

FERNANDO AUGUSTO DA SILVEIRA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE E ANÁLISE DO
EXOMETABOLOMA DE *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586s
2014
Silveira, Fernando Augusto da, 19-
Seleção de leveduras fermentadoras de xilose e análise do
exometaboloma de *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1. /
Fernando Augusto da Silveira. – Viçosa, MG, 2014.
xiv, 53f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Wendel Batista da Silveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.40-45.

1. Leveduras. 2. Fermentação. 3. Cândida guilliermondii.
4. *Meyerozyma guilliermondii*. 5. Biocombustível. 6. Xilitol.
7. . I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579

FERNANDO AUGUSTO DA SILVEIRA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE E ANÁLISE
DO EXOMETABOLOMA DE *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de Julho de 2014.

Fábio de Avila Rodrigues

Antônio Galvão do Nascimento

Wendel Batista da Silveira
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais, Fernando e Shirley.

Aos meus irmãos, Angelo e Magno.

Ao meu grande amor, Elis.

Aos meus mestres.

“Se a educação sozinha não pode transformar a sociedade, tampouco sem ela a sociedade muda”. Paulo Freire.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto de muito esforço, dedicação e principalmente colaboração. Por isso não poderia deixar de agradecer a todos que contribuíram com ele.

Agradeço a Deus, pela saúde e presença constante em minha vida.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização da bolsa de estudos.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro e apoio à pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Wendel Silveira, pela dedicação incansável, entusiasmo, bom senso e amizade durante todo o nosso trabalho.

A minha co-orientadora Prof.^a Flávia Passos, pela grande amizade, carinho e orientação, dedicados ao nosso trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Luciano e ao Laboratório de Biotecnologia Molecular (DBB), pela orientação e ajuda com a identificação da levedura.

Ao Prof. Antônio Galvão, pela colaboração nesse trabalho e por aceitar fazer parte da banca.

Ao Prof. Fábio de Avila Rodrigues, pela participação nesse trabalho e por aceitar fazer parte da banca.

Ao Prof. Hilário Mantovani e o Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios, pela ajuda com as análises em HPLC.

Ao Prof. Jorge Luiz Colodette e a pós-doutoranda Carolina Marangon Jardim, Laboratório de Celulose e Papel (DEF), pela ajuda e prestatividade com a caracterização do bagaço de cana-de-açúcar e os testes de inibição.

Ao Prof. Wagner Otoni e o Laboratório de Culturas de Tecidos Vegetais II (BIOAGRO), pela ajuda com os experimentos de metabolômica.

Ao Prof. Carlos Augusto Rosa e a Ana Raquel de Oliveira, Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos (UFMG), pela importante ajuda com a identificação da levedura.

Ao grupo do Núcleo de Análise de Biomoléculas da UFV, principalmente a grande companheira Nívea, por tanta dedicação, carinho e entusiasmo com as análises do exometaboloma da levedura.

A grande família do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, o melhor laboratório que tive chance de trabalhar, pela oportunidade de fazer parte desse grupo tão importante. Agradeço aos colegas de trabalho: Emille, Lívia, Josi, Rose, Maria Fernanda, Amanda, Juliana, Lilian, Aleksandra, Deisy, Juan e Breno, pela amizade, excelente convivência e momentos muito produtivos. E aqueles que ainda fazem parte dessa família: Kamila, Tatiana, Caio e Priscila. Muito obrigado.

A Raquel Cristina, pelo carinho, paciência, amizade e ajuda incondicional dedicada ao nosso trabalho.

Ao técnico de laboratório e amigo Hugo Genier, pela parceria, companheirismo, dedicação e qualidade de serviço incontestável, durante todo esse trabalho.

Aos grandes amigos Robson e Éder, pela oportunidade de trabalhar com dois grandes profissionais, pela seriedade, aprendizagem e também pelos momentos alegres que tivemos a oportunidade de dividir.

A Mariana Alvim, pela parceria frente à Comissão Organizadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, carinho, amizade e bons conselhos, sempre que solicitados.

A todos os colegas discentes, por contribuírem ativamente com o meu trabalho, em especial a Josicelli Crispim, Vinícius Duarte e Renato Menicucci, grandes parceiros e amigos. E ao grande amigo André Xavier pelos conselhos e bom humor de sempre.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Nilcéa, pela competência e carinho durante todo esse tempo.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, José Carlos, Letícia, Sandra, Custódio, e do BIOAGRO, Danilo, Paulo, Evandro, Paulo, por toda ajuda e empenho disponibilizados.

A todos os professores e laboratórios de Departamento de Microbiologia pela parceria e colaboração à pesquisa, além do ensino de excelência.

Aos meus pais, Fernando e Shirley, por sempre me incentivaram a estudar, acreditando que a educação é uma ferramenta formadora de caráter. Pelo amor, confiança e dedicação. Dedico esse trabalho aos dois, amo vocês!

Aos meus irmãos, Angelo e Magno, por me acolherem de braços abertos em Viçosa, com muito carinho e amizade. Pelos exemplos de honestidade e persistência. Amo vocês!

A Elis Marina, o meu grande amor, pela amizade, companheirismo, conselhos e todos os sorrisos que pudemos compartilhar juntos. Obrigado por fazer parte da minha vida. Te amo!

Ao meu padrinho, Pedrinho, por sempre confiar no meu potencial e incentivar os meus projetos de vida. Amo você!

A toda minha família, avós, tios e primos, grandes exemplos de vida, pelo amor incontestável e por acreditarem na minha capacidade.

Aos grandes amigos, Thiago e Matheus, pela amizade duradoura e suporte emocional. Ao Yuri, pela amizade e companheirismo. E a todos os amigos de Ponte Nova, Ouro Preto e Viçosa, pela força.

Muito obrigado a todos vocês!

BIOGRAFIA

FERNANDO AUGUSTO DA SILVEIRA, filho de Fernando Antonio da Silveira e Shirley Margareth Vieira da Silveira, nasceu no dia 22 de Dezembro de 1986, em Ponte Nova, Minas Gerais. Graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto, em Janeiro de 2012. Em Agosto de 2012, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Biorrefinarias	3
2.2. Fontes lignocelulósicas.....	5
2.3. Metabolismo de pentoses em leveduras.....	9
2.4. <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Micro-organismos	15
3.2. Meios de cultura	15
3.3. Manutenção da cultura e preparo de inóculo	15
3.4. Avaliação do potencial fermentativo	16
3.5. Extração de DNA e sequenciamento da região D1/D2 do gene rRNA	16
3.6. Fermentação em batelada	18
3.6.1. Fermentação em Erlenmeyer	18
3.6.2. Fermentação em biorreator	18
3.7. Medida de crescimento.....	18
3.8. Estimativa de parâmetros cinéticos de crescimento.....	19
3.9. Efeito de inibidores sobre o crescimento da levedura	20

3.10.	Análise do perfil metabólico de <i>M. guilliermondii</i> UFV-1 em função da velocidade de crescimento	20
3.11.	Determinação do consumo de substrato e produção de etanol e xilitol	21
3.12.	Determinação dos parâmetros fermentativos	22
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1.	Seleção de leveduras que assimilam xilose	24
4.2.	Avaliação do potencial fermentativo	24
4.3.	Identificação taxonômica da levedura FX-5	26
4.4.	Efeito da concentração de oxigênio sobre a produção de etanol e xilitol pela levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1.....	26
4.5.	Produção de etanol em meio contendo xilose e glicose.....	28
4.6.	Cinética de crescimento de <i>M. guilliermondii</i> UFV-1 em função da concentração de xilose.....	30
4.7.	Efeito da concentração de etanol sobre o crescimento da levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1	30
4.8.	Efeito da concentração de ácido acético sobre o crescimento da levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1	31
4.9.	Efeito da concentração do furfural sobre o crescimento da levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1	33
4.10.	Efeito da concentração do hidroximetilfurfural sobre o crescimento da levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1.....	34
4.11.	Análise do exometaboloma de <i>M. guilliermondii</i> UFV-1.....	35
5.	CONCLUSÕES.....	38
6.	AGRADECIMENTOS.....	39
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

8. ANEXOS.....	46
----------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema demonstrando tipos de biomassas renováveis para biorrefinarias. Fonte adaptada: (NAIK et al., 2010).....	4
Tabela 1. Alguns produtos e tecnologia utilizadas em biorrefinarias. Fonte adaptada: (MENON; RAO, 2012).	5
Figura 2. Representação da parede celular das plantas. Fonte: (SANTOS et al., 2012).	7
Figura 3. Pré-tratamento da cana-de-açúcar e a liberação dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina. Fonte adaptada: (ENERGY, 2007).....	8
Figura 4. Representação esquemática do metabolismo das pentoses D-xilose e L-arabinose em leveduras e bactérias. Duas vias distintas de assimilação de xilose são apresentadas: a via oxidorrredutiva, comum em leveduras, e via isomerase, encontrada em bactérias. Fonte: (CHANDEL et al., 2011).....	10
Figura 5. Crescimento dos isolados fermentadores de xilose em meio YP acrescido de xilose como fonte de carbono e energia sob hipoxia.....	24
Figura 6. Crescimento dos isolados fermentadores de xilose em meio YNB acrescido de xilose como única fonte de carbono e energia sob hipoxia.	25
Tabela 2. Consumo de xilose (g L^{-1}), produção de xilitol (g L^{-1}) e de etanol (g L^{-1}) obtidos por cinco isolados fermentadores de xilose com 120 horas de fermentação. .	26
Tabela 3. Produção de etanol e xilitol, rendimento de etanol ($Y_{P/S \text{ etanol}}$), rendimento de xilitol ($Y_{P/S \text{ xilitol}}$), rendimento celular ($Y_{X/S}$), produtividade volumétrica de etanol ($Q_P \text{ etanol}$), produtividade volumétrica de xilitol ($Q_P \text{ xilitol}$), eficiência de conversão em etanol (Γ_{etanol}) e eficiência de conversão em xilitol (Γ_{xilitol}) obtidas pela levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1 sob diferentes níveis de oxigênio.....	28
Figura 7. Consumo de glicose e xilose, produção de etanol e de xilitol obtidos pela levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1 em meio YP acrescido de xilose com 10% de OD no meio.....	29

Figura 8. Cinética de crescimento da levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1 em função da concentração de xilose destacando a velocidade máxima ($\mu_{\text{máx}}$) e constante de saturação (K_S), em função da concentração de xilose no meio YNB.	30
Figura 9. Efeito do etanol sobre o crescimento da levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1 em meio YPX contendo diferentes concentrações de etanol	31
Figura 10. Efeito do ácido acético sobre o crescimento da levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1 em meio YPX contendo diferentes concentrações de ácido acético.	32
Figura 11. Efeito do furfural sobre o crescimento da levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1 em função das diferentes concentrações do furfural.....	33
Figura 12. Efeito do 5-HMF sobre o crescimento da levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1 em meio YPX contendo diferentes concentrações de 5-HMF.	34
Figura 13. Cromatogramas obtidos a partir da análise do exometaboloma de <i>M. guilliermondii</i> UFV-1 em duas condições fisiológicas: baixa velocidade de crescimento (V1) e velocidade próxima à velocidade máxima de crescimento (V2).....	36
Tabela 4. Metabólitos extracelulares produzidos por <i>M. guilliermondii</i> UFV-1 e seus respectivos tempos de retenção em segundos	37
ANEXO A. Crescimento das linhagens de leveduras pertencentes ao acervo de culturas do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos (UFV-BIOAGRO). As linhagens foram crescidas em meio YPD sólido e YNB sólido contendo xilose como única fonte de carbono e energia.....	46
ANEXO B. Avaliação do potencial fermentativo das linhagens de leveduras que assimilam xilose como única fonte de carbono e energia.	50
ANEXO C. Consumo de xilose, produção de etanol e xilitol, obtidos pela levedura <i>M. guilliermondii</i> UFV-1 em meio YP acrescido de xilose sob condição de hipóxia em biorreatores com 10% (A), 5% (B) e 2% (C) de OD, em condição de aerobiose (D) e condição de hipoxia em Erlenmeyer (E).....	52
ANEXO D. Curva padrão de massa celular seca (mg mL^{-1}) por absorbância ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$) de <i>M. guilliermondii</i> UFV-1, em meio YP (A) e meio YNB (B), ambos acrescidos de xilose.	53

RESUMO

SILVEIRA, Fernando Augusto da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2014. **Seleção de leveduras fermentadoras de xilose e análise do exometaboloma de *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1.** Orientador: Wendel Batista da Silveira. Co-orientadores: Flávia Maria Lopes Passos e Luciano Gomes Fietto.

Existe grande interesse na seleção de leveduras que possam converter xilose, principal pentose liberada do pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas, em metabólitos de interesse industrial, tais como combustíveis, ingredientes de alimentos, drogas antimicrobianas e fármacos. Portanto, cinco leveduras fermentadoras de xilose foram selecionadas a partir da coleção de culturas do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa. Dentre essas, destacou-se a levedura *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1, capaz de consumir totalmente a xilose disponível no meio e convertê-la em etanol e outros metabólitos de interesse industrial. O potencial fermentativo dessa levedura foi avaliado em diferentes concentrações de oxigênio. A produção de etanol foi maior no cultivo em hipoxia cuja concentração de oxigênio dissolvido (OD) no meio de cultivo foi de 10% (1,98 g L⁻¹). A maior produção de xilitol, 5,34 g L⁻¹, foi obtida em hipoxia em Erlenmeyer. Verificou-se o efeito do etanol e dos inibidores ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, formados no pré-tratamento ácido, no crescimento de *M. guilliermondii* UFV-1. A levedura foi capaz de crescer em concentrações de etanol de 13,5 g L⁻¹ que correspondem aos valores máximos que podem ser produzidos a partir da xilose liberada da hemicelulose. Além disso, *M. guilliermondii* UFV-1 cresceu nas concentrações de ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural normalmente encontradas em hidrolisados hemicelulósicos. A análise do exometaboloma de *M. guilliermondii* UFV-1 revelou que não houve diferença no perfil de metabólitos produzidos nas duas condições de crescimento avaliadas: baixa velocidade específica de crescimento e velocidade específica de crescimento próxima da máxima. Foram identificados 5 metabólitos de interesse biotecnológico: os ácidos valérico, capróico e butírico, usados como antifúngicos; o glicofuranosídeo, utilizado pela indústria farmacêutica no controle de diabetes; e o ácido málico, composto utilizado na indústria alimentícia como acidulante e realçador de sabor. Portanto, a identificação desses metabólitos extracelulares demonstra o potencial biotecnológico dessa levedura não apenas para a produção de etanol e xilitol, mas de outros produtos químicos de interesse industrial.

ABSTRACT

SILVEIRA, Fernando Augusto da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Selection of yeasts fermenting xylose and exometabolome analysis of *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1.** Advisor: Wendel Batista da Silveira. Co-advisors: Flávia Maria Lopes Passos and Luciano Gomes Fietto.

There is a great interest in the selection of yeasts able to convert xylose, the main pentose released from the pretreatment of lignocellulosic biomass, into metabolites of industrial interest, such as fuel, food ingredients, drugs and antimicrobial drugs. Therefore, five xylose fermenting yeasts were selected from the culture collection of the Laboratory of Physiology of Microorganisms, Department of Microbiology, Universidade Federal de Viçosa. Among them, *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1 was able to completely consume xylose available in the medium and convert it into ethanol and other metabolites of industrial relevance. Its fermentation potential was evaluated at different oxygen concentrations. Ethanol production was higher in hypoxia where the concentration of dissolved oxygen (DO) in the culture medium was 10% (1.98 g L^{-1}). The higher production of xylitol, 5.34 g L^{-1} , was also obtained in hypoxia. The effect of ethanol and acetic acid, furfural and hydroxymethyl furfural, inhibitors generated during the acid pre-treatment, on the growth of *M. guilliermondii* UFV-1 was evaluated. The yeast was able to grow in ethanol concentration of 13.5 g L^{-1} corresponding to the maximum amount that can be produced from the xylose released from hemicellulose. Furthermore, *M. guilliermondii* UFV-1 grew in concentrations of acetic acid, furfural and hydroxymethyl furfural which are normally found in hemicellulose hydrolysates. Analysis of *M. guilliermondii* UFV-1 exometaboloma revealed no difference in the metabolites profile produced in the two growth conditions evaluated: low specific growth rate and near maximum specific growth rate. Five metabolites of biotechnological interest were identified: valeric, caproic and butyric acids, used as antifungal; glicofuranoside used by the pharmaceutical industry in the control of diabetes; and malic acid, compound used in food industry as acidulant and flavor enhancer. Therefore, the identification of these extracellular metabolites demonstrates the biotechnology potential of this yeast not only to produce ethanol and xylitol, but other chemicals of industrial interest.

1. INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de combustíveis fósseis tem causado problemas ambientais devido à emissão de gases do efeito estufa na atmosfera. Além disso, os combustíveis fósseis são reconhecidos como fontes não renováveis de energia, cujo valor de mercado é fortemente influenciado por crises econômicas e políticas. Uma alternativa ao refino do petróleo é o estabelecimento de biorrefinarias para a conversão de matérias-primas lignocelulósicas abundantes em biocombustíveis e compostos químicos de interesse industrial. O etanol, principal combustível produzido no mundo, é obtido a partir de culturas de cana-de-açúcar, cereais e sementes. O etanol produzido a partir dessas matérias-primas é classificado como etanol de primeira geração, enquanto a produção a partir de biomassa lignocelulósica, tais como subprodutos agroindustriais, resíduos florestais e urbanos, é chamada de etanol de segunda geração.

A biomassa lignocelulósica é composta por polímeros de celulose, hemicelulose e lignina. As biomassas lignocelulósicas devem ser pré-tratadas a fim de diminuir a cristalinidade e disponibilizar os polímeros constituintes: celulose, hemicelulose e lignina. Dentre os pré-tratamentos, a hidrólise ácida é comumente utilizada. A hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar resulta normalmente na disponibilização de 32-44% de celulose, 27-32% de hemicelulose, 20-24% de lignina e 4,5-9% de cinzas (SOUZA et. al., 2012). Contudo, esse pré-tratamento é realizado sob alta temperatura e pressão levando a produção de inibidores a partir da hidrólise de carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica. Os principais inibidores formados são: ácido acético, furfural, formado a partir da hidrólise da xilose, o hidroximetilfurfural, proveniente da hidrólise ácida da glicose. Esses compostos inibem a fermentação por meio da diminuição do pH intracelular, redução da atividade de enzimas essenciais ou diminuição da integridade da membrana da levedura.

A pentose xilose é o principal açúcar disponibilizado na hidrólise da hemicelulose. Todavia, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente empregada na fermentação alcoólica, não assimila esse açúcar. De fato, a conversão de xilose em etanol é considerada do ponto de vista econômico um dos principais entraves para a produção de etanol de segunda geração. Algumas leveduras nativas assimilam o açúcar xilose e apresentam potencial para convertê-lo em etanol e outros produtos de interesse industrial, tais como xilitol e riboflavina (vitamina B₁₂) utilizados na indústria de alimentos, nonadecanol e ácido 9-octadecenoico utilizados pela indústria farmacêutica para a produção de antimicrobianos e drogas anticâncer, respectivamente, e o aromatizante ácido valérico utilizado pela indústria de

cosméticos. O metabolismo de xilose é dividido em duas vias de assimilação: a via oxidorrredutiva, mais comum entre as leveduras, e a via isomerase encontrada em bactérias. Em *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, levedura nativa fermentadora de xilose, este açúcar é transportado para dentro da célula por dois sistemas de transporte: baixa afinidade e alta afinidade. As primeiras etapas da via oxidorrredutiva utilizam enzimas que consomem os cofatores $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$, NADPH e NAD^+ , o que acaba provocando um desequilíbrio redox dentro da célula em função do nível de oxigênio dissolvido no meio. Quando ocorre tal desequilíbrio, a produção de xilitol é maior do que a de etanol.

Tendo em vista que a conversão de xilose em metabólitos de interesse industrial é de grande importância e que a tradicional levedura da fermentação alcoólica, *S. cerevisiae*, não assimila tal açúcar, este trabalho teve como principais objetivos a seleção de leveduras fermentadoras de xilose e a análise do exometaboloma da levedura *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biorrefinarias

O aumento do consumo de combustíveis fósseis e outros produtos químicos, obtidos a partir do refino do petróleo, tem causado problemas ambientais devido à emissão de gases do efeito estufa na atmosfera. Além disso, as reservas de combustíveis fósseis são esgotáveis e vêm sendo exauridas nos últimos anos (DEMIRBAS et al., 2009). Os combustíveis fósseis representam 88% do consumo de energia primária, sendo o petróleo (35%), o carvão (29%) e o gás natural (24%), as principais fontes utilizadas (BRENNAN; OWENDE, 2010). Uma alternativa promissora para garantir a produção de combustíveis e insumos químicos de forma sustentável é o estabelecimento de biorrefinarias (TAYLOR, 2008; DEMIRBAS, 2009; MENON; RAO, 2012).

As biorrefinarias devem ser capazes de converter de forma integrada as biomassas lignocelulósicas em energia, combustíveis e produtos químicos, tais como biogás, bioetanol, eletricidade, calor, alimentos e rações (SKOOG et al., 1988; TAYLOR, 2008; DEMIRBAS, 2009; MENON; RAO, 2012; KAJASTE, 2014), além de produtos farmacêuticos e cosméticos, da indústria de alimentos e bebidas, como enzimas industriais, antibióticos, ácidos aromáticos, biopolímeros, vitaminas e flavorizantes (TAYLOR, 2008; MENON; RAO, 2012; KAJASTE, 2014).

O etanol é um combustível alternativo a gasolina. A emissão de dióxido de carbono na atmosfera proveniente da combustão do etanol é 80% menor comparada àquela obtida com os combustíveis originados de fontes fósseis (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). O processo de produção do etanol pode ocorrer de duas formas: o processo de primeira geração, que utiliza carboidratos constituintes da cana-de-açúcar, culturas de cereais e sementes (SIMS, MABEE, *et al.*, 2009) e o processo de segunda geração, que utiliza matéria-prima proveniente de subprodutos agroindustriais, tais como resíduos florestais, restos de alimentos, galhos e folhas (BALAT; BALAT, 2009; SIMS et al., 2010).

Apesar de ser um processo bem estabelecido, a produção do etanol de primeira geração é duramente criticada porque compete com a produção de alimentos por recursos hídricos e uso de terra arável (NAIK et al., 2010; SIMS et al., 2010). Por outro lado, o etanol de segunda geração, produzido a partir de biomassas lignocelulósicas, não compete com a indústria de alimentos por recursos hídricos e terras cultiváveis. A figura 1 destaca algumas fontes de biomassas lignocelulósicas que podem ser utilizadas como matéria-prima em biorrefinarias.

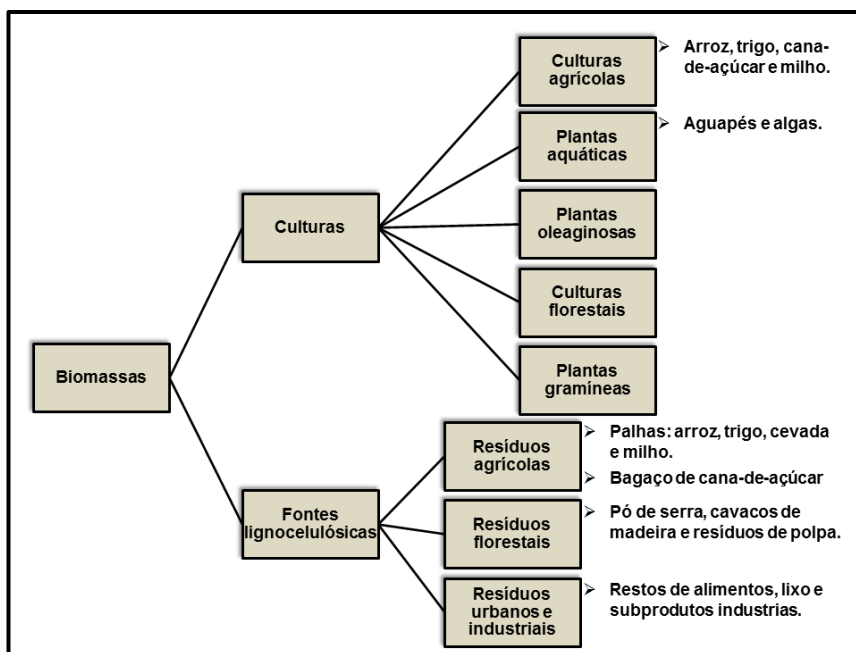


Figura 1. Esquema demonstrando tipos de biomassas renováveis para biorrefinarias. Fonte adaptada: (NAIK et al., 2010).

Nos últimos anos, vários trabalhos vêm buscando ampliar a gama de produtos que podem ser produzidos em biorrefinarias, principalmente por fermentação microbiana, tais como: isopropenóides, utilizados na indústria de cosméticos como fragrâncias, na indústria farmacêutica na produção de drogas anticâncer e antibióticos, e na indústria de alimentos como ingredientes de alimentos e vitaminas; policetídeos, usados na indústria farmacêutica para a produção de drogas anticâncer, antibióticos e imunossuppressores; e ainda lipídeos, utilizados na indústria de alimentos como suplementos alimentares e na indústria de energia para a produção de biodiesel (CHEN et al., 2013).

Além desses produtos, muitos compostos da indústria de química fina, como o ácido cítrico, ácido glutâmico e lisina, são produzidos em processos fermentativos a partir de biomassas lignocelulósicas. O glicerol, produzido em biorrefinarias, pode ser convertido em propileno glicol, um composto de alto valor econômico utilizado na produção de resinas (MENON; RAO, 2012). Além disso, vários subprodutos e solventes químicos para indústria de alimentos e de cosméticos podem ser produzidos em biorrefinarias, tais como: os ácidos aromáticos, os ciclohexanos utilizados como solventes, o ácido valínico, um agente flavorizante da indústria de cosméticos, e o 2,3-pentanodiona, composto aromático utilizado na produção de bebidas (MENON; RAO, 2012).

Os produtos produzidos em biorrefinarias variam de acordo com a fonte de matéria-prima disponível e o tipo de tecnologia utilizada na produção (HAHN-

HÄGERDAL et al., 1994). A tabela 1 demonstra alguns produtos químicos, biocombustíveis e tecnologias empregadas em biorrefinarias.

Tabela 1. Alguns produtos e tecnologias utilizadas em biorrefinarias. Fonte adaptada: (MENON; RAO, 2012).

TECNOLOGIAS EMPREGADAS				
		Processo de fermentação	Refinaria de Madeira	Múltiplas tecnologias
PRODUTOS PRODUZIDOS		Metano (Biogás)	Metanol	Metano (Biogás)
		Etanol	Etanol	Metanol
		Ácido acético	Ácido acético	Etanol
		Glicerol	Ácido láctico	Propano
		1,3-propanodiol	Acetona	Glicerol
		Ácido fumárico	Ácido succínico	Propano-1,2-diol
		Ácido succínico	Butanol	Butano
		1-butanol	Furfural	1,3-Butadieno
		1,4-butanodiol	Ácido levulínico	iso-Butanol
		Ácido aspártico	Ácido itacônico	Etilenoglicol
		Furfural	Benzeno	Benzeno
		Ácido levulínico	Tolueno	Dimetilfurano
		Ácido cítrico	Xileno	Tolueno
		Lisina	Xilitol	Proteínas
		Glutamina		Aminoácidos
		5-hidroxiacetilfurfural		
		Vitaminas		
		Biopolímeros		
	Enzimas industriais			
	Antibióticos			

2.2. Fontes lignocelulósicas

O uso de biomassas lignocelulósicas como matéria-prima para a produção de produtos químicos de interesse industrial se destaca como uma importante alternativa sustentável para substituir o refino do petróleo. A biomassa lignocelulósica é o composto orgânico mais abundante na biosfera, atingindo quantidades de aproximadamente 50% de toda biomassa formada (ZYI et al., 1991). Estima-se que essa biomassa lignocelulósica produzida anualmente alcance entre 10-50 bilhões de toneladas (CHENG et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2013). Esses compostos são produzidos principalmente por meio de atividades agrícolas, processamentos florestais, produção de alimentos e geração de resíduos orgânicos (BELLIDO et al., 2011).

Essa biomassa lignocelulósica é formada por polímeros de celulose, hemicelulose e lignina, que compõe a parede celular das plantas (PALMQVIST;

HAHN-HÄGERDAL, 2000b). A celulose são cadeias cristalinas longas de monômeros de glicose, com fortes ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (BANERJEE et al., 1981). A lignina é um polímero aromático complexo de unidades de *p*-hidroxifenilpropanóide unidos por ligações entre carbonos, muito resistentes à hidrólise enzimática e química(VASCONCELOS et al., 2013). Ao contrário da celulose, a hemicelulose é um polímero ramificado, composto por heteropolímeros de D-xilose, L-arabinose, D-manose, D-glicose, D-galactose e D-ácido glucurônico, formando ligações ramificadas e lineares (BANERJEE et al., 1981). A figura 2 mostra a parede celular das plantas, constituída de celulose, lignina e hemicelulose, que compõe a biomassa lignocelulósica.

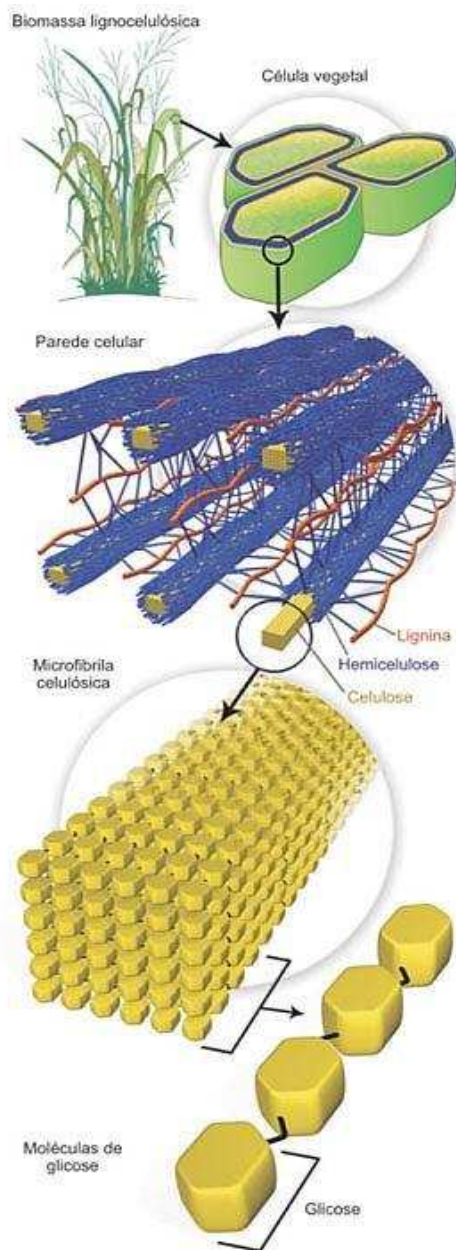


Figura 2. Representação da parede celular das plantas. Fonte: (SANTOS et al., 2012).

Devido às propriedades inerentes das biomassas lignocelulósicas, diversos tipos de pré-tratamentos são usados a fim de diminuir a cristalinidade e disponibilizar os polímeros de celulose, hemicelulose e lignina dessas biomassas. Os pré-tratamentos podem ser divididos em físicos, químicos e biológicos (TAHERZADEH et al., 2000). Normalmente, os tratamentos físicos são empregados na primeira etapa do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, tais como: moagem, trituração e explosão a vapor. Posteriormente, podem ser utilizados os tratamentos químicos (ácidos ou alcalinos) e biológicos (enzimas) nessa biomassa (BELLIDO et al., 2011). A figura 3

demonstra o processo de pré-tratamento da cana-de-açúcar e a remoção da estrutura dessa biomassa.

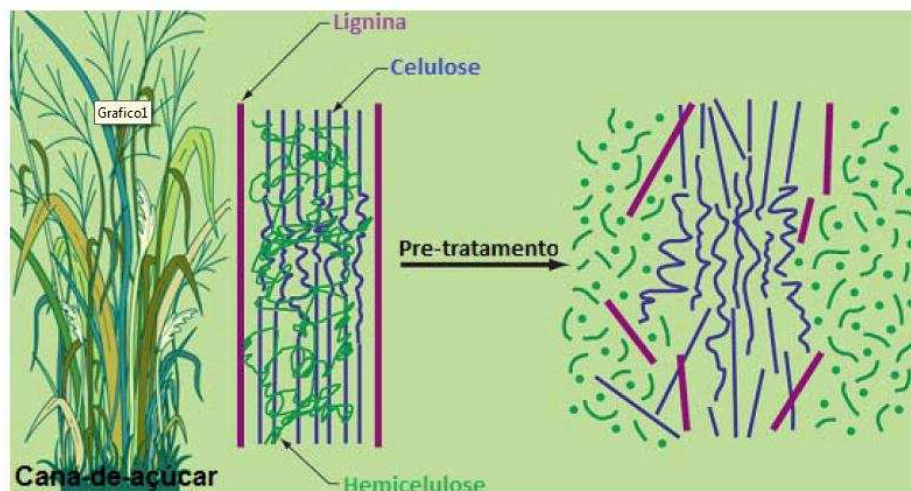


Figura 3. Pré-tratamento da cana-de-açúcar e a liberação dos polímeros de celulose, hemicelulose e lignina. Fonte adaptada: (ENERGY, 2007).

