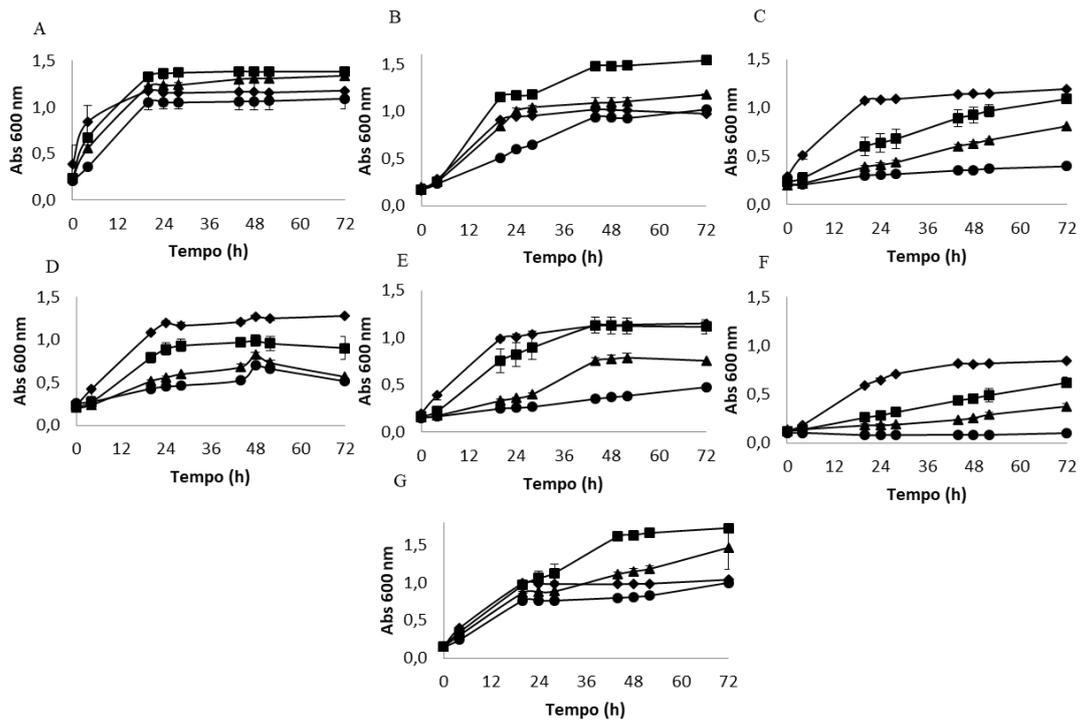


Figura 12. Curva de crescimento (A) *C. tropicalis* JA2; (B) *M. caribbica* JA9; (C) *S. arborariae* (D) *S. passalidarum*; (E) *S. stipitis*; (F) *Spathaspora sp.* JA1; (G) *W. anomalus* 740. Seringaldeido 0,5 g/L (■), 0,75 g/L (▲) e 1,5 g/L (●); sem seringaldeido (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

