

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**Efeito do etanol, cloreto de sódio e peróxido de hidrogênio sobre o crescimento de linhagens de *Spathaspora passalidarum* isoladas do bioma amazônico**

Julia Martins de Andrade  
*Magister Scientiae*

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2025**

**JULIA MARTINS DE ANDRADE**

**Efeito do etanol, cloreto de sódio e peróxido de hidrogênio sobre o crescimento de linhagens de *Spathaspora passalidarum* isoladas do bioma amazônico**

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*.

Orientador: Luciano Gomes Fietto

Coorientador: Wendel Batista da Silveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A553e  
2025  
Andrade, Julia Martins de, 1999-  
Efeito do etanol, cloreto de sódio e peróxido de hidrogênio sobre o crescimento de linhagens de *Spathaspora passalidarum* isoladas do bioma amazônico / Julia Martins de Andrade. – Viçosa, MG, 2025.

1 dissertação eletrônica (63 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, 2025.

Referências bibliográficas: f. 57-63.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.346>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Leveduras. 2. *Spathaspora passalidarum* - Efeito do estresse. 3. Biocombustíveis. 4. Álcool. I. Fietto, Luciano Gomes, 1973-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.562

**JULIA MARTINS DE ANDRADE**

**Efeito do etanol, cloreto de sódio e peróxido de hidrogênio sobre o crescimento de linhagens de *Spathaspora passalidarum* isoladas do bioma amazônico**

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: 26 de fevereiro de 2025.

Assentimento:

---

Julia Martins de Andrade  
Autora

---

Luciano Gomes Fietto  
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 26/05/2025 às 17:00:44 e pelo orientador em 29/05/2025 às 09:22:24. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **R9GF.4OEK.G3VB** e clique no botão 'Validar documento'.

Quem tem um amigo realmente tem tudo. Este trabalho é para vocês que estiveram aqui o tempo todo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a todo meu axé e a espiritualidade por me proporcionarem todo amparo e força para a realização desse trabalho durante todos os momentos de felicidade e agonia.

Agradeço imensamente a minha família por toda força e compreensão na minha ausência, mas também pela felicidade e companhia genuína na minha presença. Á minha mãe Eliane, por todo esforço feito e suor derramado para que eu pudesse chegar até aqui. Ao meu irmão Fabrício e nossos amores Joice, Bernardo, Marcelinho e Mariana, um simples “obrigado” seria pouco. Vocês tornaram o ninho mais aconchegante para que eu pudesse voltar sempre sendo eu mesma. Ao meu irmão Felipe, obrigada por todo carinho e apoio mesmo que distante, mas sempre presente no meu coração.

Agradeço também a minha família de Viçosa por ter sido pilar fundamental para minha sobrevivência até aqui. Victória e Camila, muito obrigada pelos longos anos de irmandade em república e na vida. Iury, muito obrigada por ter se tornado o meu terceiro irmão. Mariana, e a todos os integrantes da República Clandestinas, agradeço pela amizade incondicional e pelos mais longos e lindos cafés. Thalles, Judy, Mirelly, João Felipe, obrigada por se fazerem presentes das maneiras mais lindas ao longo desse tempo e por todo apoio fundamental nas melhores e piores horas.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) por todo suporte, ajuda e apoio durante essa jornada. Em especial, Ana Luiza, muito obrigada por toda parceria, disponibilidade e convivência tão sorridente. Ao professor Luciano Gomes Fietto pela oportunidade de parceria, confiança e compreensão. Lilian e Fernanda, muito obrigada pela paciência e por todos os ensinamentos. A todos do grupo de pesquisa, agradeço imensamente.

A todos que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização desse trabalho, sintam-se contemplados pelas palavras e minha grande gratidão.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“O pensamento  
é uma folha desprendida  
Do galho de nossas vidas  
Que o vento leva e conduz  
É uma luz vacilante e cega  
É o silêncio do cipreste  
Escoltado pela cruz”

Cartola em “Silêncio do Cipreste”.

## RESUMO

ANDRADE, Julia Martins de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2025. **Efeito do etanol, cloreto de sódio e peróxido de hidrogênio sobre o crescimento de linhagens de *Spathaspora passalidarum* isoladas do bioma amazônico**. Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientador: Wendel Batista da Silveira.

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo. O uso de combustíveis sustentáveis tem sido cada vez mais desejável visando menor impacto ambiental. Como forma de suprir a demanda energética sem utilizar hidrocarbonetos e derivados agrícolas, o Etanol de Segunda Geração (E2G) surge como uma possibilidade. No caso deste biocombustível, os microrganismos e as biomassas lignocelulósicas exercem um papel crucial. Por isso, este trabalho teve como objetivo caracterizar fisiologicamente 12 linhagens da levedura *Spathaspora passalidarum* isoladas do bioma brasileiro amazônico, visando futuras aplicações na indústria sucroalcooleira. Esta espécie possui potencial para a produção de E2G por ser fermentadora de xilose. Os experimentos avaliaram o perfil de crescimento das 12 linhagens em estresses provocados por etanol (5%, 6% e 7%), cloreto de sódio (0,5 M, 0,75 M e 1 M), peróxido de hidrogênio (7 mM e 10 mM) e diferentes concentrações de glicose (2%, 18%, 20%, 25% e 30%). Os ensaios de estresse foram realizados em meio YPD e meio YPX utilizando o equipamento Growth Profiler 960 (EnzyScreen). Ademais, foram realizados dois experimentos de co fermentação glicose/xilose a fim de identificar fontes de carbono preferenciais e rendimento de produção de etanol (g/L). Os resultados apontaram que o perfil de crescimento das linhagens apresentou variações de acordo com o estresse e o tipo de fonte de carbono (glicose ou xilose). Em meio YPX (xilose), as linhagens apresentaram maior resiliência ao estresse por etanol. Em condições de estresse por NaCl, a levedura de referência obteve o maior crescimento em 1 M, com OD (600 nm) de aproximadamente 1,2. Na primeira cofermentação, observou-se consumo preferencial de glicose (esgotada em até 12 horas por todas as linhagens). A linhagem 6 demonstrou consumo eficiente de xilose e produziu 10,5 g/L de etanol em 24 horas. A segunda cofermentação foi realizada com a levedura NRRL Y-27907 e o a levedura isolada número 6, sendo o isolado mais bem sucedido na produção de etanol. Portanto, conclui-se que a linhagem 6 de *S. passalidarum* apresentou melhor desempenho em relação aos outros isolados nos ensaios realizados.

Palavras-chave: Leveduras; *Spathaspora passalidarum*; Resposta ao estresse; Produção de etanol; Biocombustíveis; Etanol 2G

## ABSTRACT

ANDRADE, Julia Martins de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2025. **Effect of ethanol, sodium chloride and hydrogen peroxide on the growth of *Spathaspora passalidarum* strains isolated from the Amazon biome.** Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co-adviser: Wendel Batista da Silveira.

Brazil is the second largest ethanol producer in the world. The use of sustainable fuels has become increasingly desirable in order to reduce environmental impact. As a way to meet energy demand without using hydrocarbons and agricultural derivatives, Second Generation Ethanol (E2G) has emerged as a possibility. In the case of this biofuel, microorganisms and lignocellulosic biomass play a crucial role. Therefore, this study aimed to physiologically characterize 12 strains of the yeast *Spathaspora passalidarum* isolated from the Brazilian Amazon biome, aiming at future applications in the sugar and alcohol industry. This species has potential for the production of E2G because it is a xylose fermenter. The experiments evaluated the growth profile of the 12 strains under stress caused by ethanol (5%, 6% and 7%), sodium chloride (0.5 M, 0.75 M and 1 M), hydrogen peroxide (7 mM and 10 mM) and different glucose concentrations (2%, 18%, 20%, 25% and 30%). The stress assays were performed in YPD and YPX medium using the Growth Profiler 960 equipment (EnzyScreen). In addition, two glucose/xylose co-fermentation experiments were performed in order to identify preferred carbon sources and ethanol production yield (g/L). The results indicated that the growth profile of the strains varied according to the stress and the type of carbon source (glucose or xylose). In YPX medium (xylose), the strains showed greater resilience to ethanol stress. Under NaCl stress conditions, the reference yeast showed the highest growth at 1 M, with an OD (600 nm) of approximately 1.2. In the first cofermentation, preferential consumption of glucose was observed (depleted within 12 hours by all strains). Strain 6 demonstrated efficient consumption of xylose and produced 10.5 g/L of ethanol in 24 hours. The second cofermentation was performed with yeast NRRL Y-27907 and yeast isolate number 6, being the most successful isolate in ethanol production. Therefore, it is concluded that strain 6 of *S. passalidarum* showed better performance compared to the other isolates in the tests performed.

Keywords: Yeasts; *Spathaspora passalidarum*; Stress response; Ethanol production; Biofuels; Ethanol 2G

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
2.1 Brasil e o etanol: breve contexto histórico.....	13
2.2 Etanol de Segunda Geração (E2G).....	15
2.3 A fermentação e os microrganismos.....	20
2.4 Metabolismo e repressão de glicose em leveduras.....	23
2.5 Metabolismo de xilose em <i>S. passalidarum</i> .....	25
2.6 Inibição de crescimento por estresse osmótico, estresse oxidativo e presença de etanol. 27	
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1 Microrganismos e meio de cultivo.....	29
4.2 Ensaio de estresse utilizando o equipamento Growth Profiler.....	29
4.2.1 Pré inóculo.....	30
4.2.2 Avaliação do uso de fontes de carbono.....	30
4.2.3 Meios de cultivo estressantes.....	30
4.2.4 Montagem da microplaca.....	32
4.2.5 Inoculação e configurações no equipamento.....	33
4.2.6 Curva de calibração (GV X OD).....	34
4.3 Cofermentação.....	34
4.4 HPLC.....	35
4.7 Análises estatísticas.....	35
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Ensaio de estresse realizados no Growth Profiler 960.....</b>	<b>36</b>
5.1.1 Perfil de crescimento das linhagens de <i>S. passalidarum</i> em diferentes concentrações de etanol em meio YPD e YPX.....	36
5.1.2 Perfil de crescimento das linhagens de <i>S. passalidarum</i> em diferentes concentrações de NaCl em meio YPD e YPX.....	39
5.1.3 Perfil de crescimento das linhagens de <i>S. passalidarum</i> em diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em meio YPD e YPX.....	44
5.1.4 Perfil de crescimento das linhagens de <i>S. passalidarum</i> em diferentes concentrações de glicose em meio YPD.....	46
<b>5.2 Co-fermentações.....</b>	<b>49</b>
5.2.1 Co-fermentação: análise do consumo de glicose e xilose x produção de etanol.....	49
5.2.2 Co-fermentação: análise consumo de glicose e xilose x Produção de Etanol das leveduras 6 e Tipo.....	52
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>54</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, as culturas de cana de açúcar para biocombustíveis líquidos, como o etanol de primeira geração (E1G), podem impactar corpos d'água e camadas de solo. Além disso, um fato complicador é a alta demanda por água para irrigação. Isso pode reduzir a disponibilidade de água para irrigar culturas alimentares, atender ao consumo humano e a demanda industrial e a geração de energia (BELLEZONI et al., 2018; ROSSETTO et al., 2022). Apesar dos inúmeros benefícios dos biocombustíveis em relação aos fósseis convencionais, principalmente no que tange a emissão de carbono, as cadeias de produção dos biocombustíveis de primeira geração, podem afetar os sistemas alimentares, fundiários, hídricos e energéticos (NAMANY et al., 2019; MAHJOUB & SAHEBI, 2020; ABDALI et al., 2021).