Os melhores pré-tratamentos e as condições empregadas dependem do tipo e da composição da biomassa lignocelulósica utilizada. A hidrólise ácida é comumente utilizada no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar (HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009; CARDOSO et al., 2011). Esse subproduto da produção de açúcar e etanol de primeira geração possui em torno de 32-44% de celulose, 27-32% de hemicelulose, 20-24% de lignina e 4,5-9% de cinzas (SOUZA et al., 2012). A hidrólise ácida é eficiente para a remoção de hemicelulose, aproximadamente 100%, todavia produz diferentes tipos de inibidores de fermentação (CARDOSO et al., 2011).

Em condições ácidas e de altas temperaturas, os inibidores são formados a partir da degradação dos carboidratos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos e na degradação e solubilização da lignina (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a, 2000b). Esses inibidores diminuem a atividade biológica e enzimática das leveduras. O perfil e a concentração de inibidores formados no pré-tratamento depende da biomassa e das condições utilizadas no processo. O ácido acético, o 2-furaldeído (furfural), o hidroximetilfurfural ou 5-hidroximetil-2-furfural (5-HMF) e os compostos fenólicos são alguns dos principais produtos formados na hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a, 2000b).

O ácido acético, o ácido fórmico e ácido levulínico são formados em condições de hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). O ácido acético em sua forma não dissociada difunde através da membrana citoplasmática e dissocia-se no citoplasma das células, diminuindo o pH para valores

inferiores aos limites fisiológicos (ZYI et al., 1991; BELLIDO et al., 2011). Os compostos fenólicos formados a partir da degradação e solubilização da lignina podem causar a perda da integridade da membrana das células, a inativação dos sistemas enzimáticos e a destruição ou inativação do material genético (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

Os compostos orgânicos furanos, furfural e 5-HMF, são formados a partir da degradação dos carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica durante a hidrólise ácida (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a, 2000b). O furfural é formado por meio da degradação do açúcar xilose, sob alta temperatura e pressão, proveniente da hemicelulose das biomassas lignocelulósicas (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). O furfural pode atuar inibindo os processos de transcrição e tradução da célula, além de reduzir a atividade da sua cadeia respiratória (BANERJEE et al., 1981; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a; HORVÁTH et al., 2003). O 5-HMF é um subproduto da hidrólise ácida proveniente da degradação de hexoses, como a glicose, manose e galactose, a partir da hemicelulose e da celulose das biomassas lignocelulósicas (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). O 5-HMF atua no metabolismo das células causando um efeito inibitório em enzimas essenciais (SANCHEZ, 1988).

Sendo assim, a formação desses subprodutos inibidores depende do tipo de biomassa lignocelulósica utilizada nos processos de pré-tratamento com hidrólise ácida. Por exemplo, a hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar, sob alta temperatura e pressão, pode produzir aproximadamente de 3-4 g L⁻¹ de ácido acético (CHENG et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2013), 0,5-1 g L⁻¹ de furfural (VASCONCELOS et al., 2013) e 0,05-0,25 g L⁻¹ de 5-HMF (NEUREITER et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2013). Essas concentrações podem variar em função do tempo e da pressão, e nas concentrações de ácido utilizadas nos processos de pré-tratamento com hidrólise ácida.

Portanto, é importante identificar os potenciais inibidores presentes nas mais diversas biomassas lignocelulósicas, a fim de propor processos de destoxificação desses hidrolisados (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a). Outra forma de possibilitar a utilização desses hidrolisados celulósicos e hemicelulósicos, é selecionar leveduras que sejam resistentes às concentrações de inibidores neles presentes.

2.3. Metabolismo de pentoses em leveduras

Matérias-primas lignocelulósicas apresentam um conteúdo de 5-20% de açúcares pentoses: xilose e arabinose (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). A

xilose é a principal pentose disponibilizada na hidrólise da hemicelulose, um dos três maiores componentes da biomassa lignocelulósica (SANCHEZ, 1988). Essa pentose não é assimilada pela levedura *S. cerevisiae*, comumente utilizada na produção de etanol (NEUREITER et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2013). Nesse contexto, a conversão de xilose em etanol é considerada do ponto de vista econômico um dos principais entraves para a produção de etanol de segunda geração. Sendo assim, o isolamento e a seleção de leveduras nativas que assimilam o açúcar xilose e apresentam potencial para convertê-lo em etanol e a outros produtos de interesse industrial é de grande relevância. Nos últimos anos, vários trabalhos têm focado no isolamento dessas leveduras tendo em vista a produção de etanol (CHENG et al., 2008; CADETE et al., 2009, 2012, 2013; FERREIRA et al., 2011; LONG et al., 2012; SUH et al., 2013; MATOS et al., 2014), bem como a de outros metabólitos de interesse industrial tais como xilitol, utilizado na indústria de alimentos (BARBOSA et al., 1988; RAFIQU; MIMI SAKINAH, 2012; PAPON et al., 2013), 1-nonadecanol e ácido 9-octadecenoico, ambos utilizados na indústria farmacêutica para a produção de drogas antibacterianas e anticâncer, respectivamente (JOEL; BHIMBA, 2013).

A figura 4 mostra as vias de assimilação das pentoses, D-xilose e L-arabinose, encontradas em fungos e bactérias (CHANDEL, CHANDRASEKHAR, *et al.*, 2011). Nessa representação esquemática estão representadas duas vias de assimilação de xilose: a via oxidorrredutiva e a via isomerase.

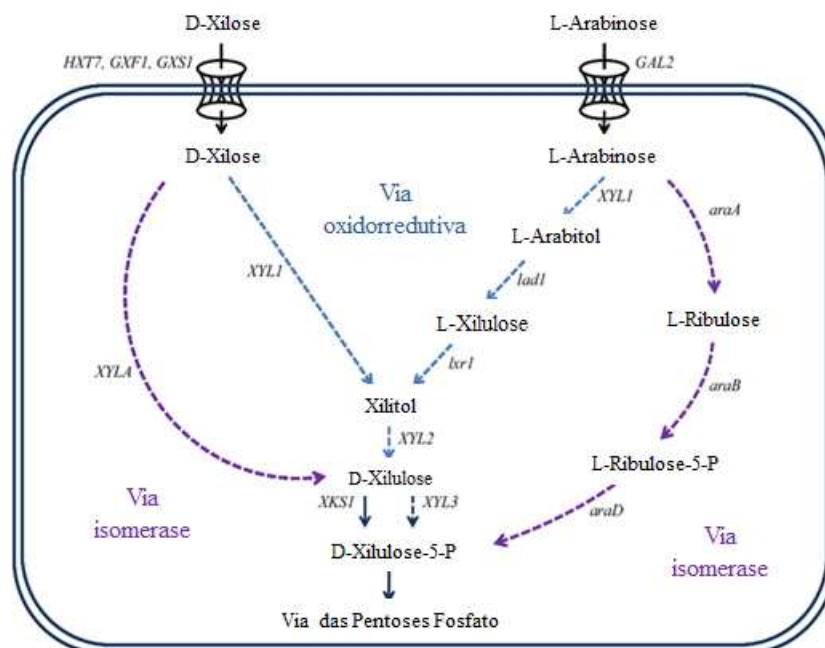


Figura 4. Representação esquemática do metabolismo das pentoses D-xilose e L-arabinose em leveduras e bactérias. Duas vias distintas de assimilação de xilose são apresentadas: a via

oxidorrédutiva, comum em leveduras, e via isomerase, encontrada em bactérias. Fonte:(CHANDEL et al., 2011).

A primeira etapa do metabolismo de xilose é o seu transporte para o citoplasma da célula. Estudos realizados com as leveduras nativas que assimilam e fermentam xilose, *S. stipitis*, *Pichia heedii* e *Candida shehatae*, determinaram que existe dois sistemas de transporte para a xilose: um sistema de difusão facilitada de alta capacidade e baixa afinidade, que é compartilhado por glicose, e um sistema de simporte de prótons de alta afinidade (KILIAN; UDEN, 1988; HAMACHER et al., 2002; CHU; LEE, 2007; YOUNG et al., 2010). Depois que a xilose é transportada pelos sistemas de transporte, ela pode ser metabolizada pelas vias de assimilação. A levedura nativa *S. stipitis* CBS 7126 possui um valor de K_m de 2,26 mM para o sistema de transporte de baixa afinidade, e um K_m de 0,9 mM para o sistema de alta afinidade (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994).

A via oxidorrédutiva das pentoses é mais conservada entre as leveduras, utilizando enzimas e cofatores específicos para o conjunto de reações que compõe essa via. Nessa via, a D-xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose redutase (XR) dependente de $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ ou NADPH . Posteriormente, o xilitol é oxidado a D-xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH) dependente de NAD^+ . Nas reações posteriores dessa via, o intermediário D-xilulose é fosforilado na posição do carbono cinco (C5-OH) pela enzima xilulocinase (XK), formando outro intermediário, a D-xilulose-5-fosfato. Esse intermediário segue o fluxo da via das pentoses fosfato, na qual serão formados os intermediários da via glicolítica, gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fostato (SKOOG et al., 1988; CHU; LEE, 2007; CHANDEL et al., 2011).

Na via oxidorrédutiva, as duas primeiras enzimas do metabolismo consomem $\text{NADH}^+ + \text{H}^+/\text{NADPH}$ e NAD^+ , provocando um desequilíbrio redox (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; CHU; LEE, 2007; YOUNG et al., 2010). Em leveduras fermentadoras de xilose, a disponibilidade de oxigênio determina a mudança do fluxo de carbono da xilose para a produção de biomassa para a célula, pela via oxidativa, ou a produção de etanol, pela via fermentativa (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; PREEZ, 1994; CHU; LEE, 2007; WOHLBACH et al., 2011). Na ausência de oxigênio, ou seja, em anaerobiose, o cofator $\text{NADH} + \text{H}^+$ não pode ser reoxidado eficientemente a NAD^+ por meio da cadeia transportadora de elétrons, provocando um desequilíbrio dos cofatores NADH/NAD^+ . Esse desequilíbrio pode ser observado pelo acúmulo e excreção do xilitol por essas leveduras (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; PREEZ, 1994). Em condições de limitação de oxigênio, a produção de etanol diminui o desequilíbrio desses cofatores, pois a reoxidação do $\text{NADH} + \text{H}^+$ na via fermentativa disponibiliza NAD^+ que é requerido pela enzima XR na conversão de xilitol em xilulose. Assim, o

acúmulo de xilitol diminui (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; PREEZ, 1994; CHU; LEE, 2007; WOHLBACH et al., 2011). Em aerobiose, o oxigênio funciona como aceptor final de elétrons da cadeia transportadora de elétrons dessas leveduras, então o fluxo de carbono da xilose é direcionado para produção de energia e conversão em biomassa celular, e esses cofatores NADH/NAD⁺ não apresentam um desequilíbrio.

Dessa forma, em leveduras fermentadoras de xilose a produção de xilitol aumenta em condição de anaerobiose, a produção de massa celular aumenta em aerobiose e a produção de etanol aumenta em condições de limitação de oxigênio.

Outra forma de assimilação de açúcares pentoses é a via isomerase. Essa via consiste de uma única reação de conversão da D-xilose, por meio da enzima xilose isomerase (XI), ao intermediário da via, D-xilulose. Ao contrário da via oxidorrredutiva das pentoses, a via isomerase não requer os cofatores NADH⁺ + H⁺/NADPH e NAD⁺ para enzima XI, o que representa uma vantagem adaptativa importante para a produção de etanol a partir de pentoses (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; CHU; LEE, 2007; YOUNG et al., 2010). Porém, essa via é raramente encontrada em leveduras nativas, sendo mais comum entre bactérias (SKOOG et al., 1988; CHU; LEE, 2007; YOUNG et al., 2010).

2.4. *Meyerozyma guilliermondii*

Meyerozyma guilliermondii é uma levedura pertencente ao clado *Saccharomycotina* CTG, o qual é geneticamente heterogêneo. Também conhecida como *Candida guilliermondii* (grupo anamorfo) e *Pichia guilliermondii* (grupo telomorfo). A partir de estudos da coenzima Q-9, essa levedura foi atribuída ao gênero *Meyerozyma* sp. (KURTZMAN; SUZUKI, 2010; ROMI et al., 2014). O nome do gênero é uma homenagem ao Prof. Sally A. Meyer, Georgia State University, Atlanta, EUA, pioneiro em estudos filogenéticos de espécies de leveduras do gênero *Candida* (KURTZMAN; FELL, 1997; KURTZMAN; SUZUKI, 2010).

Espécies do gênero *Meyerozyma* sp. têm sido isoladas de diversos ambientes, como o solo, alimentos, insetos, água do mar e subprodutos de árvores. Mas, algumas espécies fazem parte da microbiota da pele e mucosas, podendo causar doenças em pacientes imunosuprimidos (PAPON et al., 2013). Algumas características importantes podem ser atribuídas a esse gênero: temperatura padrão de crescimento é de 30°C (máxima de 42°C); aeróbia, mas pode crescer em condições estritas de oxigênio; possui a capacidade de fermentar açúcares; não utiliza o amido, a lactose e o inositol como fontes de carbono; são leveduras heterotáticas e possui divisão celular multilateral por brotamento; algumas espécies formam pseudohifas; possui um

genoma de aproximadamente 10.6 Mb, com oito cromossomos (sequenciamento da linhagem *C. guilliermondii* ATCC 6260); apresenta um conteúdo de GC no DNA de 45-50%; (KURTZMAN; SUZUKI, 2010; PAPON et al., 2013).

Diversos estudos são conduzidos com o gênero *Meyerozyma* sp. por apresentar importância clínica, aplicações biotecnológicas e potencial de aplicação em controle biológico (CODA et al., 2013; JOEL; BHIMBA, 2013; PAPON et al., 2013; ROMI et al., 2014). Além disso, linhagens de *M. guilliermondii* podem ser utilizadas para a produção de etanol a partir de hidrolisados de biomassas lignocelulósicas (SCHIRMER-MICHEL et al., 2008; MATOS et al., 2014). A linhagem *C. (Meyerozyma) guilliermondii* NRRL Y-2075 produziu etanol a partir de hidrolisado de casca de soja destoxificado, que é uma fonte de xilose, alcançando um rendimento de produção de 0,46 g g⁻¹ de etanol após 48 horas (SCHIRMER-MICHEL et al., 2008). Isso demonstra a capacidade de utilização dessa levedura para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

O xilitol é um açúcar de cinco carbonos formado a partir da redução de xilose, pela enzima xilose redutase, dependente de NADH⁺ + H⁺ ou NADPH (YOUNG et al., 2010). O xilitol é encontrado naturalmente em fibras de vegetais e frutas e apresenta um importante valor biotecnológico: usado como adoçante por ser tão doce quanto à sacarose e 40% menos calórico, e anticariogênico, sendo utilizado em fórmulas de pastas de dente (RAFIQUL; MIMI SAKINAH, 2012; PAPON et al., 2013). Entre as leveduras, a *M. (Candida) guilliermondii* é a maior produtora de xilitol a partir de xilose, obtendo uma eficiência de conversão de 77-80% (RAFIQUL; MIMI SAKINAH, 2012; PAPON et al., 2013), sendo que outra linhagem de *M. guilliermondii* (*C. guilliermondii* FIT-20037) apresentou um rendimento de xilitol de 81% em relação ao teórico (BARBOSA et al., 1988).

A levedura *M. guilliermondii*, é uma grande produtora de riboflavina, ou vitamina B₁₂, um importante produto relacionado à nutrição, o qual é utilizado na indústria de alimentos, corantes e no tratamento de diversas doenças (PAPON et al., 2013). A capacidade de superprodução de vitamina B₁₂ está relacionada ao crescimento dessa levedura sob limitação de ferro (PAPON et al., 2013). *M. guilliermondii* também é capaz de produzir enzimas industrialmente importantes: a inulinase, enzima que converte a inulina em xarope de frutose, que pode ser convertido em bioetanol; α-raminase, enzima usada na indústria de vinhos (PAPON et al., 2013). Sendo assim, a *M. guilliermondii* apresenta aplicação biotecnológica na produção de enzimas de interesse da indústria de alimentos e energia.