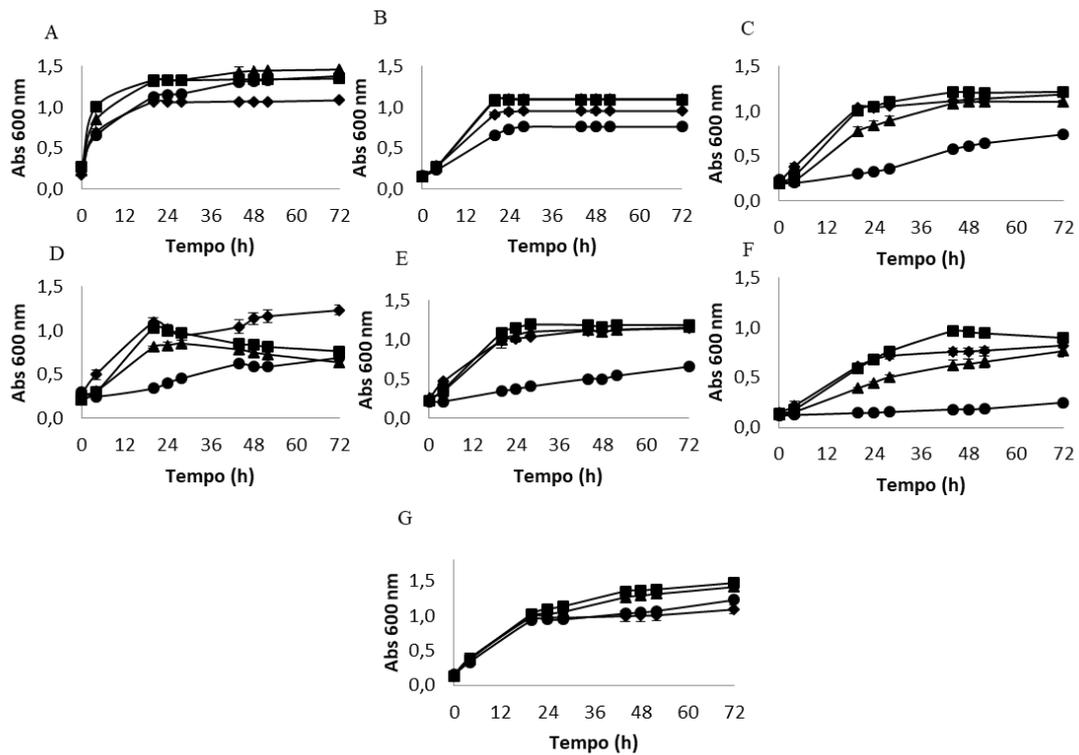


Figura 13. Curva de crescimento (A) *C. tropicalis* JA2; (B) *M. caribbica* JA9; (C) *S. arborariae* (D) *S. passalidarum*; (E) *S. stipitis*; (F) *Spathaspora sp.* JA1; (G) *W. anomalus* 740. Ácido ferúlico 0,5 g/L (■), 0,75 g/L (▲) e 1,5 g/L (●); sem ácido ferúlico (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

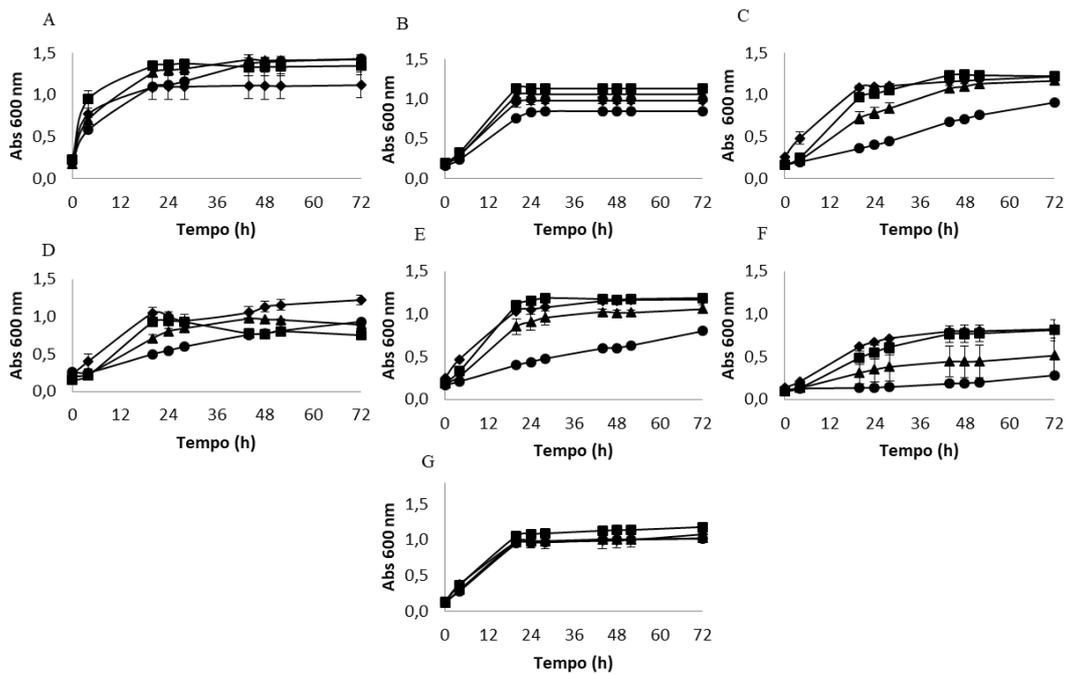


Figura 14. Curva de crescimento (A) *C. tropicalis* JA2; (B) *M. caribbica* JA9; (C) *S. arborariae* (D) *S. passalidarum*; (E) *S. stipitis*; (F) *Spathaspora sp.* JA1; (G) *W. anomalus* 740. Ácido cumárico 0,5 g/L (■), 0,75 g/L (▲) e 1,5 g/L (●); sem ácido cumárico (◆). Os resultados são mostrados como média e desvio padrão de triplicata técnica e duplicata biológica.

Apêndice B: Publicações Elaboradas



FEMS Yeast Research, 19, 2019, foz034

doi: 10.1093/femsyr/foz034

Advance Access Publication Date: 26 April 2019

Research Article

RESEARCH ARTICLE

Physiological and comparative genomic analysis of new isolated yeasts *Spathaspora* sp. JA1 and *Meyerozyma caribbica* JA9 reveal insights into xylitol production

Débora Trichez¹, Andrei S. Steindorff^{1,†}, Carlos E. V. F. Soares^{1,2}, Eduardo F. Formighieri¹ and João R. M. Almeida^{1,2,*}

¹Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, PqEB – W3 Norte Final, Postal code 70.770-901, Brasília-DF, Brazil and ²Graduate Program in Chemical and Biological Technologies, Institute of Chemistry, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Postal code 70.910-900, Brasília-DF, Brazil

*Corresponding author: Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica, PqEB – W3 Norte Final - s/n°, 70.770-901 - Brasília, DF – Brasil. Tel: +55 61 3448-2337; E-mail: joao.almeida@embrapa.br

[†]Present address: U.S. Department of Energy (DOE) Joint Genome Institute, 2800 Mitchell Drive, Walnut Creek, CA 94598, US.