O crescente interesse pelo etanol 2G está diretamente relacionado à necessidade urgente de enfrentar questões ambientais. De acordo com o Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), esse biocombustível pode reduzir em até 90% as emissões de CO<sub>2</sub> em comparação com a gasolina, tornando-se uma alternativa amplamente aceita no mercado internacional (BNDES, 2016). Enquanto o etanol de primeira geração é produzido a partir do caldo da cana, o E2G pode ser produzido a partir de resíduos agrícolas que seriam descartados compostas por uma biomassa lignocelulósica. Para atender a essa crescente demanda, torna-se fundamental investir em processos que viabilizem a utilização dessa biomassa, além de aprofundar pesquisas sobre microrganismos com potencial industrial.

A bioprospeção, originalmente definida pela Medida Provisória 2186-16/2001, refere-se à "atividade exploratória que visa identificar componentes do patrimônio genético e informações sobre conhecimento tradicional associado com potencial de uso comercial" (BRASIL, 2001). Atualmente, o conceito foi ampliado e refere-se à busca por compostos, moléculas, microrganismos e enzimas com aplicação em diversas áreas, como saúde, indústria e comércio. Além de contribuir para a ampliação do conhecimento sobre a biodiversidade ainda inexplorada, esses estudos buscam desenvolver produtos e processos de elevado valor comercial. Nesse contexto, as leveduras emergem como organismos promissores, dada sua versatilidade biotecnológica.

As leveduras são fungos unicelulares com tamanhos e formas variados, amplamente utilizados em processos fermentativos aplicados às mais diversas áreas da indústria. Um exemplo significativo é a produção de etanol de segunda geração (2G), biocombustível obtido a partir de resíduos agrícolas e industriais. A viabilidade do etanol lignocelulósico, como também é conhecido, depende do aproveitamento eficiente da fração hemicelulósica da biomassa, composta principalmente pela pentose xilose (MACHADO, 2015). Nesse cenário, a levedura *Spathaspora passalidarum*, microrganismo central deste estudo, destaca-se por sua capacidade de consumir, fermentar e converter xilose em etanol, tornando-se uma forte candidata para aplicações na indústria sucroalcooleira.

Embora eficiente na fermentação de xilose, *S. passalidarum* apresenta baixa tolerância ao etanol, limitando seu potencial industrial. Estudos recentes indicam que essa levedura não produz concentrações superiores a 4% de etanol, possivelmente devido ao efeito inibitório do próprio composto sobre seu crescimento (CAMPOS et al., 2022). Durante o processo industrial, os microrganismos se tornam suscetíveis a diversos tipos de estresse, não somente aquele ocasionado pelo acúmulo do etanol. É comum que ocorra o estresse osmótico e oxidativo, ocasionado pela alta concentração de açúcares e sais. Tendo em vista o contexto industrial, para além da avaliação utilizando três diferentes concentrações de etanol, o presente trabalho testou três concentrações de cloreto de sódio (NaCl), duas concentrações de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e cinco concentrações de glicose. A avaliação do crescimento perante o estresse osmótico e oxidativo ocasionado pelas substâncias acima permitiu analisar qual será o comportamento da levedura mediante a mais essa etapa de produção. Diante desse desafio, o presente projeto busca caracterizar fisiologicamente diferentes linhagens isoladas da Amazônia brasileira, a fim de identificar microrganismos mais promissores para aplicações industriais e outras inovações biotecnológicas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Brasil e o etanol: breve contexto histórico

A história entre Brasil e a cana-de-açúcar é antiga. Mesmo após mais de 500 anos de cultivo, seu papel segue relevante em diferentes aspectos da economia brasileira, inclusive na tentativa de diversificar o uso de combustíveis em busca da menor dependência de petróleo. Tal possibilidade tomou forma a partir do Programa Nacional do Álcool, comumente chamado de Pró Álcool, lançado em 1975 (DE ANDRADE, 2009). A primeira fase do projeto acompanha a crise internacional do petróleo na década de 70, cujo impacto foi grandioso no Brasil, visto que o país importava 80% de sua demanda. Nesse momento, o objetivo era desenvolver técnicas de produção de álcool anidro para uso conjunto com a gasolina. Posteriormente, na segunda fase, a produção de álcool hidratado para veículos movidos exclusivamente a álcool já era cogitada (MICHELLON, 2008).

Além da diminuição do uso de hidrocarbonetos fósseis como fonte de combustível, o Pró Álcool também tinha os seguintes objetivos: economizar divisas, interiorizar o desenvolvimento, evoluir a tecnologia nacional, proporcionar o crescimento nacional e geração de novos empregos e renda. Nota-se que o maior incentivo do programa foi garantir a segurança energética do país e seu desenvolvimento, não a questão ambiental. Tais objetivos são reflexos do contexto político no qual o Brasil estava inserido no momento. O programa foi criado durante a ditadura militar e não havia políticas ambientais implementadas, além do grande foco na interiorização do país.

Um marco importante ocorreu: a constituição de 1988. No capítulo VI, o artigo 225 garante que todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, sendo este um bem comum que deve ser zelado pelo Poder Público e toda população (STF, 2024). Essa foi a primeira constituição brasileira a abordar a temática ambiental. Mesmo assim, nesse momento histórico, o Pró Álcool recebia poucos incentivos do governo mesmo que a demanda pelo álcool e a produção de carros movidos a ele continuasse crescendo (MICHELLON, 2008).

Logo após, na década de 90 e o retorno da democracia, a palavra “sustentável” começou a ser empregada ao etanol pela sua capacidade de reduzir a emissão de gases de efeito estufa em comparação com a gasolina. Esse fato, juntamente com a conscientização global proporcionada pelo Protocolo de Kyoto em

1997, possibilitou a nova ascensão do projeto Pró Álcool em sua quarta e atual fase. Além disso, a popularização dos carros *flex* pressionou o Brasil a atender às crescentes demandas pelo álcool.

Apesar de parecer milagroso, o uso do etanol possui um grande entrave: o desmatamento. Tal ponto entra em contradição com a proposta mais sustentável de incentivo ao uso do biocombustível. Segundo Silva e Miziara (2011), os produtores de cana-de-açúcar argumentam utilizar áreas degradadas para o plantio da cultura para que não haja implicações a vegetação nativa principalmente do cerrado, mas mesmo assim há aumento dos níveis de desmatamento na região (SILVA; MIZIARA, 2011). Para que haja um aumento significativo da produção de etanol sem comprometer a área de vegetação através do aumento da área de plantio, são necessárias estratégias de utilização dos resíduos de biomassa para a produção do mesmo.

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, estando atrás apenas dos EUA. Recentemente, nosso país alcançou a maior produção de etanol da história: 35,6 bilhões de litros na safra de 2019/2020 (BRASIL, 2020). O Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), por meio da Resolução CNPE nº 07, de 20 de abril de 2021, instituiu o Programa Combustível do Futuro e criou o Comitê Técnico Combustível do Futuro (CT-CF). Como o Brasil possui boas, longas e bem-sucedidas experiências com etanol e biodiesel, o Combustível do Futuro visou ampliar mais o uso de combustíveis sustentáveis e de baixa intensidade de carbono (BRASIL, 2021). Portanto, há necessidade de resolução dos gargalos de produção para que os acordos e metas estabelecidos sejam alcançados e as leveduras podem ser aliadas desse processo.

## 2.2 Etanol de Segunda Geração (E2G)

Dentre as possíveis estratégias para manter a sustentabilidade no contexto energético e industrial, há o etanol de segunda geração, cuja sigla é E2G. Enquanto o etanol de primeira geração é produzido a partir do caldo da cana, o E2G pode ser produzido a partir de resíduos descartados da produção citada anteriormente e outros resíduos agroindustriais. Isso permite ampliar os ciclos produtivos das culturas agrícolas, o que faz com que esse biocombustível amplie em até 250% a capacidade produtiva por hectare quando comparado com a produção do etanol de primeira geração (PROPEQ, 2020).

As matérias primas para a produção do bioetanol são classificadas em três categorias: matérias-primas contendo sacarose (por exemplo, cana-de-açúcar, beterraba sacarina, sorgo doce e frutas), matérias amiláceas (por exemplo, milho, trigo, arroz, batata, mandioca, batata-doce e cevada) e materiais lignocelulósicos (por exemplo, madeira, palha e gramíneas). A escolha da matéria prima envolve uma série de pré-requisitos a serem avaliados além da composição química. Dentre os critérios, tem-se a disponibilidade de terra e práticas de uso, uso de recursos, emissão de gases de efeito estufa, disponibilidade de água e contribuição às perdas de biodiversidade e de valor paisagístico (BALAT, 2011).

Os materiais lignocelulósicos, foco de interesse na produção de E2G, são compostos por celulose (polímero de carboidrato homopolissacarídeo), hemicelulose (polímero de carboidrato heteropolissacarídeo) e lignina (estrutura aromática) (SANTIAGO; RODRIGUES, 2017). A composição química da biomassa, geralmente contém 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos (DE QUEIROZ, 2012), mas é possível observar na tabela 1 que esse valor pode ser variável. A figura 1 mostra a estrutura da parede celular da biomassa lignocelulósica. Observa-se que a constituição baseia-se em fibras de celulose envoltas por lignina, formando uma barreira natural contra a atividade de microrganismos. O E2G é obtido através da quebra desses polissacarídeos para que açúcares mais simples sejam liberados e utilizados na fabricação do etanol.