M. guilliermondii VB7 apresenta potencial para a produção de compostos antibacterianos e antifúngicos. Extratos obtidos dessa levedura foram eficazes no controle do crescimento de bactérias, inibindo as linhagens *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25.922 e *Proteus vulgaris* ATCC 29.905 (JOEL; BHIMBA, 2013). A levedura *M. guilliermondii* LCF1353 apresentou atividade inibitória do crescimento em fungos dos gêneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Rhizopus* sp., demonstrando seu potencial para atuar no controle biológico. Essa linhagem apresentou produção da enzima lítica extracelular β -1,3-glucanase, envolvida com atividade de inibição por meio da degradação da parede celular de fungos (CODA et al., 2013; PAPON et al., 2013). Sendo assim, *M. guilliermondii* tem potencial para ser utilizada no controle biológico de fungos que contaminam alimentos, diminuindo as perdas econômicas do setor agroindustrial.

Extratos obtidos a partir de culturas com *M. guilliermondii* VB7 apresentaram citotoxicidade contra as células cancerosas Hep2 e MCF-7, indicando seu potencial para a produção de drogas anticâncer (JOEL; BHIMBA, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Micro-organismos

Foram utilizadas as leveduras pertencentes ao acervo de culturas do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, do departamento de Microbiologia (DMB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Essas leveduras foram isoladas a partir de madeira em decomposição do solo, e do intestino de besouros, das famílias Passalidae e Ciidae.

3.2. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram o meio YPX [extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v) e xilose 2% (p/v)] e o meio mínimo *Yeast Nitrogen Base* (YNB) 0,67% (p/v), acrescidos de xilose 2% (p/v). Na determinação dos parâmetros cinéticos velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e constante de saturação (K_s) foi utilizado o meio YNB acrescido de diferentes concentrações de xilose. O meio de cultura YPX foi suplementado com diferentes concentrações de etanol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, para avaliar o efeito destes inibidores sobre o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1. O meio de cultura YPD ágar [extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v), glicose 2% (p/v) e ágar 2% (p/v)] foi utilizado para ativar as culturas pertencentes ao acervo de cultura do laboratório de Fisiologia de Micro-organismos do DMB da UFV. O meio de cultura YP [extrato de levedura 1% (p/v), peptona 2% (p/v)] acrescido de xilose 1% (p/v) e glicose 1% (p/v), denominado YPXG, foi utilizado para avaliar a capacidade da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 co-assimilar estes dois açúcares.

3.3. Manutenção da cultura e preparo de inóculo

As leveduras pertencentes ao acervo do laboratório de Fisiologia de Micro-organismos mantidas a -80°C foram ativadas em meio YPX ágar [peptona 2% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v), xilose 2% (p/v) e ágar 2% (p/v)]. Essas leveduras foram mantidas em placas de Petri contendo meio YPX ágar a 4°C e em meio de cultura YP [extrato de levedura 1% (p/v) e peptona 2% (p/v)] contendo glicerol 100% (v/v) a -80°C.

Para ativar as leveduras, uma alíquota de 1 mL da cultura estocada a -80°C foi transferida para 50 mL de meio YPX em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Esses frascos foram incubados em incubador rotatório NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC 25D, a temperatura de 30°C a 150 rpm de rotação durante aproximadamente 20 horas. Após

a incubação, essas culturas foram centrifugadas a 9.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. O *pellet* das culturas obtido após a centrifugação foi lavado duas vezes com água peptonada 0,1% (p/v). Após a lavagem das células as células de leveduras foram inoculadas nos meios de cultura descritos no item 3.2.

3.4. Avaliação do potencial fermentativo

Após a inoculação das leveduras no meio YNB ágar acrescido de xilose, as placas foram incubadas a 30°C em Câmara Incubadora B.O.D. mod. 347 (NEW BRUNSWICK), durante o período de 72 horas. O potencial perfil fermentativo das leveduras que cresceram nesse meio foi avaliado pelo teste da fermentação do açúcar xilose. As linhagens foram cultivadas em meio líquido YNB contendo xilose como única fonte de carbono e energia. O resultado positivo foi avaliado pela presença de bolhas no interior de pequenos tubos invertidos (Tubo de Durham). Foram preparados 50 tubos de ensaios com 15 mL meio de cultura YNB acrescido de xilose 2% (p/v). Os tubos de Durham estéreis foram colocados dentro dos tubos de ensaio com meio de cultura YNB, posicionados com as aberturas voltadas para baixo, o que permite o aprisionamento do gás, caso ele seja produzido. As leveduras inoculadas nesse meio foram cultivadas a 30° C sem agitação durante o período de 72 horas.

3.5. Extração de DNA e sequenciamento da região D1/D2 do gene rRNA

A linhagem selecionada em função do seu potencial fermentativo foi cultivada em 5 mL de meio YPX em frascos Erlenmeyer de 50 mL. A extração de DNA foi realizada em culturas puras. A linhagem foi incubada a 30°C sob agitação de 200 rpm durante 24 horas. Após a incubação, 1,5 mL da cultura foi transferido para tubos de microcentrífuga e centrifugado a 12.000 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente. O *pellet* celular obtido foi lavado em água peptonada 0,01% (p/v) duas vezes. Posteriormente, o *pellet* formado foi ressuscitado em 400 µL de tampão de extração [2 mL de Triton 100x (v/v), 10mL de SDS 10% (v/v), 10 mL de NaCl 1M, 10 mL de Tris 1M pH 8,0 e EDTA 0,5M pH 8,0 (v/v)], 200 µL de fenol-clorofórmio (1:1) e 0,3 g de pérolas de vidro. Após a agitação, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos, sendo que a fase superior formada foi coletada e transferida para outro tubo de microcentrífuga. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio. Após a agitação e centrifugação realizadas conforme descrito anteriormente, a fase superior coletada foi precipitada à temperatura ambiente em uma solução de acetato de potássio 5M (p/v) e etanol gelado. Após a centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos, o *pellet* formado foi lavado com 1mL de etanol gelado 75%

(v/v) e em seguida mantido à temperatura ambiente para ocorrer a secagem. A amostra foi ressuspensa em 20 µL de água deionizada estéril e, posteriormente, foi adicionada a enzima RNase, concentração final de 50 µg mL⁻¹. Depois de incubado a 37°C por 30 minutos, a amostra foi armazenada a -20°C e sua integridade foi avaliada em gel de agarose 0,8% (p/v). O DNA obtido foi quantificado em *NanoDrop 2000 C Spectrophotometer* (Thermon Scientific).

As amostras de DNA obtidas na extração foram utilizadas na reação de cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene do rRNA da região D1/D2 da subunidade maior, como descrito por LACHANCE et al. (2003). Para a reação de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). A reação foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR 10X, 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL de dNTP 2,5 mM, 1 µL do primer NL1 10 mol (Invitrogen, USA), 1 µL do primer NL4 10 mol (Invitrogen, USA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1,25 U e 1 µL de DNA. A reação foi conduzida em um termociclador PCR Express (Valpo.protect, Eppendorf) e nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos; anelamento a 54°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos; seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os amplicons foram separados em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TBE 0,5% (v/v) a 80 V. As amostras de DNA foram coradas pela adição de GelRed e visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas utilizando um sistema de foto-documentação (VilberLourmat, França).

Os amplicons gerados pela reação de PCR a partir da amostra de DNA foram purificados utilizando-se uma solução de EDTA. Ao produto de PCR com volume de 45 µL, foram adicionados 11,25 µL de EDTA 125 mM e 135 µL de etanol absoluto. Esta mistura foi submetida à centrifugação a 13.000 rpm durante 25 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 120 µL de etanol 70% (v/v) e homogeneizado por inversão. Após centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos o sobrenadante foi descartado novamente e a amostra foi seca a 37°C durante 20 minutos. O DNA então foi ressuspensa em 10 µL de água deionizada e o produto obtido foi quantificado em *NanoDrop ND 1000* (NanoDrop Technologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

As reações de sequenciamento da amostra de DNA foram realizadas utilizando o *Kit Big Dye* versão 3.1 (Applied Biosystems) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730. As sequências foram analisadas utilizando o programa BLASTn (Basic Locus Alignment Search Tool) disponível no portal NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) e comparadas com aquelas depositadas no banco de dados GenBank.

3.6. Fermentação em batelada

3.6.1. Fermentação em Erlenmeyer

As fermentações foram realizadas em hipoxia e aerobiose. Em hipoxia, os experimentos foram conduzidos em 50 mL de meio YP e em 50 mL de meio YNB acrescidos de xilose 2% (p/v) em frascos Erlenmeyer de 125 mL. A condição de hipoxia foi estabelecida por meio do borbulhamento de nitrogênio gasoso nos meios de cultivo por 15 minutos antes da inoculação das leveduras. Os frascos de Erlenmeyer foram mantidos vedados com tampões de borracha para evitar a permeabilidade ao oxigênio. As culturas foram cultivadas a temperatura de 30°C sob agitação de 150 rpm. Alíquotas de 2 mL foram retiradas a cada 24 horas, centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes das culturas foram filtrados em membranas de filtro de 0,22 µm e armazenados a -20°C. Posteriormente, foram determinados o consumo do substrato e a produção de metabólitos.

Em aerobiose, foram realizados experimentos em 500 mL meio YPX em frascos Erlenmeyer de 2 L, à temperatura de 30°C sob agitação de 150 rpm. Alíquotas de 2 mL foram retiradas a cada 24 horas, centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram filtrados em membranas de filtro de 0,22 µm e armazenados a -20°C. Posteriormente, foram determinados o consumo do substrato e a produção de metabólitos.

3.6.2. Fermentação em biorreator

Os experimentos de fermentação foram conduzidos em fermentador BioFlo®115 NEW BRUNSWICK, em dorna de 0,9 L, equipado com sensor de oxigênio dissolvido (OD) InPro® 6800 sensor METTLER TOLEDO. A levedura foi cultivada em 500 mL de meio YPX sob hipoxia, sendo que a temperatura e agitação foram controlados. As concentrações de oxigênio dissolvido (OD) analisadas foram: 2%, 5% e 10%. Além disso, a levedura foi cultivada em 500 mL de meio YPXG, sob temperatura de 30°C, agitação controlada e concentração de OD no meio de 10%.

3.7. Medida de crescimento

O crescimento da levedura (*M. guilliermondii* UFV-1) foi estimado pela absorbância em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) no comprimento de

onda de 600 nm. O valor da $DO_{600\text{ nm}}$ foi convertido em massa seca celular de acordo com a curva de calibração (massa seca x densidade óptica).

Para estimar a relação de peso seco x densidade óptica, a levedura ativada foi transferida para 10 mL de meios YPX e YNB em frascos Erlenmeyer de 50 mL. Tais frascos foram incubados a 30°C por 18 horas sob agitação de 150 rpm. Em seguida, as leveduras foram centrifugadas a 9.000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o *pellet* obtido foi ressuscitado em 6 mL de água destilada estéril. Foram retiradas quatro alíquotas de 1 mL para a determinação de massa celular seca, a 105°C, durante 24 horas. Além disso, amostras de 1 mL da suspensão de células foi utilizada nas seguintes diluições: 10^{-2} , 2×10^{-2} , 3×10^{-2} , 4×10^{-2} , 5×10^{-2} e 6×10^{-2} . A regressão linear entre a absorbância (DO_{600}) e a massa celular seca obtida (mg mL^{-1}), permitiu a determinação da massa celular seca para os meios de cultivo YPX e YNB (ANEXO D). Uma unidade de DO_{600} em meio YPX mostrou ser equivalente a $0,053 \text{ mg mL}^{-1}$ de massa celular seca da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 (ANEXO D), conforme determinado na equação 1.

$$\text{massa seca} = \frac{DO_{600} - 0,0227}{0,3015} \quad \text{Equação (1)}$$

Para o meio YNB, uma unidade de DO_{600} mostrou ser equivalente a $0,017 \text{ mg mL}^{-1}$ de massa celular seca da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 (ANEXO D), conforme determinado na equação 2.

$$\text{massa seca} = \frac{DO_{600} - 0,0954}{0,2809} \quad \text{Equação (2)}$$

3.8. Estimativa de parâmetros cinéticos de crescimento

As velocidades específicas de crescimento (μ) da levedura selecionada (*M. guilliermondii* UFV-1) foram estimadas por meio da regressão linear entre os valores das densidades ópticas obtidos e o tempo (em horas). Essa levedura foi crescida em 50 mL de meio YNB acrescido de diferentes concentrações de xilose (variando de 2 a 50 g L^{-1}) em frascos Erlenmeyer de 125 mL que foram incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em intervalos de 1 hora até 7 horas de cultivo e sua $DO_{600\text{ nm}}$ foi determinada em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600). A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e a constante de saturação (K_S) foram estimadas de acordo com o modelo cinético de Monod (1949) determinado na equação 3,

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S} \quad \text{Equação (3)}$$

na qual o μ corresponde à velocidade específica de crescimento; $\mu_{\text{máx}}$, à velocidade específica máxima de crescimento; S , à concentração de xilose e K_S à constante de saturação. Foi utilizado o software Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., Califórnia, USA).

3.9. Efeito de inibidores sobre o crescimento da levedura

O crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 na presença de etanol foi avaliado em meio YPX acrescido de diferentes concentrações de etanol (variando de 8 a 96 g L⁻¹) sob hipoxia. A cinética de crescimento foi avaliada em função das diferentes concentrações de etanol, destacadas anteriormente. Dessa forma, foi possível avaliar as diferentes velocidades específicas de crescimento da linhagem em função das concentrações de etanol.

Além do etanol foram avaliados o efeito inibidor dos compostos ácido acético, furfural e 5-HMF sobre o crescimento da levedura em meio YPX em condição de hipoxia. Os inibidores foram acrescidos isoladamente ao meio de cultura em concentrações variando de 0,5 a 10 g L⁻¹.

Os resultados de inibição foram representados como a razão de inibição do crescimento: (velocidade específica de crescimento no meio contendo o inibidor/ velocidade específica de crescimento na ausência do inibidor) x 100.

3.10. Análise do perfil metabólico de *M. guilliermondii* UFV-1 em função da velocidade de crescimento

Após a estimativa dos parâmetros cinéticos da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 foram realizados experimentos em cultura contínua no intuito de avaliar a influência da velocidade de crescimento sobre o perfil de produção de metabólitos. Esses experimentos foram realizados em biorreatores jaquetados Wheaton[®] de 250 mL contendo 190 mL de meio YNB acrescido de xilose 2% (p/v). Esse sistema foi ligado por conexões a dois recipientes: sendo um de entrada contendo o meio YNB acrescido de 2% de xilose, e outro de saída da cultura (descarte). As culturas foram homogeneizadas e agitadas por agitação magnética a 30°C. Foram utilizados dois fluxos de alimentação 15,3 mL h⁻¹ e 28,6 mL h⁻¹, correspondentes às velocidades específicas de crescimento de 0,08 h⁻¹ e 0,15 h⁻¹.

As culturas foram mantidas durante 10 gerações para se estabelecer o regime permanente. Então, as amostras foram coletadas para análises posteriores de metabólitos extracelulares.

Após o estabelecimento do regime permanente da cultura, duas amostras de 25 mL foram retiradas para cada velocidade de crescimento avaliada. Essas amostras foram centrifugadas a 9.000 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi armazenado a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em membranas de filtro de 0,22 µm, e 3 amostras de 1 mL (réplicas técnicas) de cada velocidade de crescimento avaliada foram transferidas para tubos de microcentrifuga de 1,5mL. Posteriormente, foram adicionados 60µL do padrão interno, solução de ribitol 0,2 mg mL⁻¹. As amostras foram agitadas em vortex por 10 segundos e divididas em 3 amostras de 1 mL (réplicas técnicas) que foram em seguida liofilizadas e armazenadas a -80°C.