One sentence summary: Physiological and comparative genomic analysis of two novel xylose-assimilating yeast strains isolated from Brazilian Cerrado ecosystem.

Editor: Pascale Daran-Lapujade

ABSTRACT

Xylitol is a five-carbon polyol of economic interest that can be produced by microbial xylose reduction from renewable resources. The current study sought to investigate the potential of two yeast strains, isolated from Brazilian Cerrado biome, in the production of xylitol as well as the genomic characteristics that may impact this process. Xylose conversion capacity by the new isolates *Spathaspora* sp. JA1 and *Meyerozyma caribbica* JA9 was evaluated and compared with control strains on xylose and sugarcane biomass hydrolysate. Among the evaluated strains, *Spathaspora* sp. JA1 was the strongest xylitol producer, reaching product yield and productivity as high as 0.74 g/g and 0.20 g/(L.h) on xylose, and 0.58 g/g and 0.44 g/(L.h) on non-detoxified hydrolysate. Genome sequences of *Spathaspora* sp. JA1 and *M. caribbica* JA9 were obtained and annotated. Comparative genomic analysis revealed that the predicted xylose metabolic pathway is conserved among the xylitol-producing yeasts *Spathaspora* sp. JA1, *M. caribbica* JA9 and *Meyerozyma guilliermondii*, but not in *Spathaspora passalidarum*, an efficient ethanol-producing yeast. Xylitol-producing yeasts showed strictly NADPH-dependent xylose reductase and NAD⁺-dependent xylitol-dehydrogenase activities. This imbalance of cofactors favors the high xylitol yield shown by *Spathaspora* sp. JA1, which is similar to the most efficient xylitol producers described so far.

Keywords: *Spathaspora*; xylitol; xylose fermentation; bagasse hydrolysate; comparative genomics; *Meyerozyma*

Received: 17 August 2018; Accepted: 25 April 2019

© FEMS 2019. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Brazilian Journal of Microbiology

Variable and dose-dependent response of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts toward lignocellulosic hydrolysate inhibitors

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:					
Full Title:	Variable and dose-dependent response of <i>Saccharomyces</i> and non- <i>Saccharomyces</i> yeasts toward lignocellulosic hydrolysate inhibitors				
Article Type:	Research Paper				
Section/Category:	Biotechnology and Industrial Microbiology				
Funding Information:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária</td> <td>MSc Carlos E. V. F. Soares</td> </tr> <tr> <td>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico</td> <td>MSc Carlos E. V. F. Soares</td> </tr> </table>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	MSc Carlos E. V. F. Soares	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	MSc Carlos E. V. F. Soares
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	MSc Carlos E. V. F. Soares				
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	MSc Carlos E. V. F. Soares				
Abstract:	<p>Lignocellulosic hydrolysates will also contain compounds that inhibit microbial metabolism, such as organic acids, furaldehydes and phenolic compounds. Understanding the response of yeasts toward such inhibitors is important to the development of different bioprocesses. In this work, the growth capacity of 7 industrial <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and 7 non-<i>Saccharomyces</i> yeasts was compared in the presence of 3 different concentrations of furaldehydes (furfural and 5-hydroxymetil-furfural), organic acids (acetic and formic acids) and phenolic compounds (vanillin, syringaldehyde, ferulic and coumaric acids). Then, <i>Candida tropicalis</i> JA2, <i>Meyerozyma caribbica</i> JA9, <i>Wickerhamomyces anomalus</i> 740, <i>S. cerevisiae</i> JP1, B1.1 and G06 were selected for fermentation in presence of a cetic acid, HMF and vanillin because they proved to be most tolerant to the tested compounds, while <i>Spathaspora</i> sp. JA1 because its xylose consumption rate. The results obtained showed a dose-dependent response of the yeasts toward the eight different inhibitors. Among the yeasts compared, <i>S. cerevisiae</i> strains presented higher tolerance than non-<i>Saccharomyces</i>, 3 of them with the highest tolerance among all. Regarding the non-<i>Saccharomyces</i> yeasts, <i>C. tropicalis</i> JA2 and <i>W. anomalus</i> 740 appeared as the most tolerant, whereas <i>Spathaspora</i> strains appeared very sensitive to the different compounds.</p>				
Corresponding Author:	João Ricardo Moreira Almeida, PhD Embrapa Agroenergia: Embrapa Agroenergia Brasília, DF BRAZIL				
Corresponding Author Secondary Information:					
Corresponding Author's Institution:	Embrapa Agroenergia: Embrapa Agroenergia				
Corresponding Author's Secondary Institution:					
First Author:	Carlos E. V. F. Soares				
First Author Secondary Information:					
Order of Authors:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>Carlos E. V. F. Soares</td> </tr> <tr> <td>Jessica C. Bergmann</td> </tr> <tr> <td>João Ricardo Moreira Almeida, PhD</td> </tr> </table>	Carlos E. V. F. Soares	Jessica C. Bergmann	João Ricardo Moreira Almeida, PhD	
Carlos E. V. F. Soares					
Jessica C. Bergmann					
João Ricardo Moreira Almeida, PhD					
Order of Authors Secondary Information:					