Tabela 1. Composição química de biomassas lignocelulósicas (adaptado de Queiroz, 2012)

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

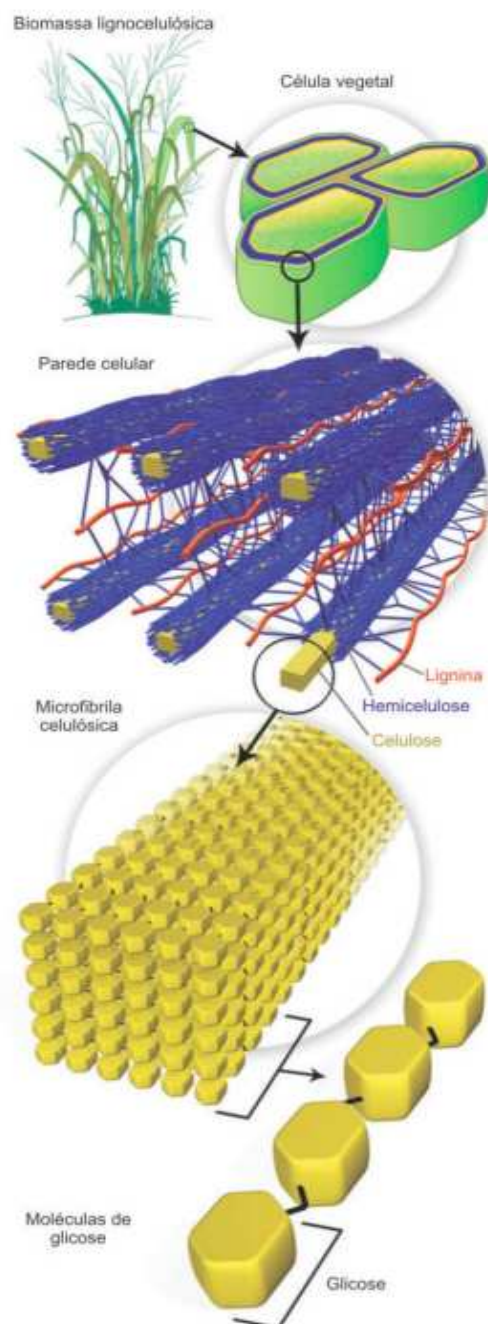


Fig.1. Representação esquemática da biomassa lignocelulósica (adaptado de Queiroz, 2012)

A produção de etanol de segunda geração é realizada em cinco etapas principais (Figura 2): pré-tratamento da biomassa, hidrólise da celulose, fermentação, separação do etanol e tratamento de efluentes (ALBARELLI, 2013).

O pré-tratamento é a primeira etapa no uso de material lignocelulósico por romper a estrutura de hemicelulose ( $C_5H_8O_4$ )<sub>m</sub>, lignina ( $C_9H_{10}O_3(OCH_3)$ )<sub>n</sub> e celulose ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>x</sub>, tornando esses polissacarídeos mais acessíveis para melhores rendimentos de obtenção dos açúcares. Existem diversas possibilidades para essa etapa de acordo com o material lignocelulósico a ser utilizado.

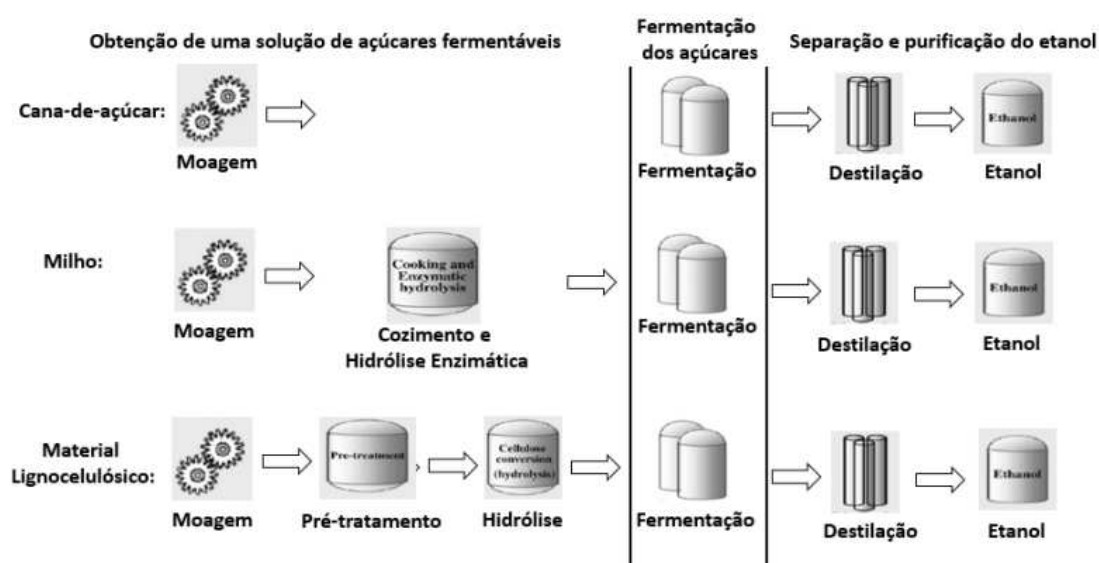


Fig.2. Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, milho e material lignocelulósico (MARTINS, 2018)

Para ser considerado efetivo, um pré-tratamento deve obedecer a uma série de características, tais como, resultar em uma elevada recuperação de todos os carboidratos; resultar em uma elevada digestibilidade da celulose na hidrólise enzimática subsequente; resultar em uma elevada concentração de sólidos, além de uma elevada concentração de açúcares livres na fração líquida; requerer uma baixa demanda energética; evitar a formação de subprodutos; requer baixo investimento e custo operacional (DE QUEIROZ, 2012). A figura 3 representa as alterações estruturais essenciais na parede celular por conta do pré-tratamento. É possível perceber a separação seletiva dos componentes da biomassa.

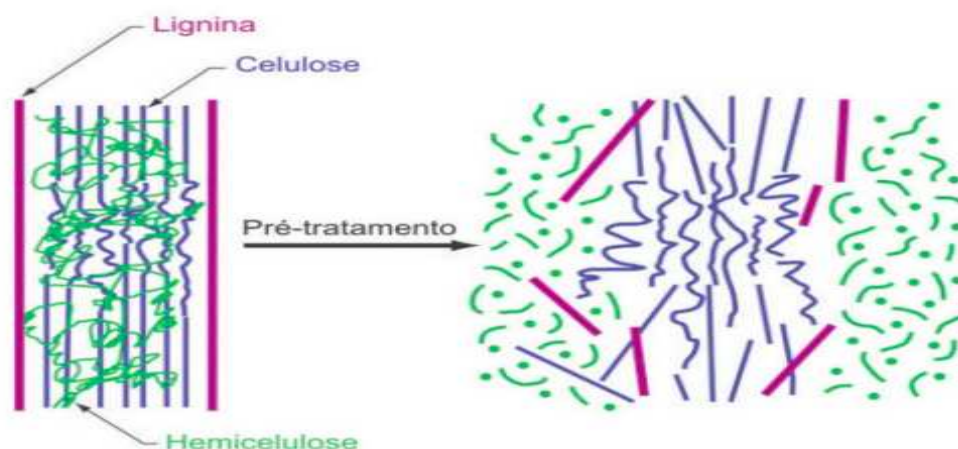


Fig.3. Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento (adaptado de De Queiroz, 2012).

Seguindo o esquema da figura 2, o próximo passo é a hidrólise. Nessa etapa, a celulose é convertida em glicose em um processo espontâneo em água pura. Entretanto, a conversão é extremamente lenta (ALBARELLI, 2013). Para obter açúcares a partir da celulose em menos tempo, é possível utilizar estratégias como a hidrólise ácida e hidrólise enzimática. A hidrólise ácida pode ser feita com ácido diluído ou concentrado em diferentes temperaturas, mas ambas as opções possuem grandes desvantagens, como formação de inibidores para a fermentação microbiana, custo de equipamentos elevado, as instalações representam elevados riscos à integridade do processo e a operação gera efluentes tóxicos (ALBARELLI, 2013). A vantagem da hidrólise enzimática é justamente não produzir tais inibidores. As celulasas, enzimas comuns nesse processo sintetizadas por fungos e bactérias naturalmente, trabalham para degradar a celulose e outros polissacarídeos na biomassa (FERREIRA, 2015) e isso propicia a utilização mais eficiente dos carboidratos devido a alta especificidade das mesmas (ZÚÑIGA, 2010). A hidrólise da celulose gera glicose e celobiose (dímero de glicose), enquanto a hidrólise da hemicelulose gera D-xilose, arabinose e glicose.

### 2.3 A fermentação e os microrganismos

Após a hidrólise, o passo seguinte é a fermentação. Nessa etapa, tem-se uma solução rica em açúcares que serão convertidos em etanol e outros subprodutos através da fermentação. No contexto industrial, a produção em larga escala de etanol geralmente utiliza a levedura *S. cerevisiae*. Esse microrganismo realiza um processo anaeróbico no qual grande parte dos açúcares são convertidos em etanol e CO<sub>2</sub>. Apesar de ser amplamente utilizada pela sua capacidade de resistir ao processo industrial, essa levedura não é capaz de fermentar pentoses de forma natural, ou seja, não são capazes de metabolizar pentoses presentes e liberadas a partir da hemicelulose.

Atualmente, há a possibilidade de desenvolver Organismos Geneticamente Modificados (OGM), mais competentes e resistentes ao processo industrial. Já existem diversos estudos publicados utilizando *S. cerevisiae* geneticamente modificada para fermentação de pentoses (Vera Novy, 2013; Bärbel Hahn-Hägerdal, 2007; Ritva Verho, 2007; Jeroen Nijland, 2020; Steve Helle, 2004; William Hohenschuh, 2021; TW Jeffries, 2003; Thorsten Subtil & Eckhard Boles, 2011; Byron Chu, 2007; Shalley Sharma, 2018). Apesar de parecer a solução do gargalo em relação ao metabolismo de pentoses por *S. cerevisiae*, conforme revisado por Bärbel Hahn-Hägerdal (2007), mesmo com muitas tentativas de otimizar os fluxos da via metabólica da xilose, vários problemas fisiológicos permanecem que impedem que a xilose seja fermentada tão eficientemente quanto a glicose nesta espécie. A principal razão é que ela não possui um sistema de transporte de xilose eficiente e específico, o que dificulta a absorção do metabólito e o fluxo metabólico subsequente da célula (GEIJER, 2020).