A análise do perfil de metabólitos extracelulares foi realizada no Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBioMol) da UFV. As amostras obtidas na etapa de extração foram derivatizadas e analisadas. As amostras armazenadas à -80°C foram evaporadas à vácuo em Concentrador plus mod.5305 (Eppendorf) sem aquecimento por 30 minutos. Depois foram adicionados 40 µL da solução de metoxiaminação (20 mg mL⁻¹ e 1 mL de piridina) em cada amostra. Posteriormente, as amostras foram agitadas em um agitador de microtubos *Thermomixer comfort* (Eppendorf), sob agitação de 950 rpm durante 2 horas a 4°C. Depois, foram adicionados 70 µL em cada amostra de uma solução de *N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacet* (MSTFA) acrescida de 20 µL mL⁻¹ da solução de índices padrões de tempos de retenção (*FAMES*). As amostras foram agitadas em um agitador de microtubos *Thermomixer comfort* (Eppendorf), sob agitação de 950 rpm a 4°C durante 30 minutos. Posteriormente, foram transferidas para os vials para análise no sistema de cromatografia a gás (GC) no *Gas chromatograph* 7890A (Agilent Technologies), com coluna capilar DB-35MS, 30 m x 0.32 mm x 0.25 µm (Agilent Technologies), acoplado ao espectrômetro de massas (MS) TruTOF®HT TOFMS (LECO Instruments). Para o processamento cromatográfico e deconvolução espectral de massas foi utilizado o software *ChromaTOF* versão 4.50.8.0. (LECO Instruments).

3.11. Determinação do consumo de substrato e produção de etanol e xilitol

As concentrações de etanol, xilose e xilitol foram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), no cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 Dual acoplado a um detector de índice de refração e coluna de troca iônica Phenomenex Rezex ROA (300 x 7.8 mm) a temperatura de 60° C, usando ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvel, em um fluxo constante de 0,7 mL min⁻¹.

3.12. Determinação dos parâmetros fermentativos

O rendimento de etanol ($Y_{P/S \text{ etanol}}$, g g^{-1}) foi calculado por meio da equação 4,

$$Y_{P/S \text{ etanol}} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Equação (4)}$$

na qual P_f = concentração final de etanol, P_0 = concentração inicial de etanol, S_0 = concentração inicial de xilose e S_f = concentração final de xilose, em (g L^{-1}). O rendimento de xilitol ($Y_{P/S \text{ xilitol}}$, g g^{-1}) foi calculado por meio da equação 5,

$$Y_{P/S \text{ xilitol}} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Equação (5)}$$

na qual P_f = concentração final de xilitol, P_0 = concentração inicial de xilitol, S_0 = concentração inicial de xilose e S_f = concentração final de xilose, em (g L^{-1}). Os rendimentos de etanol e xilitol a partir de xilose foram calculados considerando os seus rendimentos teóricos: rendimento teórico de etanol, $0,51 \text{ g g}^{-1}$ ($\text{C}_5 \rightarrow 1.67 \text{ C}_2 + 1.67 \text{ C}_2$); rendimento teórico do xilitol, $0,91 \text{ g g}^{-1}$ ($\text{C}_5 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{C}_5 + \text{NAD}^+$). O rendimento da biomassa celular ($Y_{X/S}$, g g^{-1}) foi calculado por meio da equação 6,

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Equação (6)}$$

na qual X_f = concentração final de células, X_0 = concentração inicial de células, S_0 = concentração inicial de xilose e S_f = concentração final de xilose, em (g L^{-1}). A produtividade volumétrica de etanol, calculada pela equação 7,

$$Q_{p \text{ etanol}} = \frac{g \text{ L}^{-1}}{h} \quad \text{Equação (7)}$$

foi obtida entre o valor máximo de produção de etanol nas amostras (g L^{-1}) e os respectivos tempos de fermentação (h). A produtividade volumétrica de xilitol, calculada pela equação 8,

$$Q_{p \text{ xilitol}} = \frac{g \text{ L}^{-1}}{h} \quad \text{Equação (8)}$$

foi obtida entre o valor máximo de produção de xilitol nas amostras (g L^{-1}) e os respectivos tempos de fermentação (h). A eficiência de conversão de etanol foi calculada pela equação 9,

$$\eta_{\text{etanol}} = \frac{Y_P^{\text{etanol}}}{Y_P^{\text{etanol te6rico}}} \times 100\% \quad \text{Equa\c7\~ao (9)}$$

e a efici\~encia de convers\~ao de xilitol foi calculada a partir da equa\c7\~ao 10.

$$\eta_{\text{xilitol}} = \frac{Y_P^{\text{xilitol}}}{Y_P^{\text{xilitol te6rico}}} \times 100\% \quad \text{Equa\c7\~ao (10)}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de leveduras que assimilam xilose

Um total de 43 linhagens de leveduras cresceu em meio contendo xilose como fonte de carbono, indicando o potencial dessas linhagens para serem utilizadas no aproveitamento do hidrolisado hemicelulósico, o qual é uma fonte de xilose (ANEXO A).

4.2. Avaliação do potencial fermentativo

O potencial fermentativo das 43 leveduras que assimilaram xilose foi avaliado em meio YNB acrescido deste açúcar. Dessas leveduras, 5 linhagens fermentaram o açúcar xilose (ANEXO B). Essas 5 linhagens de leveduras selecionadas, BEX INT-P1 15D, BEX INT-P1 20D, BEX INT-P1 21D, BEX INT-P1 22D e BEX INT-P4 28C, foram denominadas FX-1, FX-2, FX-3, FX-4 e FX-5, respectivamente.

As 5 linhagens fermentadoras de xilose tiveram o seu potencial fermentativo avaliado por meio da determinação da produção de etanol e xilitol e consumo de xilose. Tais linhagens foram cultivadas em meio YNB e meio YP, ambos acrescidos de xilose, sob hipoxia.

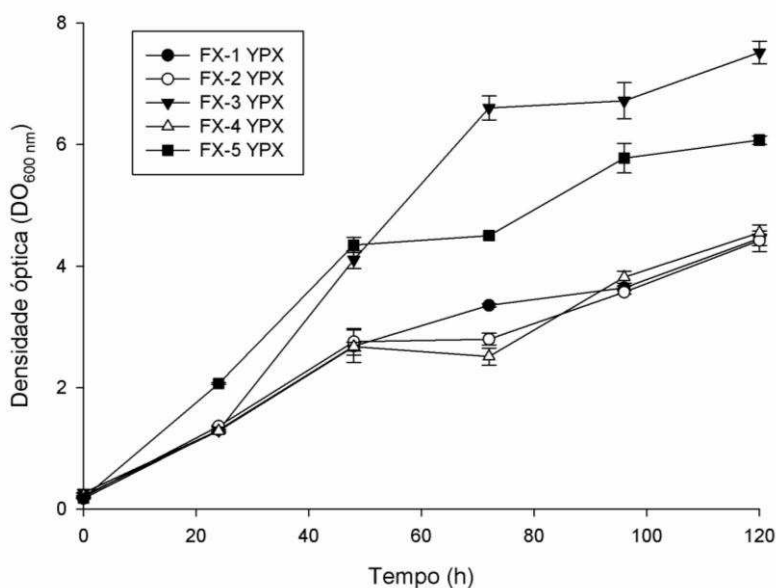


Figura 5. Crescimento dos isolados fermentadores de xilose em meio YP acrescido de xilose como fonte de carbono e energia sob hipoxia.

O perfil de crescimento das linhagens FX-1, FX-2 e FX-4 foi similar no meio YP acrescido de xilose (Figura 5). Verificou-se que no período de 48 horas, o crescimento

das linhagens FX-3 e FX-5 foi similar e após esse período, a linhagem FX-5 apresentou os maiores valores de densidade populacional.

No meio YNB contendo xilose como única fonte de carbono e energia, os valores de densidade populacional foram similares entre as linhagens FX-1, FX-2, FX-3 e FX-4, sendo que a linhagem FX-5 apresentou os maiores valores de densidade populacional (Figura 6).

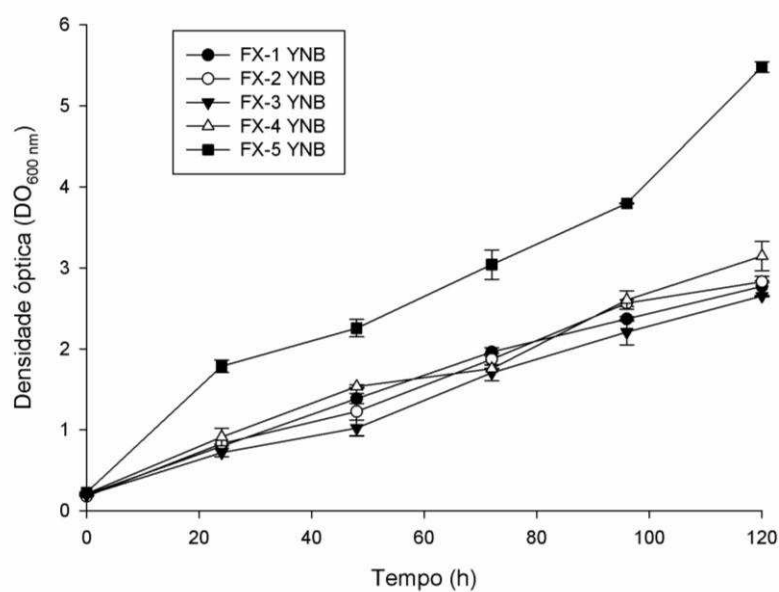


Figura 6. Crescimento dos isolados fermentadores de xilose em meio YNB acrescido de xilose como única fonte de carbono e energia sob hipoxia.

A produção de xilitol pelas 5 linhagens foi maior que a produção de etanol. A linhagem FX-5 apresentou o maior consumo de xilose, 55,3%. Além disso, observou-se que tanto a produção de etanol, quanto a produção de xilitol foram maiores nessa linhagem (Tabela 2). Sendo assim, a linhagem FX-5 foi selecionada para avaliar o potencial da mesma para converter o açúcar xilose em etanol, xilitol e outros metabólitos de interesse industrial.

Tabela 2. Consumo de xilose (g L^{-1}), produção de xilitol (g L^{-1}) e de etanol (g L^{-1}) obtidos por cinco isolados fermentadores de xilose com 120 horas de fermentação.

Linhagens de leveduras	Consumo de xilose (g L^{-1})	Produção de xilitol (g L^{-1})	Produção de etanol (g L^{-1})
FX-1	5,71	1,72	0,26
FX-2	5,61	1,32	0,13
FX-3	2,69	1,15	0,20
FX-4	5,98	1,41	0,25
FX-5	9,7	4,13	0,36

4.3. Identificação taxonômica da levedura FX-5

A identificação da linhagem FX-5 foi realizada por meio da comparação da sequência do gene do rRNA da região D1/D2 da subunidade maior do ribossomo, como descrito por LACHANCE et al. (2003), com as sequências disponíveis no GenBank(www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/), utilizando o programa BLASTn (Basic Locus Alignment Search Tool). A identidade da sequência obtida foi de 99% (532/533) para a levedura *Meyerozyma guilliermondii* NRRL Y-2075. Sendo assim, a linhagem FX-5 foi designada como *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1.

4.4. Efeito da concentração de oxigênio sobre a produção de etanol e xilitol pela levedura *M. guilliermondii* UFV-1

Tendo em vista que o nível de oxigênio dissolvido no meio de cultivo influencia substancialmente a conversão do açúcar xilose em etanol e xilitol por leveduras, o seu efeito sobre a produção destes metabólitos pela levedura *M. guilliermondii* UFV-1 foi avaliado em experimentos conduzidos em biorreatores e frascos de Erlenmeyer (ANEXO C). No citoplasma da levedura, a xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilitol redutase (XR), dependente de $\text{NADH} + \text{H}^+$ ou NADPH . Em seguida, o xilitol é oxidado a xilulose pela enzima xilulose desidrogenase (XDH) que segue a via das pentoses, ou ele acumula-se quando há um desequilíbrio de cofatores (NADPH , $\text{NADH} + \text{H}^+$ e NAD^+), em função do nível de oxigênio dissolvido no meio (SKOOG et al., 1988; CHU; LEE, 2007; YOUNG et al., 2010; CHANDEL et al., 2011). Com o acúmulo de xilitol, a produção de etanol é reduzida.

Os parâmetros fermentativos apresentados na tabela 3 mostram que a produção de etanol e xilitol por *M. guilliermondii* UFV-1 é fortemente influenciada pelo

nível de oxigênio no meio de cultivo. A produção de etanol foi maior na condição em que a concentração OD foi de 10%. Nessa condição, a eficiência de conversão de xilose em etanol foi de 18,47%, bem superior às obtidas nas demais condições avaliadas. Nas concentrações de 2% e 5% de OD, a produção de etanol foi de 0,25 e 0,59 g L⁻¹, respectivamente, inferior à obtida na concentração de 10% de OD. Nos cultivos em frascos de Erlenmeyer, as produções de etanol em hipoxia e em aerobiose foram baixas, 0,36 g L⁻¹ e 0,11 g L⁻¹, respectivamente. Tanto em aerobiose como em hipoxia, o rendimento de produção de etanol foi menor que o rendimento de produção de xilitol. Como esperado, em aerobiose o rendimento celular foi superior aos rendimentos obtidos nas demais condições avaliadas.

Nos cultivos conduzidos em biorreatores sob hipoxia, a produção de xilitol foi maior na concentração de OD de 2% (2,88 g L⁻¹). Como pode ser observado na tabela 3, tanto o rendimento quanto a produção de xilitol diminuíram com o aumento da concentração de OD no meio. O contrário foi observado para o rendimento e produção de etanol, ou seja, estes parâmetros fermentativos aumentaram com aumento da concentração de OD no meio. Esses resultados reforçam a importância do controle do nível de oxigênio no estabelecimento das condições que favorecem a produção de etanol ou xilitol.

A produção de xilitol foi maior em cultivos realizados em frascos de Erlenmeyer, principalmente sob hipoxia (5,34 g L⁻¹), condição na qual a eficiência de conversão de xilose em xilitol foi de 55,3%. Esses resultados indicam o potencial da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 para converter xilose em xilitol. De fato, as linhagens *M. (Candida) guilliermondii* estão entre as leveduras que se destacam na produção de xilitol, apresentando uma eficiência de conversão de 77-80% (RAFIQUL; MIMI SAKINAH, 2012), sendo que a linhagem de *M. guilliermondii* (*C. guilliermondii* FIT-20037) apresentou um rendimento de xilitol de 81% em relação ao teórico (BARBOSA et al., 1988). Em todos os cultivos a xilose foi totalmente consumida, exceto no cultivo em Erlenmeyer sob hipoxia, no qual a levedura consumiu 55,3% da xilose disponível. Esses resultados mostram que a levedura mostra potencial para crescer em meio constituído de hidrolisado hemicelulósico, pois foi em geral capaz de assimilar toda a xilose disponível no meio.

Apesar da produção de etanol não ter sido tão elevada quanto a de xilitol, o cultivo conduzido com 10% de OD no meio, no qual a produção do primeiro metabólito foi maior que a do segundo, mostrou o potencial dessa levedura para a produção de etanol a partir de xilose. Tal potencial também foi observado em outra linhagem de *M. guilliermondii* (*C. guilliermondii* NRRL Y-2075). Essa linhagem obteve um rendimento

de etanol de $0,46 \text{ g g}^{-1}$, bem próximo ao rendimento teórico ($0,51 \text{ g g}^{-1}$), em hidrolisado de casca de soja (Schirmer-Michel et al., 2008).

É possível que a produção de álcool por *M. guilliermondii* UFV-1 seja maior em concentrações de oxigênio dissolvido superior a 10%, pois como apontado anteriormente, a produção do mesmo aumentou com o aumento do nível de oxigênio (Tabela 3). Experimentos devem ser conduzidos para avaliar se o aumento da concentração de OD no meio de fermentação pode favorecer a produção de etanol em detrimento a de xilitol.

Tabela 3. Produção de etanol e xilitol, rendimento de etanol ($Y_{P/S \text{ etanol}}$), rendimento de xilitol ($Y_{P/S \text{ xilitol}}$), rendimento celular ($Y_{X/S}$), produtividade volumétrica de etanol ($Q_P \text{ etanol}$), produtividade volumétrica de xilitol ($Q_P \text{ xilitol}$), eficiência de conversão em etanol (η_{etanol}) e eficiência de conversão em xilitol (η_{xilitol}) obtidas pela levedura *M. guilliermondii* UFV-1 sob diferentes níveis de oxigênio.