Para além das intrínsecas dificuldades fisiológicas, os OGMs estão sujeitos a fortes e rígidas legislações que podem atrasar a utilização destes microrganismos. Em 1996, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBIO) foi criada no Brasil e, atualmente, seu principal papel está vinculado à fiscalização dos OGMs. Este grupo de pesquisadores das mais diversas áreas do conhecimento avalia cada produto geneticamente modificado, considerando possíveis impactos ao meio ambiente, à saúde humana e animal, e à agricultura. Para além deste órgão fiscalizador, tem-se a Lei Brasileira de Biossegurança (11.105/05), cujo Art. 1º estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a

exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de organismos geneticamente modificados (BRASIL, 2005). Portanto, por mais que possua grande potencial, os OGMs podem ser facilmente embargados por questões jurídicas, financeiras e ambientais.

Por conta disso, outros microrganismos estão sendo visados e estudados para serem aplicados na indústria através da bioprospecção, como a levedura *S. passalidarum*, por serem naturalmente fermentadoras de xilose. A levedura *Spathaspora passalidarum* linhagem NRRLY 27907 foi isolada a partir do intestino de besouros que se alimentam de madeira (NGUYEN ET AL., 2006). Diversos estudos já demonstraram que essa linhagem possui bons rendimentos de conversão a etanol em meio sintético (Hou, 2012; Long et al., 2012; Yi-Kai Su et. al., 2015; Cadete et al., 2016).

A xilose é classificada como um monossacarídeo do tipo aldopentose cuja fórmula química é  $C_5H_{10}O_5$ , facilmente identificável na estrutura da hemicelulose representada pela figura 4. Antes de 1981, pensava-se que a xilose não era um composto fermentável pelas leveduras e precisava passar por um processo de dois estágios para que pudesse ser convertida em etanol. Esse cenário mudou a partir da 1982 com descoberta de leveduras fermentadoras de pentoses (HARNER ET AL, 2015). Reconheceu-se a necessidade de uma conversão bem sucedida e completa de todos os açúcares em potencial através de microrganismos como um fator decisivo para a viabilidade econômica do processo (CADETE, 2012).

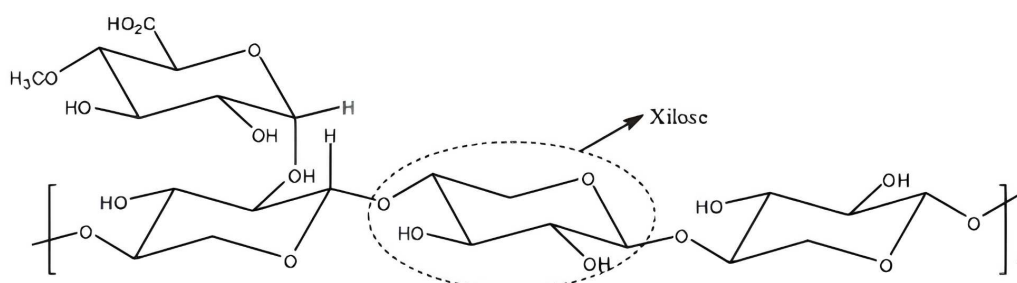


Fig. 4. Representação esquemática da hemicelulose com destaque para a identificação da xilose em sua estrutura (DE QUEIROZ, 2012)

Mesmo que a *S. passalidarum* seja muito eficiente na conversão de xilose a etanol, existem gargalos importantes na cadeia produtiva. Leveduras eficientes na

conversão de xilose em meios definidos geralmente não apresentam bons desempenhos em hidrolisados de biomassa pré-tratados ou em licores residuais de materiais lignocelulósicos.

Um problema central é a presença de hexoses, como a glicose e a manose, que geram competição com as pentoses e inibem a utilização da xilose. De forma geral, a fermentação da xilose em uma mistura que a glicose esteja presente não ocorre de forma eficiente. Isto pode ocorrer porque a fermentação da glicose precede a da xilose e as leveduras fermentadoras da pentose geralmente não são suficientemente tolerantes ao etanol para completar o segundo processo (HARNER ET AL, 2015).

Mesmo em baixas concentrações, o etanol atua como inibidor do crescimento de leveduras, podendo impedir a divisão celular e, em concentrações mais elevadas, comprometer a viabilidade celular. (BIRCH & WALKER, 2000). Dessa forma, para que o potencial biotecnológico das leveduras seja satisfatoriamente aproveitado na indústria, é necessário intensificar os estudos e testes com linhagens obtidas por bioprospecção, visando identificar e caracterizar microrganismos capazes de tolerar maiores concentrações de etanol e temperaturas elevadas, além de contribuir para o enriquecimento da literatura sobre o tema.

## 2.4 Metabolismo e repressão de glicose em leveduras

O metabolismo de glicose envolve uma cascata de reações enzimáticas cujo mecanismo de ação varia entre ativação e repressão do mesmo. A variação do metabolismo desta fonte de carbono acontece entre leveduras ditas convencionais e as não convencionais (também chamadas de não *Saccharomyces* ou NYC).

O transporte de glicose para o interior das células é o primeiro passo para a via de assimilação. Esse transporte varia entre as ditas leveduras convencionais e NYC. A revisão bibliográfica publicada por Carmen-Lisset Flores et. al (2000) aborda o metabolismo de carboidratos e produção de energia em NYC pertencentes a cinco diferentes gêneros e suas diferenças em relação *S. cerevisiae*. Foram estudados os gêneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Yarrowia* e *Schizosaccharomyces*. No quesito transporte de glicose, em *S. cerevisiae* ocorre um processo de difusão facilitada assim como ocorre em *K. lactis*. Em *Candida utilis*, porém, a glicose parece ser transportada por um simporte de prótons quando o organismo é cultivado em baixa concentração de glicose e a difusão facilitada aparece em altas concentrações desse composto. Um sistema de transporte de glicose com dois componentes com  $K_m$  3 e 10 mM respectivamente, foi encontrado em *Y. lipolytica*. Esses componentes estavam presentes com a mesma atividade independentemente da concentração de glicose no meio (DOES & BISSON, 1989).

Inicialmente, ao tratarmos de leveduras ditas convencionas como a *S. cerevisiae*, é possível afirmar que a mesma possui preferência por glicose como fonte de carbono. O transporte através da membrana é realizado por transportadores específicos chamados de permeases. A transcrição dos genes que codificam esses transportadores é finamente regulada pela concentração de glicose do meio, sendo este o fator chave para a cascata sensorial realizada pela célula durante as vias de assimilação e metabolismo (FLORES, 2000).

A detecção dos níveis de glicose extracelular e metabolizada é importante para a coordenação do metabolismo dessa molécula (KAYIKCI, 2015). A figura 5 exemplifica, de acordo com a concentração de glicose, quais são as vias e as enzimas envolvidas nessa regulação. Através da via de sinalização Snf3/Rgt2, a célula detecta níveis de glicose extracelular e é capaz de usá-los para regular a captação de glicose. A sinalização da proteína quinase Snf1 é central para a funcionalidade da repressão da glicose e para equilibrar os níveis de energia celular (KAYIKCI, 2015).

A quinase Snf1 possui dupla atuação: a mesma pode atuar como ativadora ou repressora. O que regula o seu comportamento são as concentrações de glicose detectadas no meio externo. As altas concentrações dessa fonte de carbono tornam a Snf1 inativa, mantendo o fator de transcrição Mig1 não fosforilado e, portanto, presente no núcleo, onde exerce repressão, juntamente com o complexo Ssn6/Tup1, de genes envolvidos na utilização de fontes alternativas de carbono (GANCEDO 1998 ; HEDBACK E CARLSON, 2008). Em baixos níveis de glicose, o Snf1 fica ativo e fosforila o Mig1, permitindo a liberação da repressão à glicose e a expressão de genes reprimidos por glicose.

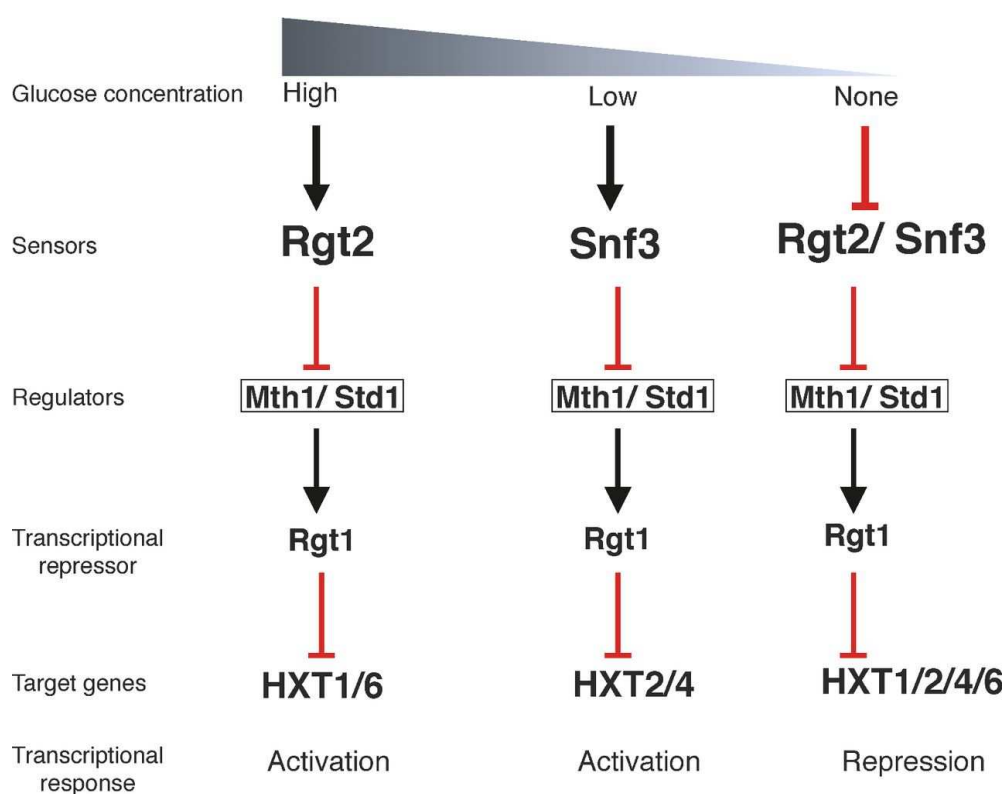


Fig. 5. Via de detecção de glicose Snf3/Rgt2. A via de detecção de glicose Snf3/Rgt2 determina os níveis de expressão dos genes transportadores de hexose (HXT) para a absorção ideal de glicose em várias concentrações (KAYIKCI, 2015).