Condição de fermentação	Etanol (g L^{-1})	$Y_{P/S \text{ etanol}}$ (g g^{-1})	$Q_P \text{ etanol}$ ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	η_{etanol} (%)	Xilitol (g L^{-1})	$Y_{P/S \text{ xilitol}}$ (g g^{-1})	$Q_P \text{ xilitol}$ ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	η_{xilitol} (%)	$Y_{X/S}$ (g g^{-1})
Hipoxia 2% OD (Biorreator)	0,25	0,01	0,01	5,62	2,88	0,14	0,05	15,4	0,21
Hipoxia 5% OD (Biorreator)	0,59	0,03	0,01	2,42	1,88	0,09	0,02	10,0	0,27
Hipoxia 10 % OD (Biorreator)	1,98	0,09	0,03	18,47	0,13	0,01	0,002	0,67	0,21
Hipoxia (Erlenmeyer)	0,36	0,04	0,005	7,23	5,34	0,51	0,06	55,30	0,18
Aerobiose (Erlenmeyer)	0,11	0,005	0,001	0,96	4,51	0,21	0,06	23,4	0,35

4.5. Produção de etanol em meio contendo xilose e glicose

Visto que a levedura *M. guilliermondii* UFV-1 converte o açúcar xilose em etanol, esta apresenta potencial ser utilizada no aproveitamento de hidrolisado hemicelulósico, o qual é uma fonte desse açúcar. Todavia, a biomassa lignocelulósica também é constituída por celulose, polímero que é fonte de glicose. No intuito de verificar se essa linhagem apresenta potencial para fermentar uma mistura de hidrolisado hemicelulósico com hidrolisado celulósico, a mesma foi cultivada em meio YP contendo uma mistura de glicose e xilose para avaliar o potencial dessa linhagem co-assimilar esses açúcares.

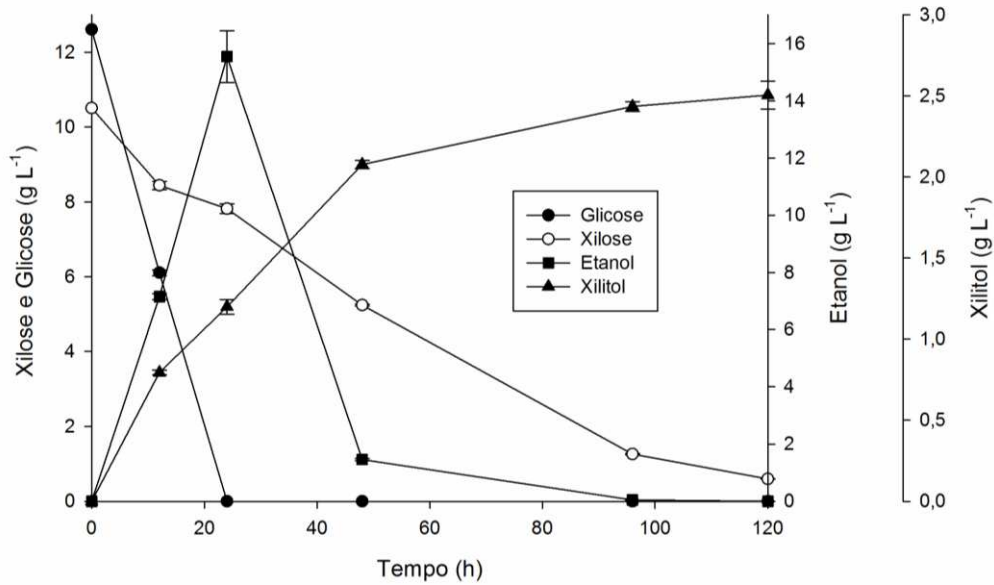


Figura 7. Consumo de glicose e xilose, produção de etanol e de xilitol obtidos pela levedura *M. guilliermondii* UFV-1 em meio YP acrescido de xilose com 10% de OD no meio.

Após 12 horas de crescimento, a levedura *M. guilliermondii* UFV-1 produziu 7 g L⁻¹ de etanol e consumiu 24,3% de xilose e 53,9% de glicose, disponíveis no meio de fermentação. No tempo 24 horas a levedura consumiu toda glicose presente no meio e produziu 10,1 g L⁻¹ de etanol (Figura 7), alcançando uma produtividade volumétrica de 0,42 g L⁻¹ h⁻¹. A produção final de xilitol foi de 2,5 g L⁻¹, com um rendimento de 0,25 g g⁻¹.

Podemos observar na Figura 7 que a levedura não foi capaz de assimilar eficientemente o açúcar xilose no período entre 12 e 24 horas. Por outro lado, a glicose foi consumida rapidamente nesse período, indicando que este açúcar é assimilado preferencialmente pela levedura *M. guilliermondii* UFV-1. Essa preferência pode estar relacionada ao sistema de transporte desses açúcares, assim como ocorre em outras leveduras que fermentam xilose. As leveduras *S. stipitis* NRRL Y-7124 e CBS 7126 possuem um sistema de transporte de xilose de baixa afinidade e outro de alta afinidade. O sistema de baixa afinidade transporta tanto xilose quanto glicose, enquanto o sistema de alta afinidade transporta somente xilose e é inibido em presença de glicose (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994). Nessas leveduras a glicose é transportada de forma mais eficiente do que a xilose. Embora não tenham sido feitos neste trabalho experimentos de cinética de transporte desses açúcares, estima-se que o transporte de glicose e xilose em *M. guilliermondii* UFV-1 seja mediado pelo mesmo sistema de transporte, e que este apresente maior afinidade por glicose.

Com 24 horas de fermentação, a glicose foi completamente consumida. Após esse período, a xilose continuou a ser consumida, todavia o etanol produzido também

foi consumido, mesmo na presença de um açúcar fermentescível. Portanto, *M. guilliermondii* UFV-1 não parece ser uma boa candidata para produzir etanol a partir de um meio de cultivo contendo hidrolisado celulósico e hemicelulósico.

4.6. Cinética de crescimento de *M. guilliermondii* UFV-1 em função da concentração de xilose

Os parâmetros cinéticos do crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 em função da concentração de xilose no meio de cultivo YNB, estão representados na Figura 8. No meio YNB, *M. guilliermondii* UFV-1 apresentou um velocidade específica máxima de $0,22 \text{ h}^{-1}$ e uma constante de saturação de $0,46 \text{ g L}^{-1}$ para o açúcar xilose.

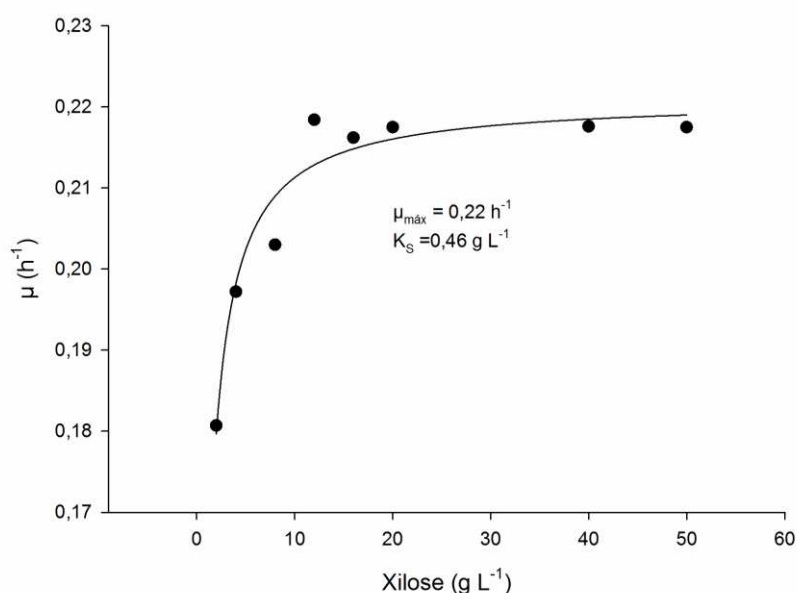


Figura 8. Cinética de crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 em função da concentração de xilose destacando a velocidade máxima ($\mu_{\text{máx}}$) e constante de saturação (K_S), em função da concentração de xilose no meio YNB.

A velocidade específica máxima de crescimento estimada para a levedura *M. guilliermondii* UFV-1 ($0,22 \text{ h}^{-1}$) foi similar à velocidade máxima estimada ($0,25 \text{ h}^{-1}$) para a levedura nativa fermentadora de xilose *S. stipitis* CSIR-Y633 (CBS 7126).

4.7. Efeito da concentração de etanol sobre o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1

A levedura *M. guilliermondii* UFV-1 foi cultivada em meio YPX contendo diferentes concentrações de etanol para avaliar o efeito deste metabólito sobre o crescimento da mesma (Figura 9).

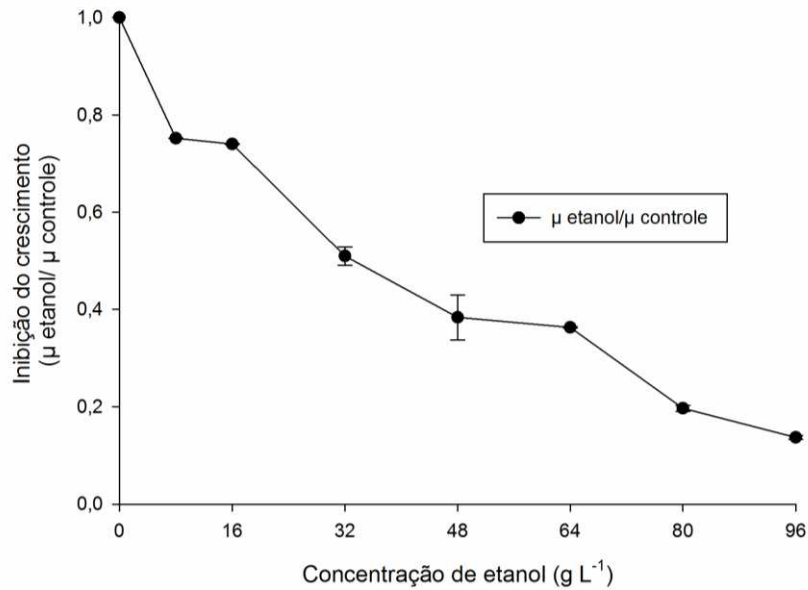


Figura 9. Efeito do etanol sobre o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 em meio YPX contendo diferentes concentrações de etanol

Nas concentrações mais baixas de etanol, 8 e 16 g L⁻¹ ocorreu uma inibição de 25% em relação ao controle. Na concentração de 32 g L⁻¹ de etanol, o crescimento de *M. guilliermondii* UFV-1 foi inibido em 50% (Figura 9). Quando a concentração de etanol atingiu 80 g L⁻¹, houve uma inibição de 81%. Levando em consideração que o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar possui aproximadamente 22,5 g de xilose (NEUREITER et al., 2002; CHANDEL et al., 2011) e que o rendimento teórico da produção de etanol a partir de xilose é de 0,51 g g⁻¹, a maior concentração de etanol que pode ser obtida é de 13,5 g L⁻¹. Em tal concentração o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 não é fortemente inibido. Os resultados obtidos com essa levedura são similares aos observados com outras leveduras nativas fermentadoras de xilose, *S. stipitis* CSIR-Y633 e *C. shehatae* CSIR-Y492, que têm aproximadamente 35% de inibição do seu crescimento nas concentrações de 30 e 33 g L⁻¹ de etanol, respectivamente (PREEZ et al., 1989).

4.8. Efeito da concentração de ácido acético sobre o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1

O ácido acético é formado a partir dos processos de pré-tratamento, que utilizam ácidos diluídos, para liberar monossacarídeos provenientes de açúcares acetilados da biomassa lignocelulósica (ZYI et al., 1991). A quantidade de ácido acético liberado nos pré-tratamentos depende da composição química da biomassa

lignocelulósica escolhida e do método utilizado para hidrolisar essa biomassa. Visto que esse ácido atravessa a membrana plasmática em sua forma não dissociada e se dissocia no citoplasma, o pH intracelular diminui comprometendo o metabolismo das leveduras (ZYI et al., 1991). Dessa forma, foi avaliado o efeito do inibidor ácido acético sobre o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 (Figura 10).

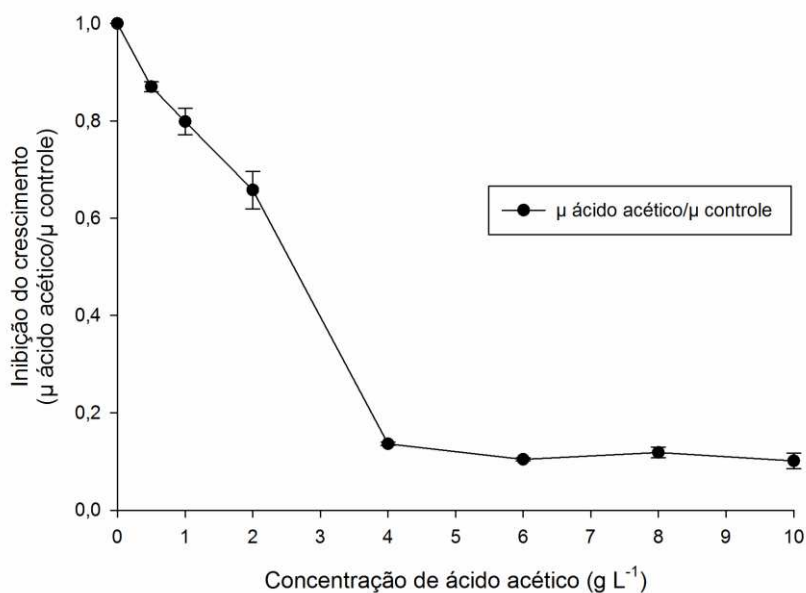


Figura 10. Efeito do ácido acético sobre o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 em meio YPX contendo diferentes concentrações de ácido acético.

Observamos nas concentrações mais baixas de ácido acético, 0,5 e 1 g L⁻¹, que a linhagem apresentou 13% e 20% de inibição do crescimento, respectivamente (Figura 10). Na concentração de 2 g L⁻¹ *M. guilliermondii* UFV-1 sofreu 34% de inibição do crescimento. Na concentração de 4 g L⁻¹ de ácido acético, normalmente encontrada em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido diluído (CHENG et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2013), o crescimento da linhagem sofreu uma inibição de 86% (Figura 10). Embora o crescimento tenha sido fortemente inibido nessa concentração de ácido acético, essa levedura ainda cresceu, o que não é observado em algumas leveduras fermentadoras de xilose. A levedura fermentadora de xilose *S. stipitis* DSM 3651 tem o seu crescimento e produção de etanol totalmente inibido em meio contendo 3,5 g L⁻¹ de ácido acético (BELLIDO et al., 2011).

4.9. Efeito da concentração do furfural sobre o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1

O furfural ou 2-furaldeído é um inibidor de fermentação formado a partir da degradação do açúcar xilose, sob condições de alta temperatura e pressão, o que ocorre durante a etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Em *C. tropicalis*, o furfural inibe a síntese de RNA e proteínas, e ainda reduz a atividade da cadeia respiratória por diminuir os níveis de citocromo (BANERJEE et al., 1981). Visto que esse subproduto atua inibindo o processo de fermentação, o efeito do furfural sob o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 foi avaliado (Figura 11).

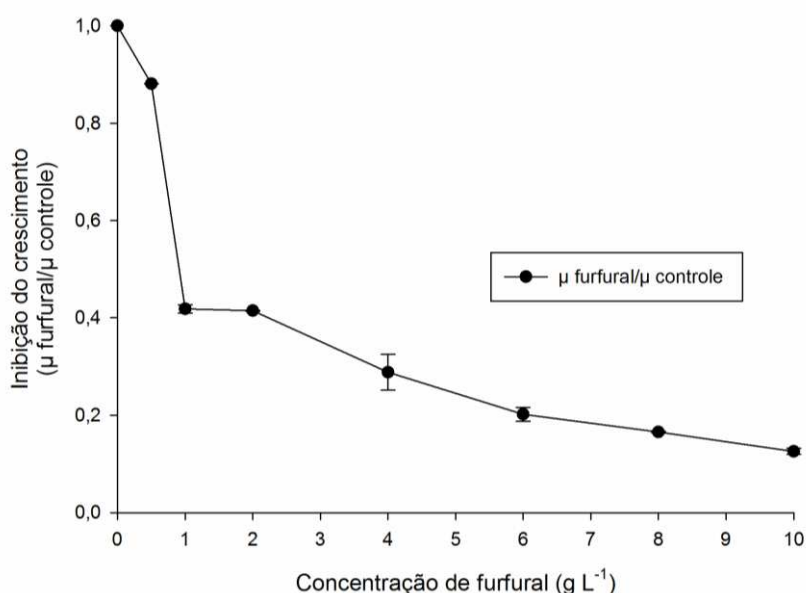


Figura 21. Efeito do furfural sobre o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 em função das diferentes concentrações do furfural.