Um ponto em comum no metabolismo das leveduras, independente dessa classificação, é a conversão de glicose 6-fosfato ou frutose 6-fosfato em piruvato. Dependendo da espécie e das condições de cultivo a serem subtidas, o destino metabólico do piruvato pode variar.

Em *S. cerevisiae*, a glicose causa um forte comprometimento na capacidade respiratória chamado de efeito Crabtree (RH, 1966). Isso significa que, mesmo na presença de ar, *S. cerevisiae* fermenta açúcar e por isso é chamada de Crabtree positiva, assim como outras leveduras que se comportam da mesma maneira (FLORES, 2000). Em contra partida, considerando a levedura de interesse do trabalho, Hou (2012) realizou experimentos comparando as leveduras *S. stipits* e *S. passalidarum* e observou melhores resultados em condição de anaerobiose para *S. passalidarum*. Ainda neste mesmo estudo, foi observado que, em condição de maior disponibilidade de oxigênio, *S. passalidarum* consumiu a mesma quantidade de carboidratos em menos tempo, porém o excesso de oxigênio causou o desvio do metabolismo para o crescimento celular e isso diminuiu os rendimentos em etanol, o que é característica de um microrganismo Crabtree negativo (BONAN, 2018).

## **2.5 Metabolismo de xilose em *S. passalidarum***

A xilose presente no meio externo pode adentrar a célula através de dois sistemas de transporte. Um dos sistemas baseia-se na difusão facilitada de baixa afinidade que é impulsionado apenas pelo gradiente de açúcar. Esse sistema é compartilhado com a glicose. O outro é o sistema de simporte de prótons de alta afinidade (Hahn-Hägerdal, et al., 2007; Kilian & Uden, 1988; Hamacher, et al., 2002; Chu & Lee, 2007; Young et al., 2010). Após ser transportada do meio externo para o citosol, a xilose pode ser metabolizada através da via de assimilação.

Através da figura 6, é possível ver as sequências de reações pertencentes ao metabolismo fermentativo de xilose de maneira simplificada. A primeira reação é a redução de xilose a xilitol catalisada pela enzima xilose redutase (XR). Logo após, a oxidação do xilitol à xilulose é catalisada pela enzima xilitol desidrogenase (XDH). Por fim, ocorre a fosforilação da xilulose pela enzima xiluloquinase (XK) para formar xilulose-5-fosfato. A xilulose-5-fosfato pode ser convertida, através da via das pentoses-fosfato, em gliceraldeído-3-fosfato ou frutose-6-fosfato.

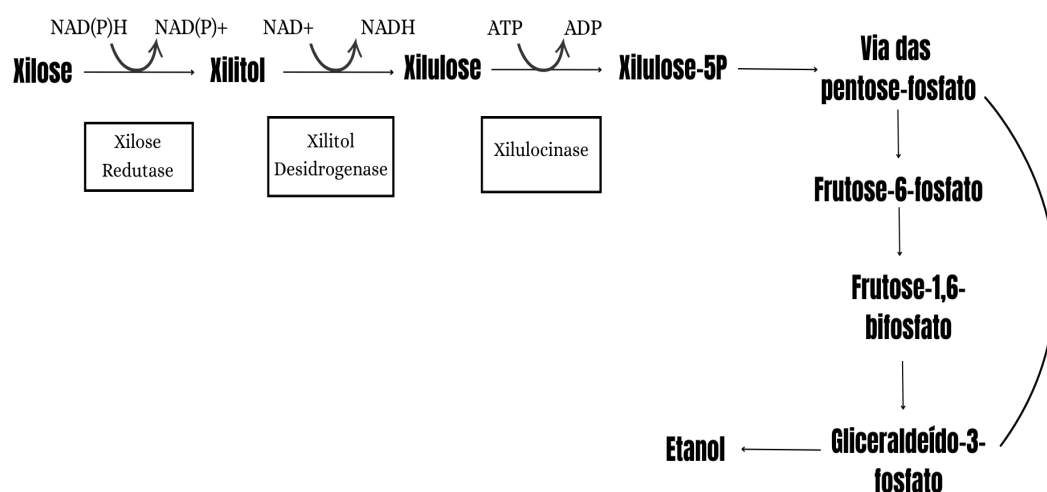


Fig. 6. Esquema simplificado do metabolismo de xilose.

A eficiência na conversão de xilose em etanol está possivelmente relacionada a existência de um equilíbrio redox entre a oferta e demanda de cofatores através das enzimas XR e XDH na via de assimilação de xilose (Cadete et al., 2016; Hou, 2012). Este fato não é observado em outras leveduras e contribui para maior eficiência de fermentação. Para além disso, *S. passalidarum* é a única levedura fermentadora de xilose descrita até o momento que apresenta dois genes que codificam a enzima xilose redutase (XYL 1.1 e XYL 1.2) (RIBEIRO, 2017).

Estudos realizados por Ribeiro et.al, (2017) trouxeram como principais resultados a inibição do consumo de xilose na presença de glicose independente da condição de oxigenação. Os genes que codificam as enzimas xilose redutase (XR), xilose desidrogenase (XDH) e xiluloquinase (XK) foram menos expressos quando a glicose fazia parte do meio, indicando a ocorrência de repressão por glicose no metabolismo de xilose. Portanto, é possível que a interferência da glicose no metabolismo da xilose de *S. passalidarum* possa estar ocorrendo a nível de transporte (RIBEIRO, 2017). Também foi observado uma repressão significativa da atividade enzimática das enzimas XR e XDH na presença de glicose, sugerindo que a glicose pode causar um sinal de repressão na expressão induzida por xilose dos genes que codificam as enzimas XR e XDH (Hou, 2012).

## 2.6 Inibição de crescimento por estresse osmótico, estresse oxidativo e presença de etanol

O desempenho fermentativo da *S. passalidarum* pode ser afetado pela presença de glicose, como descrito previamente, inibidores provenientes do pré-tratamento e graças a sua baixa tolerância ao próprio etanol. A princípio, a respeito do etanol, sua principal característica é de se instalar no meio da bicamada fosfolipídica através da parte hidrofóbica e se aloja nos espaços que resultam das interações entre ácidos graxos insaturados e proteínas. (DE GÓES-FAVONI, 2018). Isto leva a um decréscimo na fluidez da membrana, visto que há comprometimento do movimento natural dos ácidos graxos na cadeia.

O resultado é a alteração do posicionamento das proteínas na bicamada fosfolipídica, que afeta negativamente a capacidade da levedura em preservar o gradiente de concentração de compostos variados através da membrana citoplasmática (DE GÓES-FAVONI, 2018). Por conta disso, a busca é intensificada por microrganismos mais tolerantes ao etanol para suportarem a alta concentração do mesmo durante o processo produtivo.

Além do comprometimento celular gerado pela toxicidade do etanol, os microrganismos podem ser afetados por componentes secundários oriundos do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. De acordo com uma série de estudos realizados a cerca da inibição em processos produtivos, (Palmqvist E, Hahn-Hagerdal, 2004), (Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK, 2004), (Almeida JRM, 2007), os inibidores mais comumente encontrados em hidrolisados lignocelulósicos são ácidos fracos, derivados de furano e compostos fenólicos, porém os sais também devem ser considerados graças aos seus efeitos negativos sobre os microrganismos. Esses sais podem se originar tanto da própria biomassa quanto de produtos químicos adicionados durante o processamento da biomassa em açúcares fermentáveis (SANCHEZ, 2008). Tais produtos químicos dão origem a íons que se tornam material disponível no meio e passam a influenciar no metabolismo celular. Os cátions que podem ser esperados em meios de fermentação incluem  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{K}^+$  e os ânions associados incluem  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^-$ .

Foi demonstrado que esses íons têm um efeito inibitório significativo sobre microrganismos. Eles reduzem o crescimento celular, as taxas de utilização de açúcar

e as taxas de produtividade do etanol, ao mesmo tempo em que aumentam os rendimentos do etanol e os subprodutos da fermentação, como o glicerol (WEI CJ, 1982). A presença de NaCl no meio reduz a atividade de água causando um aumento na perda de água das células microbianas para o meio, promovendo plasmólise nas células, aumentando bruscamente a concentração de aminoácidos (Eliasson A, 2000). Estudos realizados por Casey em 2013 com *S. cerevisiae* demonstraram queda de mais de 60% no consumo de xilose em comparação com o controle quando os sais estavam presentes em uma concentração de 0,5 M. Portanto, é possível dizer que as células das leveduras são constantemente expostas ao estresse osmótico e isso reflete negativamente em sua participação na fermentação dos açúcares, etapa essencial da produção.

Em contrapartida, o estresse oxidativo está presente graças a exposição contínua ao oxigênio, já que o mesmo é essencial para o processo fermentativo e síntese de ácidos graxos e esteróis. Seu poder oxidante produz compostos citotóxicos chamados espécies reativas de oxigênio (ROS). Várias ROS são espécies instáveis de oxigênio contendo elétrons desemparelhados, os chamados radicais livres. As ROS se formam in vivo principalmente na fosforilação oxidativa durante a respiração mitocondrial e, quando seus níveis sobrecarregam as defesas celulares, o estresse oxidativo causa danos generalizados à maioria das macromoléculas (lipídios, proteínas e DNA) (SPENCER J.,2014).

Estudos realizados por Spencer, J., Phister, TG, Smart, KA *et al.*, em 2014 abordaram a tolerância de leveduras que utilizam pentoses ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio. Os pesquisadores submeteram culturas de *P. guilliermondii*, *S. stipitis*, *C. succiphila* e *C. shehatae* a diferentes concentrações de peróxido e, em YPD, todas as leveduras foram inibidas a 5 mM de peróxido de hidrogênio. Atualmente, não foram encontrados estudos específicos que envolvam este inibidor de crescimento e a *S. passalidarum*, mas espera-se o mesmo nível de inibição de outras fermentadores de pentoses. Portanto, o peróxido de hidrogênio precisa ser avaliado profundamente, tendo em vista sua abundante presença e fortes impactos que podem ser prejudiciais a conversão do açúcar.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar fisiologicamente 12 linhagens de *Spathaspora passalidarum* quanto a resposta a estresses e produção de etanol.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Verificar a influência de diferentes concentrações de etanol, peróxido de hidrogênio e cloreto de sódio no crescimento de 12 linhagens prospectadas;

Comparar dados de crescimento e tolerância entre os microrganismos prospectados e o microrganismo controle;

Realizar co-fermentações a fim de avaliar a preferência perante duas fontes de carbono e avaliar o rendimento de produção de etanol.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos e meio de cultivo

O microrganismo referência utilizado neste trabalho foi a levedura *Spathaspora passalidarum*, cedida pelo professor Carlos Augusto Rosa (Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras) da Universidade Federal de Minas Gerais. As linhagens utilizadas foram a NRRL Y-27907 e doze linhagens isoladas do bioma amazônico brasileiro. Os estoques foram feitos em duplicatas e mantidos em meio completo YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) com glicerol 30% 0,1 (v/v) a -80 °C. Para uso diário das colônias nos testes, foram mantidas em placas de YPD sólido (2 % Agar) a 4 °C.

### 4.2 Ensaio de estresse utilizando o equipamento Growth Profiler

Os experimentos de avaliação de resposta ao estresse foram realizados no aparelho Growth Profiler 960 (Enzyscreen) em parceria com o Laboratório de Engenharia Metabólica e de Bioprocessos (LEMeB) na Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e seus colaboradores. Este equipamento possui um sistema de câmera integrado responsável por auxiliar a monitorar e registrar o crescimento de microrganismos em microplacas de 96 poços através da captura de imagens em alta resolução das placas e de cada poço. A densidade da cultura foi analisada indiretamente pela quantidade de luz espalhada pelas células no meio. O objetivo foi avaliar o crescimento das linhagens de *S. passalidarum* sob estresse induzido por etanol, osmótico e oxidativo. Para esses ensaios, foram utilizadas as linhagens de leveduras indicadas como 3, 4, 5, 6 e 7 e a levedura de referência.

#### 4.2.1 Pré inóculo

O pré-inóculo foi preparado em meios YPD e YPX, em tubos Falcon contendo 25 mL de meio de cultivo, inoculados com as respectivas leveduras e com um controle negativo. As amostras foram incubadas por 18h em agitador tipo shaker, a 30 °C e 150 rpm. Após esse período, alíquotas de 200 µL foram retiradas para avaliação da densidade óptica em espectrofotômetro a 600 nm, e 1,2 mL foram coletados, armazenados em tubos Eppendorf e centrifugados. O sobrenadante foi

descartado e o precipitado formado foi ressuspenso nos mesmos meios de cultivo, para iniciar o experimento com densidade óptica (600 nm) ajustada para 0,1.

#### 4.2.2 Avaliação do uso de fontes de carbono

As fontes de carbono avaliadas foram xilose e glicose. Os meios líquidos de cultivo utilizados foram YPX (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% xilose) e YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose).

#### 4.2.3 Meios de cultivo estressantes

Os valores das concentrações utilizadas para cada fator estressante baseiam-se em trabalhos prévios realizados pelo grupo de pesquisa (Lilian Ribeiro, 2017; Alex Castro, 2019; Valquíria Campos, 2022; Fernanda Albuini, 2023). Foram selecionados valores previamente conhecidos como limitantes de crescimento e adicionadas novas concentrações para obter diferentes resultados. As tabelas 2, 3 e 4 explicitam a composição final de todos meios líquidos utilizados.

**Tabela 2. Composição dos meios de ensaio de etanol**

<b>Concentração</b>	<b>Composição final</b>
5% (v/v)	YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) + 5% EtOh YPX (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% xilose) + 5% EtOh
6% (v/v)	YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) + 6% EtOh YPX (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% xilose) + 6% EtOh
7% (v/v)	YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) + 7% EtOh YPX (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% xilose) + 7% EtOh

**Tabela 3. Composição dos meios de ensaio de peróxido de oxigênio**

<b>Concentração</b>	<b>Composição final</b>
7 mM	YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) + 7 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> YPX (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% xilose) + 7 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
10 mM	YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) + 10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> YPX (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% xilose) + 10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

**Tabela 4. Composição dos meios de ensaio de cloreto de sódio (NaCl)**

<b>Concentração</b>	<b>Composição final</b>
0,5 M	YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) + 0,5 M NaCl YPX (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% xilose) + 0,5 M NaCl
0,75 M	YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) + 0,75 M NaCl YPX (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% xilose) + 0,75 M NaCl
1 M	YPD (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% glicose) + 1 M NaCl YPX (2% extrato de levedura, 1% peptona e 2% xilose) + 1 M NaCl

#### 4.2.4 Montagem da microplaca

A microplaca utilizada foi a padrão fornecida pelo fabricante do equipamento, cuja disposição divide-se em 96 poços de fundo transparente. Os poços das placas foram preenchidos com meio líquido contendo a fonte de carbono, fator estressante e a linhagem de levedura de interesse. Abaixo, tem-se um exemplo de layout utilizado para montar a microplaca (figura 7). Toda manipulação da placa foi feita de maneira asséptica em uma cabine de fluxo laminar. O volume de trabalho foi de 200  $\mu$ l para todas as placas deste trabalho, sendo 180 $\mu$ l de meio e 20 $\mu$ l de amostra. A rotação foi de 225 rpm e a temperatura de 30 °C foram mantidas.

Placa 1 - YPD

3 5% EtOH	3 5% EtOH	3 5% EtOH	4 5% EtOH	4 5% EtOH	4 5% EtOH	3 4% glicos	3 4% glicos	3 4% glicos	4 4% glicos	4 4% glicos	4 4% glicos
5 5% EtOH	5 5% EtOH	5 5% EtOH	6 5% EtOH	6 5% EtOH	6 5% EtOH	5 4% glicos	5 4% glicos	5 4% glicos	6 4% glicos	6 4% glicos	6 4% glicos
7 5% EtOH	7 5% EtOH	7 5% EtOH	t 5% EtOH	t 5% EtOH	t 5% EtOH	7 4% glicos	7 4% glicos	7 4% glicos	t 4% glicos	t 4% glicos	t 4% glicos
3 6% EtOH	3 6% EtOH	3 6% EtOH	4 6% EtOH	4 6% EtOH	4 6% EtOH	3 Ctrl YPD	3 Ctrl YPD	3 Ctrl YPD	4 Ctrl YPD	4 Ctrl YPD	4 Ctrl YPD
5 6% EtOH	5 6% EtOH	5 6% EtOH	6 6% EtOH	6 6% EtOH	6 6% EtOH	5 Ctrl YPD	5 Ctrl YPD	5 Ctrl YPD	6 Ctrl YPD	6 Ctrl YPD	6 Ctrl YPD
7 6% EtOH	7 6% EtOH	7 6% EtOH	t 6% EtOH	t 6% EtOH	t 6% EtOH	9 Ctrl YPD	9 Ctrl YPD	9 Ctrl YPD	t Ctrl YPD	t Ctrl YPD	t Ctrl YPD
3 7% EtOH	3 7% EtOH	3 7% EtOH	4 7% EtOH	4 7% EtOH	4 7% EtOH	7 7% EtOH	7 7% EtOH	7 7% EtOH	t 7% EtOH	t 7% EtOH	t 7% EtOH
5 7% EtOH	5 7% EtOH	5 7% EtOH	6 7% EtOH	6 7% EtOH	6 7% EtOH	Ctrl 5% EtOH	Ctrl 6% EtOH	Ctrl 7% EtOH	Ctrl 4% glicos	Ctrl YPD 2% g	

Fig. 7. Exemplo de layout planejado para os ensaios de estresse.

#### 4.2.5 Inoculação e configurações no equipamento

Depois de montar a placa, a mesma foi coberta por sua tampa de metal previamente esterilizada, cuja superfície possui poros que permitem que trocas gasosas sejam realizadas. As configurações de realização do experimento foram feitas no software do aparelho que se encontra em um computador à parte. Para os experimentos em questão, configurou-se a captura de imagens a cada 40 min durante 72 h, 30 °C e 225 rpm. Automaticamente, os arquivos foram gerados contendo imagens produzidas pelo aparelho e os valores correspondentes ao crescimento na unidade de medida Green Value.

#### 4.2.6 Curva de calibração (GV X OD)

As curvas de crescimento geradas pelo Growth Profiler 960 (EnzyScreen) foram baseadas na unidade de medida de crescimento Green Value. O software de análise de imagem utilizado foi GP960 Viewer (versão 1.1.1.0), indicado pelo próprio fabricante. O software analisou o número de pixels verdes em uma área definida dessas fotos, que se correlaciona com OD 600 da cultura.

A fim de obter os valores de crescimento em O.D a partir dos dados gerados pelo equipamento, é necessário elaborar uma curva de calibração. Esta curva é importante para a conversão de Green Value em O.D. Passou-se por duas fases: o experimento em bancada e a produção do gráfico na planilha fornecida pelo fabricante.

A empresa EnzyScreen, responsável pelo equipamento, forneceu uma curva de calibração padrão a partir de dados de crescimento da levedura *S. cerevisiae* e o protocolo experimental para produção da mesma. Foi elaborada uma curva de calibração específica para a *S. passalidarum* através do protocolo padrão fornecido.

Para a parte laboratorial, o início da metodologia consistiu na preparação de 10 mL da sua suspensão celular em meio com uma DO de 32. O valor de 0,5 mL desta suspensão celular foi utilizado para preparar 10 mL de suspensão celular com uma DO de 1,6 (portanto, uma diluição de 20 vezes com 9,5 mL de meio). Logo após, uma série de diluições nos poços (16 diluições, de alta DO a baixa DO) foi realizada. Por fim, foi feita uma corrida no aparelho definido para 4 ms, 250 rpm, com intervalo de 2 minutos (pelo menos 3 fotos) e os resultados foram analisados usando o software de análise de imagem.

Para a parte computacional, foram utilizados os valores encontrados no experimento descrito anteriormente e os valores gerados pelas microplacas inoculadas. Na planilha padrão, otimizou-se manualmente os valores para zero, a, b, c, d, e e f, para que a equação se ajuste aos pontos de dados. O produto final desta otimização foram três gráficos contendo as correlações entre GV X OD em diferentes faixas de valores de crescimento.

### **4.3 Cofermentação**

Para a primeira cofermentação, o pré-inóculo foi realizado com 1% (m/v) de glicose e 1% (m/v) de xilose. Para a segunda, o pré-inóculo produzido continha 2% (m/v) de glicose e 2% (m/v) de xilose. A partir do pré-inóculo, que foi produzido de acordo com o tópico 4.2.1, as células foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado formado foi ressuspensão no mesmo meio de cultivo para iniciar os ensaios com D.O(600 nm) correspondente a 0,1.