Na concentração mais baixa de furfural, 0,5 g L⁻¹, a levedura *M. guilliermondii* UFV-1 teve o seu crescimento inibido em 12% (Figura 11). Nas concentrações 1 e 2 g L⁻¹, a linhagem ainda é capaz de crescer, embora o crescimento tenha sido inibido em aproximadamente 58% (Figura 11). Este resultado mostra que a levedura pode crescer em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, uma vez que a concentração de furfural encontrada neste hidrolisado varia de 0,05 a 1 g L⁻¹ (VASCONCELOS et al., 2013).

Na concentração de 4 g L⁻¹ de furfural a inibição do crescimento de *M. guilliermondii* UFV-1 foi de 71% (Figura 11). Todavia, deve-se ressaltar que nessa

concentração de furfural outras leveduras também têm o seu crescimento fortemente inibido, por exemplo, *S. cerevisiae* NSI 113, apresenta 80% de inibição do seu crescimento (BANERJEE et al., 1981). A partir da concentração de 6 g L⁻¹ de furfural no meio a inibição do crescimento foi de aproximadamente 85%, em relação ao controle.

4.10. Efeito da concentração do hidroximetilfurfural sobre o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1

O hidroximetilfurfural ou 5-hidroximetil-2-furfural (5-HMF) é um aldeído furânico formado a partir da degradação de hexoses, como a glicose, galactose e manose, provenientes da celulose e da hemicelulose de biomassas lignocelulósicas. Quando utilizamos pré-tratamentos com ácidos diluídos, sob temperatura e pressão elevadas, para degradar a biomassa lignocelulósica, há a formação de 5-HMF como subproduto (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Esse subproduto inibe o metabolismo de leveduras exercendo um efeito negativo sobre as enzimas triose fosfato desidrogenase e álcool desidrogenase (SANCHEZ, 1988). Visto que o 5-HMF inibe processos fermentativos, o efeito de diferentes concentrações de 5-HMF sobre o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 foi avaliado (Figura 12).

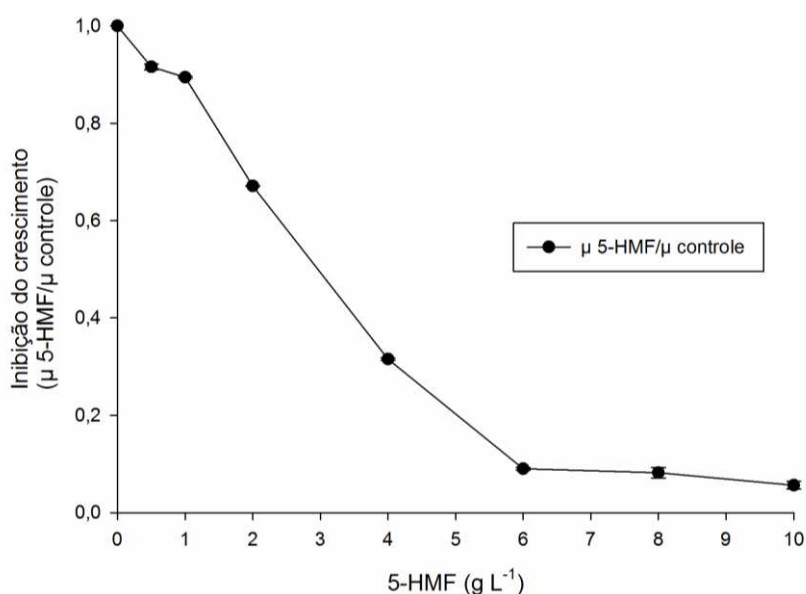


Figura 12. Efeito do 5-HMF sobre o crescimento da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 em meio YPX contendo diferentes concentrações de 5-HMF.

O hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar obtido a partir da hidrólise com ácido diluído possui entre 0,05 a 0,25 g L⁻¹ de 5-HMF (NEUREITER et al., 2002;

VASCONCELOS et al., 2013). Nas concentrações de 5-HMF de 0,5 e 1 g L⁻¹, a levedura *M. guilliermondii* UFV-1 tem o seu crescimento inibido em aproximadamente 9% (Figura 12). Portanto, essa levedura é capaz de crescer bem em concentrações de 5-HMF maiores do que as normalmente encontradas em hidrolisado hemicelulósico. Nas concentrações de HMF de 2 e 4 g L⁻¹, o crescimento da linhagem foi inibido em 33% e 68%, respectivamente. Assim como ocorreu com *M. guilliermondii* UFV-1, o inibidor 5-HMF também reduziu o crescimento da linhagem *S. cerevisiae* CBS 8066 em concentrações próximas a 4 g L⁻¹ (TAHERZADEH et al., 2000). De fato, essas concentrações inibem substancialmente o crescimento de leveduras. Por exemplo, as linhagens fermentadoras de xilose, *S. stipitis* DSM 3651 e *C. shehatae* ATCC 22984, tiveram o seu crescimento completamente inibido na concentração de 4 g L⁻¹ de 5-HMF (DELGENES et al., 1996; BELLIDO et al., 2011). Nas concentrações mais altas, 6, 8 e 10 g L⁻¹, o HMF provocou uma inibição total do crescimento *M. guilliermondii* UFV-1 (Figura 12).

4.11. Análise do exometaboloma de *M. guilliermondii* UFV-1

No intuito de avaliar a influência da velocidade específica de crescimento sobre o perfil de metabólitos extracelulares produzidos pela levedura *M. guilliermondii* UFV-1, experimentos foram conduzidos em cultura contínua com duas taxas de diluição (velocidades específicas de crescimento) diferentes. A figura 13 mostra os cromatogramas obtidos nas velocidades de 0,08 h⁻¹ e 0,15 h⁻¹. Cabe ressaltar que a taxa de diluição de 0,15 h⁻¹, corresponde a condição em que velocidade específica de crescimento é próximo da máxima, ou seja, crescimento balanceado da cultura, enquanto a taxa de diluição 0,08 h⁻¹, corresponde a condição em que a levedura tem o seu crescimento limitado, assim como ocorre na fase de desaceleração.

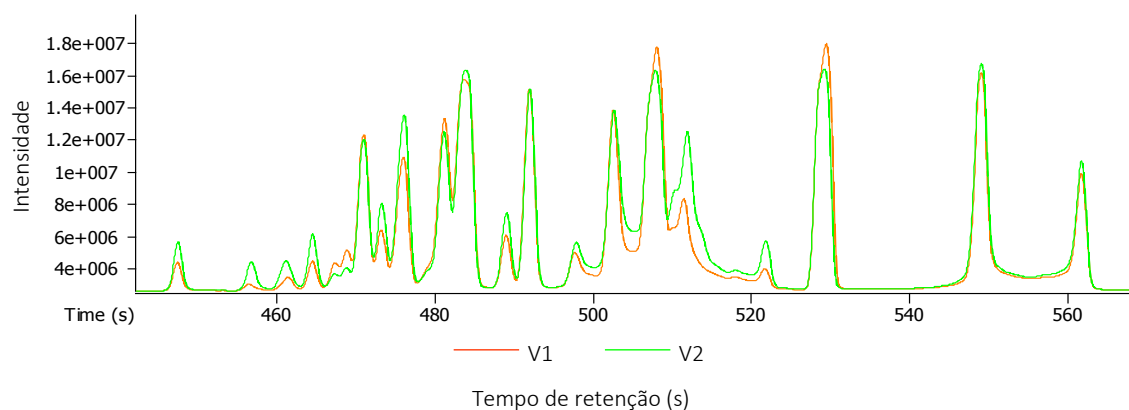


Figura 13. Cromatogramas obtidos a partir da análise do exometaboloma de *M. guilliermondii* UFV-1 em duas condições fisiológicas: baixa velocidade de crescimento (V1) e velocidade próxima à velocidade máxima de crescimento (V2).

O perfil de metabólitos produzidos pela levedura *M. guilliermondii* UFV-1 foi o mesmo nas duas condições fisiológicas avaliadas, ou seja, nas duas velocidades de crescimento. Esse resultado contrasta com as diferenças observadas nos perfis metabólicos das linhagens CEN.PK122 e BY4741 da levedura *S. cerevisiae* cultivada em diferentes taxas de diluição, isto é, velocidades de crescimento (AON; CORTASSA, 2001; ALLEN et al., 2003). Dos sete compostos identificados no exometaboloma de *M. guilliermondii* UFV-1 (Tabela 4), os mais abundantes foram: os ácidos valérico, capríco e butírico, e o glicofuranosídeo. Os ácidos valérico, capríco e butírico estão associados à inibição do fungo fitopatogênico *Fusarium graminearum* 623 (CORSETTI et al., 1998), mostrando o potencial de aplicação dos mesmos como agentes antifúngicos. Outro metabólito identificado que apresenta potencial uso como agente antimicrobiano é o éster malonato de etila, o qual inibe juntamente com outros ésteres a esporulação de *Bacillus cereus* T (GOLLAKOTA; HALVORSON, 1963). O glicofuranosídeo apresenta potencial de utilização como fármaco, pois este tem sido relacionado à inibição do co-transportador de glicose dependente de sódio de células do túbulo proximal dos rins. Estudos indicam que o nível de glicose no plasma sanguíneo de pacientes com diabetes podem ser diminuídos em função da inibição seletiva desse co-transportador (LIN et al., 2013).

Como esperado, pelos resultados previamente apresentados na tabela 4, o etanol também foi produzido no cultivo em cultura contínua. Outro metabólito produzido por *M. guilliermondii* UFV-1 que apresenta potencial biotecnológico é o

ácido málico. Este ácido é utilizado na indústria de alimentos e bebidas como acidulante e realçador de sabor (ZELLE et al., 2008).

Tabela 4. Metabólitos extracelulares produzidos por *M. guilliermondii* UFV-1 e seus respectivos tempos de retenção em segundos

Perfil metabólico extracelular de <i>M. guilliermondii</i> UFV-1	R. T. (s)
Ácido valérico	447,6
	464,6
Ácido caprótico	456,5
	529,5
Etanol	461,4
Ácido butírico	476,0
	489,0
	484,1
Glicofuranosídeo	492,0
	561,7
Malonato de etila	502,8
Ácido málico	521,8

5. CONCLUSÕES

Cinco leveduras fermentadoras de xilose foram selecionadas neste trabalho. Destacou-se a levedura *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1 que foi capaz de consumir totalmente a xilose disponível no meio e convertê-la em etanol e outros metabólitos de interesse industrial.

Experimentos com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido (OD) no meio de cultura (hipoxia em biorreatores 10%, 5% e 2% de OD, hipoxia e aerobiose em Erlenmeyer) mostraram que a produção de etanol e xilitol pela levedura *M. guilliermondii* UFV-1 a partir de xilose é influenciada pela concentração desse gás. A maior produção de etanol, 1,98 g L⁻¹, foi na condição de 10% de OD, na qual a eficiência de conversão de xilose em etanol foi de 18,47%. A maior produção de xilitol foi na condição de hipoxia em Erlenmeyer na qual a eficiência de conversão em xilitol foi de 55,30%.

A xilose não foi assimilada eficientemente por *M. guilliermondii* UFV-1 na presença de glicose, mostrando que esta hexose é o açúcar preferencial.

A levedura *M. guilliermondii* UFV-1 não teve o seu crescimento fortemente inibido em concentrações de etanol normalmente encontradas em hidrolisado hemicelulósico fermentado. Além disso, essa levedura apresentou um considerável crescimento na presença dos inibidores ácido acético, furfural e 5-HMF quando comparado ao crescimento de outras leveduras nativas fermentadoras de xilose.

A análise do exometaboloma da levedura *M. guilliermondii* UFV-1 revelou que não houve diferença no perfil de metabólitos extracelulares produzidos nas duas condições de crescimento avaliadas: baixa velocidade específica de crescimento (fase de desaceleração) e velocidade específica de crescimento próxima da máxima (fase exponencial).

M. guilliermondii UFV-1 produziu os seguintes metabólitos de interesse biotecnológico no cultivo em cultura contínua: os ácidos valérico, capríco e butírico, usados como antifúngicos; o éster malonato de etila, usado como inibidor de esporulação de bactérias; o glicofuranosídeo, utilizado como fármaco no controle de diabetes; e o ácido málico, composto utilizado na indústria alimentícia. A produção desses metabólitos demonstra o potencial biotecnológico dessa levedura não apenas para a produção de etanol e xilitol, mas outros produtos de interesse industrial.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, J.; DAVEY, H. M.; BROADHURST, D.; et al. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 692–696, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740584>>. .

AON, J. C.; CORTASSA, S. Involvement of nitrogen metabolism in the triggering of ethanol fermentation in aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic engineering**, v. 3, n. 3, p. 250–264, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11461147>>. .

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2273–2282, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261909000919>>. Acesso em: 28/5/2014.

BANERJEE, N.; BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 226–228, 1981.

BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B. DE; MANCHILLA, I. M. DE; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal Industrial Microbiology**, v. 3, p. 241–251, 1988.

BELLIDO, C.; BOLADO, S.; COCA, M.; et al. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 10868–10874, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983414>>. Acesso em: 25/5/2014.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032109002408>>. Acesso em: 24/5/2014.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; DUSSÁN, K. J.; et al. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e43135, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3418277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26/5/2014.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J. E.; 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**, v. 103, n. 2, p. 421–431, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23053696>>. Acesso em: 28/5/2014.

CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; 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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840117>>. Acesso em: 28/5/2014.

CARDOSO, W. S.; SANTOS, F. A.; MOTA, C. M.; et al. Pre-treatment of biomass for ethanol production. **Revista Analytica**, v. 56, p. 64–75, 2011.

CHANDEL, A. K.; CHANDRASEKHAR, G.; RADHIKA, K.; RAVINDER, R. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. January, p. 8–20, 2011.

CHEN, Y.; DAVIET, L.; SCHALK, M.; SIEWERS, V.; NIELSEN, J. Establishing a platform cell factory through engineering of yeast acetyl-CoA metabolism. **Metabolic Engineering**, v. 15, p. 48–54, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23164578>>. Acesso em: 15/7/2014.

CHENG, K.-K.; CAI, B.-Y.; ZHANG, J.-A.; et al. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 105–109, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X07002604>>. Acesso em: 25/5/2014.

CHU, B. C. H.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 5, p. 425–441, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17524590>>. Acesso em: 28/5/2014.

CODA, R.; RIZZELLO, C. G.; DI, R.; et al. Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. **Food Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 243–251, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.023>>. .

CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; ROSSI, J.; DAMIANI, P. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 253–256, 1998.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 3, p. 220–225, 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022995002375>>. .

DEMIRBAS, M. F. Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review. **Applied Energy**, v. 86, p. S151–S161, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261909001676>>. Acesso em: 28/5/2014.

DEMIRBAS, M. F.; BALAT, M.; BALAT, H. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 7, p. 1746–1760, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890409000946>>. Acesso em: 28/5/2014.

ENERGY, U. . D. OF. From biomass to cellulosic ethanol: genomics for alternative fuels. Disponível em: <www.genomicscience.energy.gov/biofuels/Biofuels_Placemat2.pdf>. Acesso em: 14/7/2014.

FERREIRA, A. D.; MUSSATTO, S. I.; CADETE, R. M.; ROSA, C. A.; SILVA, S. S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43 . 2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, v. 28, p. 547–554, 2011.

GOLLAKOTA, K. G.; HALVORSON, H. O. Biochemical changes occurring during sporulation of *Bacillus cereus* T. **J. Bacteriol.**, v. 85, p. 1386–1393, 1963.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549–556, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17050014>>. Acesso em: 28/5/2014.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 933–943, 1994.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937–953, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17294186>>. Acesso em: 23/5/2014.

HAMACHER, T.; BECKER, J.; GÁRDONYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BOLES, E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 9, p. 2783–2788, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213924>>. .

HERNÁNDEZ-SALAS, J. M.; VILLA-RAMÍREZ, M. S.; VELOZ-RENDÓN, J. S.; et al. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1238–1245, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19000863>>. Acesso em: 26/5/2014.

HORVÁTH, I. S.; FRANZÉN, C. J.; TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4076–4086, 2003.

JOEL, E. L.; BHIMBA, B. V. Evaluation of secondary metabolites from mangrove associated fungi *Meyerozyma guilliermondii*. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 49, n. 3, p. 189–194, 2013. Alexandria University Faculty of Medicine. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2013.04.003>>. .

KAJASTE, R. Chemicals from biomass – managing greenhouse gas emissions in biorefinery production chains – a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 75, p. 1–10, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652614003035>>. Acesso em: 12/7/2014.

KILIAN, S. G.; UDEN, N. VAN. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 545–548, 1988.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 4th ed. 1997.

KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Milleromyces*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v. 51, p. 2–14, 2010.

LACHANCE, M.; DANIEL, H.; MEYER, W.; et al. The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species is unusually polymorphic. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 3, p. 253–258, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567135603001132>>. Acesso em: 28/5/2014.

LIN, T.-S.; LIW, Y.-W.; SONG, J.-S.; et al. Synthesis and biological evaluation of novel C-aryl d-glucofuranosides as sodium-dependent glucose co-transporter 2 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 21, p. 6282–6291, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24071445>>. Acesso em: 20/7/2014.

LONG, T. M.; SU, Y.-K.; HEADMAN, J.; 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. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3406140&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28/5/2014.

MATOS, I. T. S. R.; CASSA-BARBOSA, L. A.; GALVÃO MEDEIROS, R. DE S.; NUNES-SILVA, C. G.; ASTOLFI FILHO, S. Isolation, taxonomic identification and investigation of the biotechnological potential of wild-type *Meyerozyma guilliermondii* associated with Amazonian termites able to ferment D-xylose. **Biosci. J.**, v. 30, p. 260–266, 2014.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S036012851200007X>>. Acesso em: 12/7/2014.

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578–597, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032109002342>>. Acesso em: 23/5/2014.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-Acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100v, p. 49–58, 2002.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxication. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 17–24, 2000a.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852499001613>>. .

PAPON, N.; SAVINI, V.; LANOUE, A.; et al. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. **Current Genetics**, v. 59, n. 3, p. 73–90, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23616192>>. Acesso em: 27/5/2014.

PREEZ, J. C.; DRIESSEL, B. VAN; PRIOR, B. A. Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved oxygen levels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 53–58, 1989.

PREEZ, J. C. DU. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 944–956, 1994.

RAFIQUL, I. S. M.; MIMI SAKINAH, A. M. Bioproduction of xylitol by enzyme technology and future prospects. **International Food Reserach Journal**, v. 19, n. 2, p. 405–408, 2012.

ROMI, W.; KEISAM, S.; AHMED, G.; JEYARAM, K. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2014. BMC Microbiology. Disponível em: <BMC Microbiology>. .

SANCHEZ, B. Effects of furfurai and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 315–318, 1988.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. DE; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol**. 2012.

SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, P. F.; MATOS, G. S.; AYUB, M. A. Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2898–2904, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17706417>>. Acesso em: 27/5/2014.

SIMS, R. E. H.; MABEE, W.; SADDLER, J. N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1570–80, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19963372>>. Acesso em: 23/5/2014.

SKOOG, K.; HAHN-H, B.; MICROBIOLOGY, A.; BOX, P. O.; LAND, S.-O. Xylose fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. April 1987, p. 66–80, 1988.

SOUZA, C. J. A. DE; COSTA, D. A.; RODRIGUES, MARINA Q. R. SANTOS, A. F. DOS; et al. The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.

109, p. 63–69, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22285296>>. Acesso em: 28/5/2014.

SUH, S.-O.; HOUSEKNECHT, J. L.; GUJJARI, P.; ZHOU, J. J. *Scheffersomyces parashehatae* f.a., sp. nov., *Scheffersomyces xylosifermentans* f.a., sp. nov., *Candida broadrunensis* sp. nov. and *Candida manassasensis* sp. nov., novel yeasts associated with wood-ingesting insects, and their ecological and biofuel implicat. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt 11, p. 4330–4339, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24014624>>. Acesso em: 28/5/2014.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 701–708, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919330>>.

TAYLOR, G. Biofuels and the biorefinery concept. **Energy Policy**, v. 36, n. 12, p. 4406–4409, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301421508004588>>. Acesso em: 28/5/2014.

VASCONCELOS, S. M. DE; SANTOS, A. M. P.; ROCHA, G. J. M.; SOUTO-MAIOR, A. M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 46–52, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23186685>>. Acesso em: 28/5/2014.

WOHLBACH, D. J.; KUO, A.; SATO, T. K.; et al. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **PNAS**, v. 108, n. 32, p. 13212–13217, 2011.

YOUNG, E.; LEE, S.-M.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 24, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2993683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28/5/2014.

ZELLE, R. M.; HULSTER, E. DE; WINDEN, W. A VAN; et al. Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 9, p. 2766–2777, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2394876&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20/7/2014.

ZYI, C. VAN; PRIOR, B. A.; PREEZ, J. C. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 82–86, 1991.

8. ANEXOS

ANEXO A. Crescimento das linhagens de leveduras pertencentes ao acervo de culturas do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos (UFV-BIOAGRO). As linhagens foram crescidas em meio YPD sólido e YNB sólido contendo xilose como única fonte de carbono e energia

Linhagens de leveduras	Meio YP + glicose	Meio YNB + xilose
BEC INT- C 01 - A	+	-
BEC INT- C 02 - A	+	-
BEC INT- C 03 - A	+	-
BEC INT- C 04 - A	+	-
BEC INT- C 05 - A	+	-
BEC INT- C 06 - A	+	-
BEC INT- C 07 - A	+	-
BEC INT- C 08 - A	+	-
BEC INT- C 09 - A	+	+
BEC INT- C 10 - A	+	-
BEC INT- C 11 - A	+	+
BEC INT- C 12 - A	+	-
BEC INT- C 13 - A	+	+
BEC INT- C 14 - A	+	+
BEC INT- C 15 - A	+	+
BEC INT- C 16 - A	+	+
BEC INT- C 17 - A	+	-
BEC INT- C 18 - A	+	-
BEC INT- C 19 - A	+	-
BEC INT- C 20 - A	+	-
BEC INT- C 33 - A	+	-
BEC INT- C 34 - A	+	-
BEC INT- C 35 - A	+	-
BEC INT- C 36 - A	+	-
BEC INT- C 37 - A	+	+
BEC INT- C 38 - A	+	+
BEC INT- C 39 - A	+	+
BEC INT- C 40 - A	+	+
BEC INT- P1 43 - B	-	-
BEC INT- P1 44 - C	-	-

BEC INT- P1 45 - B	-	-
BEC INT- P21 - A	-	-
BEC INT- P22 - A	+	-
BEC INT- P23 - A	+	-
BEC INT- P24 - A	+	-
BEC INT- P25 - A	+	-
BEC INT- P26 - B	+	-
BEC INT- P27 - B	+	-
BEC INT- P28 - B	+	-
BEC INT- P29 - B	+	-
BEC INT- P2 10 - C	+	-
BEC INT- P2 11 - A	+	-
BEC INT- P2 12 - A	+	-
BEC INT- P2 13 - B	+	-
BEC INT- P2 14 - C	+	-
BEC INT- P2 15 - C	+	-
BEC INT- P2 16 - C	+	-
BEC INT- P2 17 - C	+	-
BEC INT- P2 18 - C	+	-
BEC INT- P2 19 - C	+	-
BEC INT- P2 20 - C	+	-
BEC INT- P4 EST-1	+	-
BEC INT- P4 EST-2	+	-
BEX INT- C 01 - A	+	+
BEX INT- C 02 - A	+	+
BEX INT- C 03 - A	+	+
BEX INT- C 04 - A	+	+
BEX INT- C 05 - A	+	+
BEX INT- C 06 - A	+	+
BEX INT- C 07 - A	+	+
BEX INT- C 08 - A	+	+
BEX INT- C 09 - A	+	+
BEX INT- C 10 - A	+	-
BEX INT- C 11 - A	+	+
BEX INT- C 12 - A	+	+
BEX INT- C 13 - A	+	+

BEX INT- C 14 - A	+	+
BEX INT- C 15 - A	+	+
BEX INT- C 16 - A	+	+
BEX INT- C 17 - A	+	+
BEX INT- C 18 - A	+	-
BEX INT- C 19 - A	+	+
BEX INT- C 20 - A	+	+
BEX INT- C EST-1	+	+
BEX INT- C EST-2	+	+
BEX INT- C EST-3	+	+
BEX INT- C EST-4	+	+
BEX INT- C 21 - A	-	-
BEX INT- C 22 - A	-	-
BEX INT- C 23 - A	-	-
BEX INT- C 24 - A	-	-
BEX INT- C 33 - A	-	-
BEX INT- C 34 - A	-	-
BEX INT- C 35 - A	-	-
BEX INT- C 37 - A	-	-
BEX INT- C 38 - A	-	-
BEX INT- C 39 - A	-	-
BEX INT- C 41 - A	-	-
BEX INT- C 42 - A	-	-
BEX INT- C 43 - A	-	-
BEX INT- C 44 - A	-	-
BEX INT- C 45 - A	-	-
BEX INT- C 49 - A	-	-
BEX INT- P1 01 - A	-	-
BEX INT- P1 02 - A	-	-
BEX INT- P1 03 - A	-	-
BEX INT- P1 04 - A	-	-
BEX INT- P1 05 - A	-	-
BEX INT- P1 06 - A	-	-
BEX INT- P1 07 - B	-	-
BEX INT- P1 08 - B	-	-
BEX INT- P1 10 - C	-	-

BEX INT- P1 09 - B	-	-
BEX INT- P1 11 - D	-	-
BEX INT- P1 12 - D	-	-
BEX INT- P1 13 - D	-	-
BEX INT- P1 14 - D	+	+
BEX INT- P1 15 - D	+	+
BEX INT- P1 16 - D	-	-
BEX INT- P1 17 - D	-	-
BEX INT- P1 18 - D	+	+
BEX INT- P1 19 - D	+	+
BEX INT- P1 20 - D	+	+
BEX INT- P1 21 - D	+	+
BEX INT- P1 22 - D	+	+
BEX INT- P1 23 - D	+	+
BEX INT- P1 24 - D	+	-
BEX INT- P4 25 - A	-	+
BEX INT- P4 26 - B	-	+
BEX INT- P4 27 - C	+	+
BEX INT- P4 28 - C	+	-
BEX INT- P4 29 - C	-	-
BEX INT- P4 30 - C	-	-
BEX INT- P4 31 - C	-	-
BEX INT- P4 32 - C	-	-
BEX INT- P4 33 - C	-	-
BEX INT- P4 34 - C	-	-
BEX INT- P4 35 - C	-	-
BEX INT- P4 36 - C	-	-

+ indica crescimento

- indica que não houve crescimento

ANEXO B. Avaliação do potencial fermentativo das linhagens de leveduras que assimilam xilose como única fonte de carbono e energia.

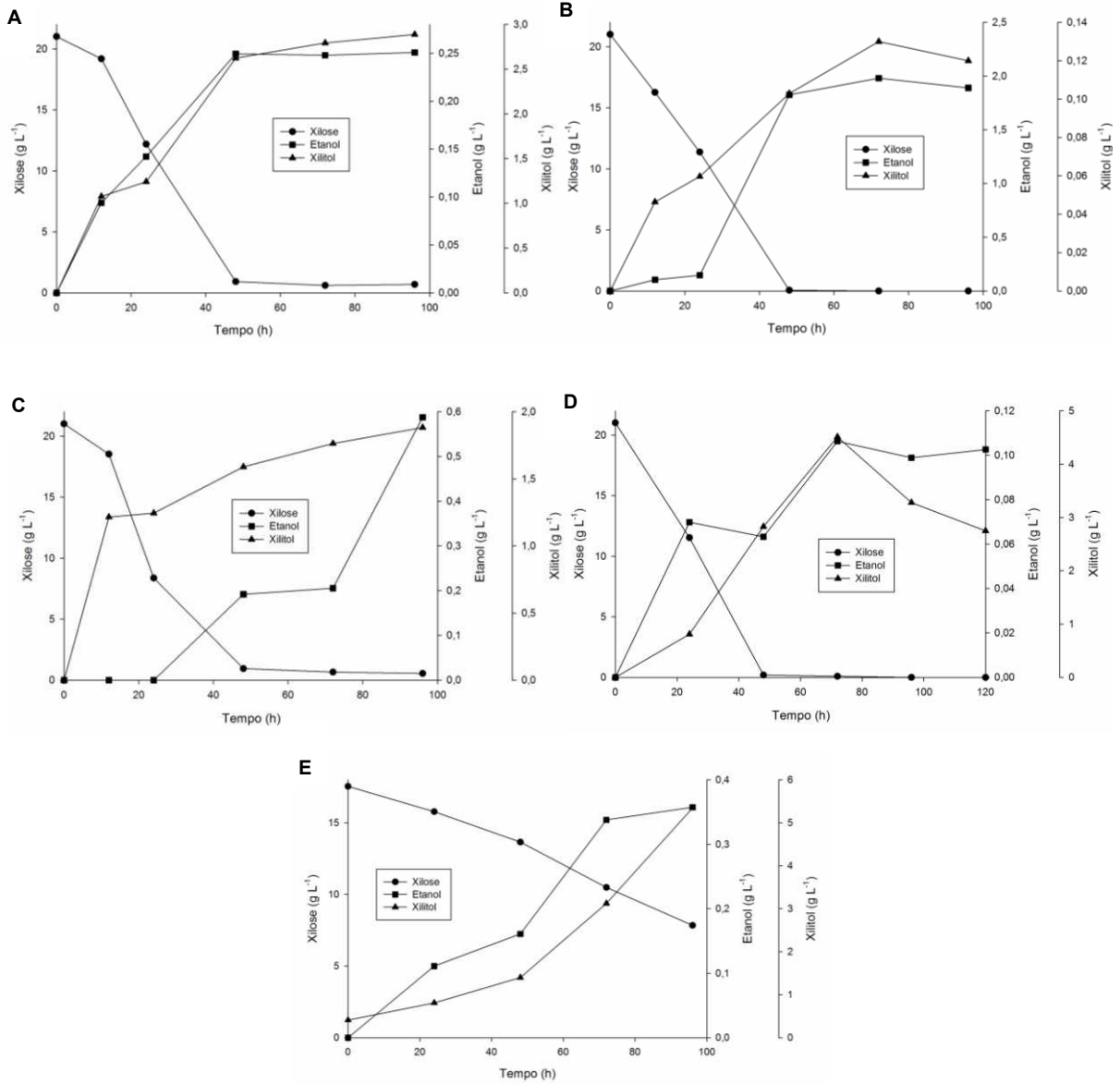
Linhagens de leveduras	Produção de CO₂ (via tubos de Durham)
BEC INT- C 09 - A	-
BEC INT- C 11 - A	-
BEC INT- C 13 - A	-
BEC INT- C 14 - A	-
BEC INT- C 15 - A	-
BEC INT- C 16 - A	-
BEC INT- C 37 - A	-
BEC INT- C 38 - A	-
BEC INT- C 39 - A	-
BEC INT- C 40 - A	-
BEX INT- C 01 - A	-
BEX INT- C 02 - A	-
BEX INT- C 03 - A	-
BEX INT- C 04 - A	-
BEX INT- C 05 - A	-
BEX INT- C 06 - A	-
BEX INT- C 07 - A	-
BEX INT- C 08 - A	-
BEX INT- C 09 - A	-
BEX INT- C 11 - A	-
BEX INT- C 12 - A	-
BEX INT- C 13 - A	-
BEX INT- C 14 - A	-
BEX INT- C 15 - A	-
BEX INT- C 16 - A	-
BEX INT- C 17 - A	-
BEX INT- C 19 - A	-
BEX INT- C 20 - A	-
BEX INT- C EST - 1	-
BEX INT- C EST - 2	-

BEX INT- C EST - 3	-
BEX INT- C EST - 4	-
BEX INT- P1 14 - D	-
BEX INT- P1 15 - D	+
BEX INT- P1 18 - D	-
BEX INT- P1 19 - D	-
BEX INT- P1 20 - D	+
BEX INT- P1 21 - D	+
BEX INT- P1 22 - D	+
BEX INT- P1 23 - D	-
BEX INT- P1 25 - A	-
BEX INT- P4 27 - C	-
BEX INT- P4 28 - C	+

+ indica produção de bolhas no interior do tubo de Durham

- indica que não houve produção de bolhas no interior do tubo de Durham

ANEXO C. Consumo de xilose, produção de etanol e xilitol, obtidos pela levedura *M. guilliermondii* UFV-1 em meio YP acrescido de xilose sob condição de hipóxia em biorreatores com 10% (A), 5% (B) e 2% (C) de OD, em condição de aerobiose (D) e condição de hipoxia em Erlenmeyer (E).



ANEXO D. Curva padrão de massa celular seca (mg mL^{-1}) por absorvância ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$) de *M. guilliermondii* UFV-1, em meio YP (A) e meio YNB (B), ambos acrescidos de xilose.