Os ensaios de cofermentação foram realizados em Erlenmeyers contendo 32 mL de meio YPD + 1% (m/v) de xilose na primeira e YPD + 2% (m/v) de xilose na segunda, devidamente vedados com tampão de algodão estéril. Os mesmos foram incubados em Shaker a temperatura de 30°C sob agitação de 150 rpm durante 48h. Cada ensaio foi realizado em triplicata. Nos intervalos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 e 48 h, alíquotas de 200 µL foram retiradas para avaliar a densidade óptica em espectrofotômetro a 600 nm e 800 µL foram coletados e armazenados a -20°C a fim de passar pela quantificação de substratos e produtos para “High performance liquid chromatography” (HPLC).

### **4.4 HPLC**

As amostras retiradas durante os ensaios de cofermentação para quantificação do consumo de açúcares (xilose e glicose) e produção de etanol foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min, e o sobrenadante foi filtrado em membrana de poro de 0,22 µm. As concentrações destes metabólitos foram determinadas por HPLC, utilizando uma coluna de troca iônica HPX-87H (BIO-RAD), mantida a 45 °C, acoplada ao detector de índice de refração RID-10A. O efluente para separação foi solução de ácido sulfúrico 5 mM, aplicado a uma taxa de eluição de 0,5

mL/min-1. Foram preparados padrões de 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75 e 100 mM para glicose, xilose e etanol.

#### **4.7 Análises estatísticas**

Todo conjunto de dados presente neste trabalho foi submetido a análises estatísticas do software QtiPlot versão 0.9.8.6. O mesmo foi instalado e executado no sistema operacional Ubuntu 20.04 de 64-bit e também foi utilizado para a criação dos gráficos. As análises contempladas por este trabalho foram o teste de normalidade Shapiro-Wilk e ANOVA unidirecional.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Ensaios de estresse realizados no Growth Profiler 960

Todos os gráficos desta seção foram construídos com valores de O.D convertidos a partir da curva de calibração elaborada com valores de Green Value gerados automaticamente pelo equipamento Growth Profiler. Todos os conjuntos de dados apresentados nos gráficos da seção de resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e todos apresentaram-se normais dentro do nível de significância de 0,005.

#### 5.1.1 Perfil de crescimento das linhagens de *S. passalidarum* em diferentes concentrações de etanol em meio YPD e YPX

A primeira concentração testada foi de 5% (v/v) de etanol, representada graficamente na Figura 8(A). A levedura de referência apresentou o melhor desempenho de crescimento em comparação com todas as linhagens testadas. Entre os isolados, destacaram-se as linhagens 6 e 4. O teste ANOVA demonstrou que, nessa concentração, as linhagens apresentaram comportamentos significativamente diferentes, como indicado pelo valor de  $p = 0,00003$ , considerando um nível de significância de 0,05.

Observa-se crescimento da linhagem NRRL Y-27907 na concentração de 6% (v/v) de etanol, conforme representado na Figura 8(B). Esse resultado se destaca por divergir do relatado anteriormente na literatura que indicava um limite de crescimento em 4% (v/v) de etanol (CAMPOS et al., 2022). Em relação aos isolados, as linhagens 4 e 6 apresentaram comportamento semelhante ao da linhagem-tipo, sugerindo maior tolerância ao etanol em comparação com as demais.

A Figura 8(C) representa graficamente a última concentração de etanol testada, correspondente a 7% (v/v). Observa-se dificuldade de crescimento em todas as linhagens. No grupo dos isolados, nenhuma linhagem apresentou desempenho expressivo, uma vez que todas foram severamente afetadas pelo aumento da concentração de etanol, mantendo suas densidades ópticas próximas da OD inicial.

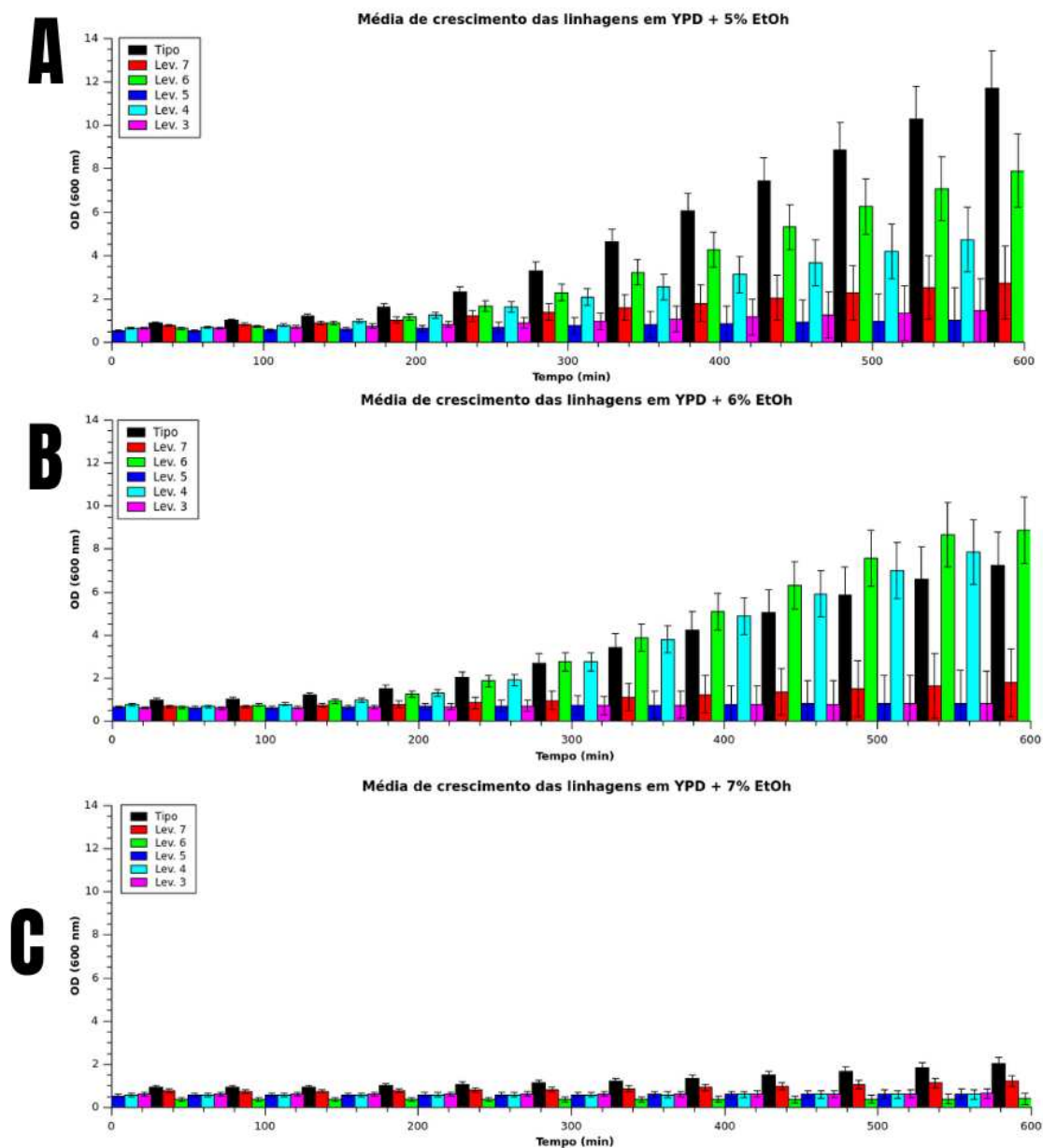


Fig. 8. Média dos valores de crescimento das linhagens na presença de diferentes valores de EtOH; (A) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 5% de etanol em YPD; (B) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 6% de etanol em YPD; (C) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 7% de etanol em YPX.

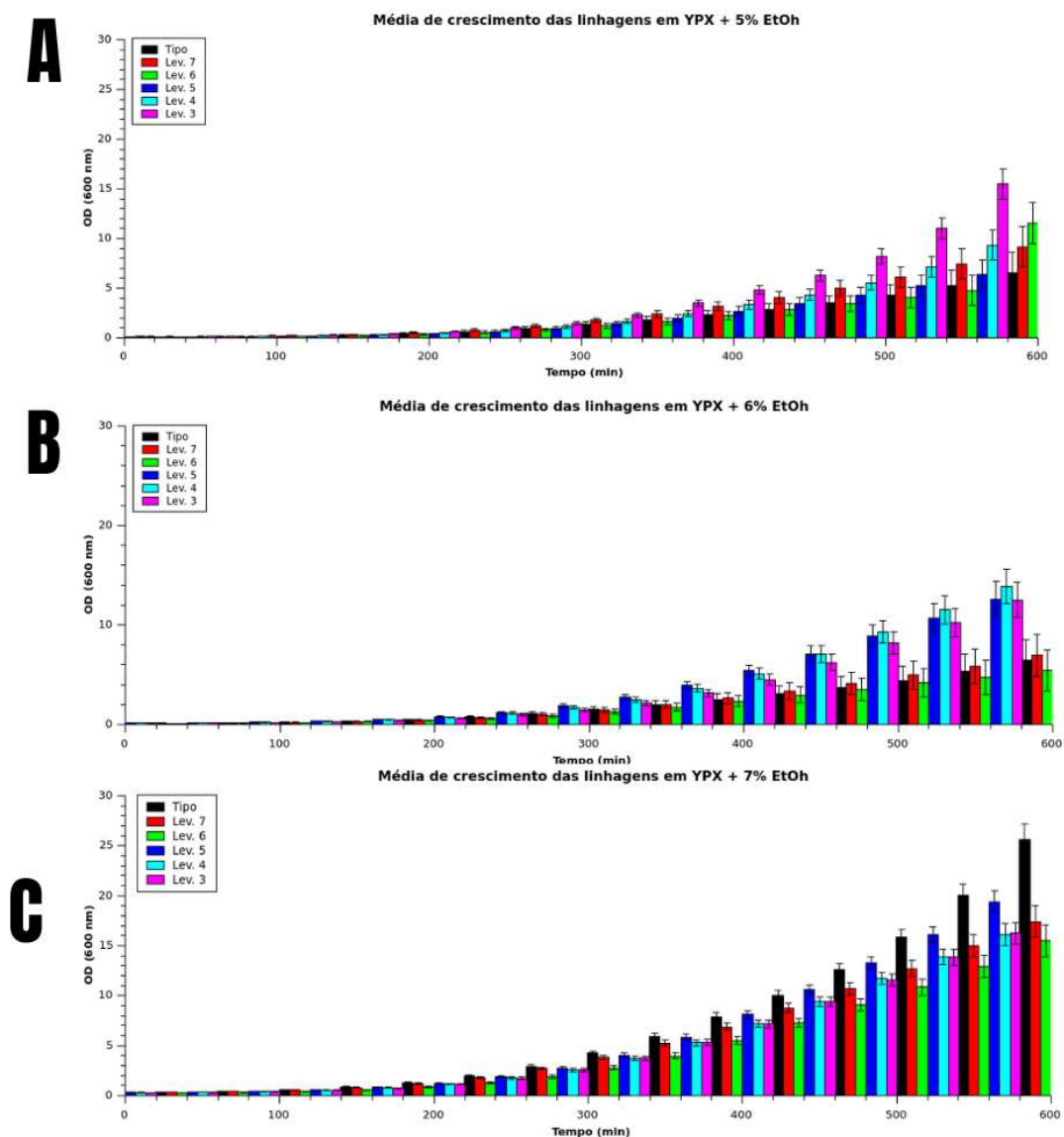


Fig. 9. Média dos valores de crescimento das linhagens na presença de diferentes valores de EtOH; (A) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 5% de etanol em YPX; (B) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 6% de etanol em YPX; (C) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 7% de etanol em YPX.

De maneira global, todas as leveduras (referência e isolados) apresentaram um desempenho de crescimento melhor quando a xilose foi utilizada como fonte principal de carbono do meio, principalmente a linhagem de referência na maior concentração de etanol testada. Em 7% (v/v) de EtOH, em glicose, a linhagem NRRL Y-27907 apresentou um valor de OD de 2,089, enquanto obteve um valor de 25,613 no mesmo estresse em xilose, como é possível visualizar na figura 9(C). Dentre as concentrações 5% (v/v) e 6% (v/v) de EtOH em xilose, não houve diferença significativa entre os isolados.

Este resultado está em consonância com o teste ANOVA, visto que o mesmo indicou que as linhagens não apresentaram comportamentos significativamente diferentes em um nível de significância de 0,05. Porém, ao realizar o mesmo teste comparando as médias entre as concentrações, o resultado foi de significativa diferença comportamental, apresentando um p. valor de 0,006 dentro do mesmo nível de significância. Ou seja, dentro do estresse não houve diferença significativa, mas comparando os dados das médias entre os estresse, as linhagens apresentaram comportamentos diferentes dentro de cada uma.

Estudos realizados com outras espécies de leveduras fermentadoras de xilose, como a *Candida intermedia* demonstraram um crescimento mais eficiente meio utilizando xilose em relação a glicose analisado geneticamente (GEIJER, 2020). Para além deste desempenho esperado para linhagens naturalmente fermentadoras de xilose, também é possível analisar de acordo com condições de aeração. O oxigênio tem uma influência importante nas reações metabólicas da xilose: enquanto a alta aeração promove o crescimento, a limitação de oxigênio favorece a produção de metabólitos como o etanol (BOLZICO, 2024). Apesar de não ter sido avaliado independentemente, a aeração e a presença de oxigênio pode ser considerada, tendo em vista o tipo de tampa utilizada para este cultivo que permite trocas gasosas entre as linhagens e o meio externo e a rotação do aparelho Growth Profile que proporciona maior aeração para o meio.

### **5.1.2 Perfil de crescimento das linhagens de *S. passalidarum* em diferentes concentrações de NaCl em meio YPD e YPX**

Primeiramente, em relação ao meio YPD, a levedura de referência foi capaz de crescer em 0.5 M de NaCl como apresentado na figura 10(A).

Concomitantemente, nesta mesma concentração, a levedura 6 apresentou crescimento maior do que o da linhagem de referência e os outros isolados. Para esta concentração, o teste ANOVA indicou que as linhagens apresentam comportamentos significativamente distintos, cujo p. valor foi 0,009 para um nível de significância de 0,05.

O aumento da concentração para 0.75 M não impactou tão negativamente no crescimento das linhagens. A figura 10 (B) demonstra que houve pouca diferença nos valores de OD em relação à concentração anterior e os fenótipos de destaque seguem sendo as mesmas linhagens.

A figura 10 (C) representa a significativa redução de crescimento causada pelo 1 M de NaCl para todas as linhagens. Em suma, todas se mantiveram na faixa de O.D inicial do experimento (0,1). Este resultado é esperado, levando em consideração que o NaCl em altas concentrações inibe o crescimento das leveduras por conta do estresse osmótico gerado. Estudo realizado por Wei et. al. relatou que em concentrações de 1 a 5% (p/v), o NaCl inibiu a fermentação alcoólica de glicose por *Saccharomyces cerevisiae*. À medida que o teor de sal aumentou, o crescimento das leveduras diminuiu e o período de *lag* da curva de biomassa da levedura aumentou (WEI, 1982). Isso ocorre por conta da desidratação celular gerada pelo NaCl que força as leveduras a gastarem mais energia para manter seu balanço osmótico, prejudicando sua taxa de crescimento.

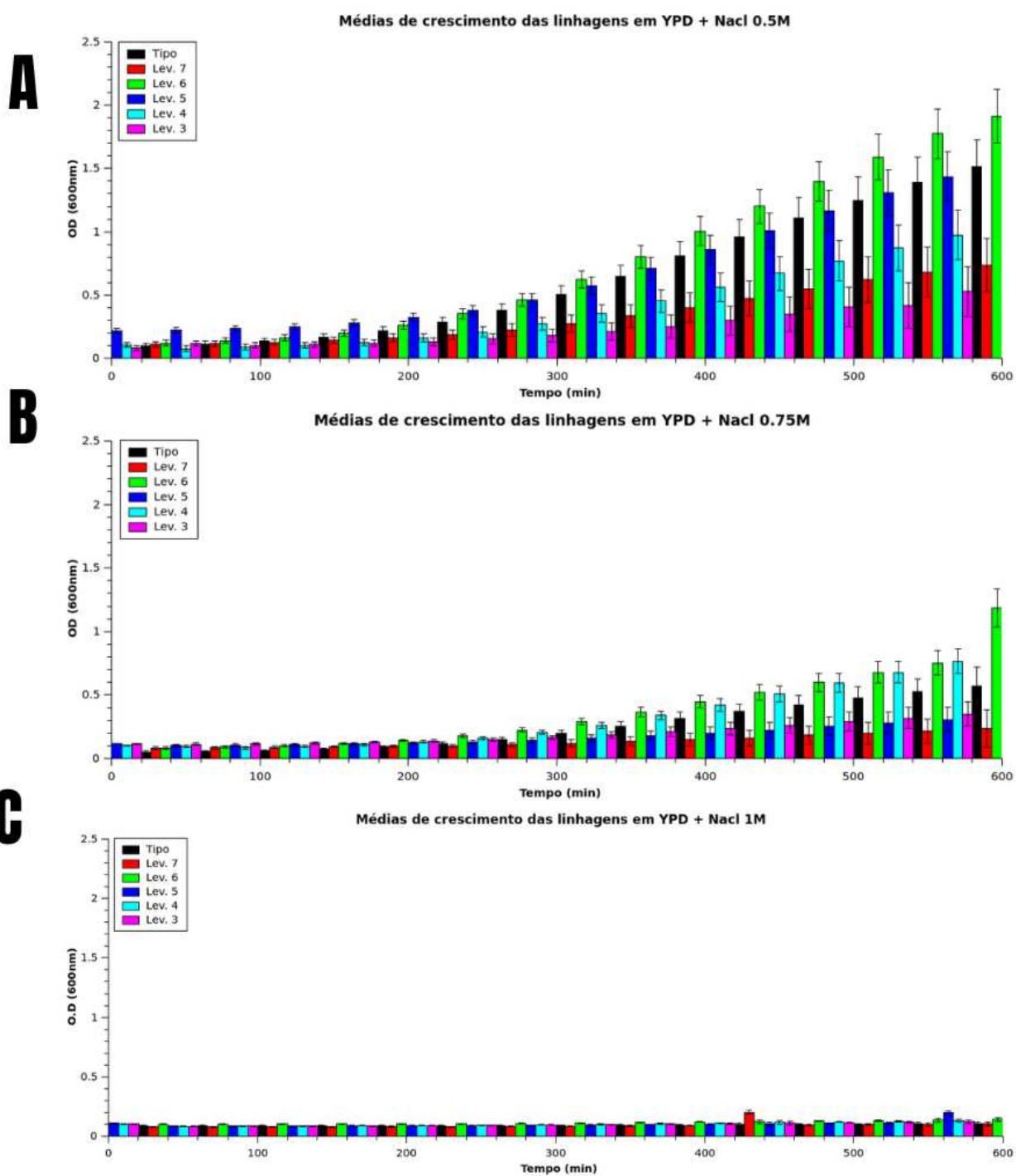


Fig. 10. Média dos valores de crescimento das linhagens na presença de diferentes valores de NaCl. (A) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 0.5M de NaCl em YPD; (B) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 0.75M de NaCl em YPD; (C) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 1 mM de NaCl em YPD.

Utilizando as mesmas concentrações de NaCl, o crescimento das leveduras foi avaliado em meio YPX. Como é possível observar pelo aumento do valor de OD, para todas as linhagens, a xilose como fonte de carbono proporcionou um significativo aumento de crescimento e, conseqüentemente, de valor de OD. Comparando as figuras 10(A) e 11 (A), a levedura de referência apresentou valores de OD superiores em xilose, mas continuou sendo superada pelas linhagens isoladas. O teste ANOVA demonstrou que as linhagens não apresentam comportamentos significativamente diferentes dentro dessa concentração, mas o resultado foi positivo para significância ao comparar as médias de crescimento obtidas para a mesma concentração em glicose.

Em YPX, o aumento da concentração do fator estressante para 0.75 M levou a potencialização do crescimento para todas as linhagens. Através da figura 11 (B), é possível perceber que a levedura de referência se sobressaiu em relação a grande parte das linhagens, fenótipo diferente do apresentado na concentração anterior. Para essa concentração de NaCl em xilose, o teste ANOVA demonstrou que as linhagens não apresentam comportamentos significativamente diferentes, porém foi positivo para significância ao comparar com as médias de crescimento resultantes em glicose.

Para o maior valor de concentração de NaCl testado, nota-se o expressivo crescimento da levedura de referência novamente, como visto na figura 11 (C), sendo uma das melhores representantes para essa concentração. Este comportamento é completamente distinto em relação a mesma concentração utilizando glicose. Por fim, o teste ANOVA demonstrou que as linhagens não apresentam comportamentos significativamente diferentes. Portanto, as linhagens não apresentaram comportamentos distintos entre si dentro das concentrações testadas para NaCl utilizando xilose.

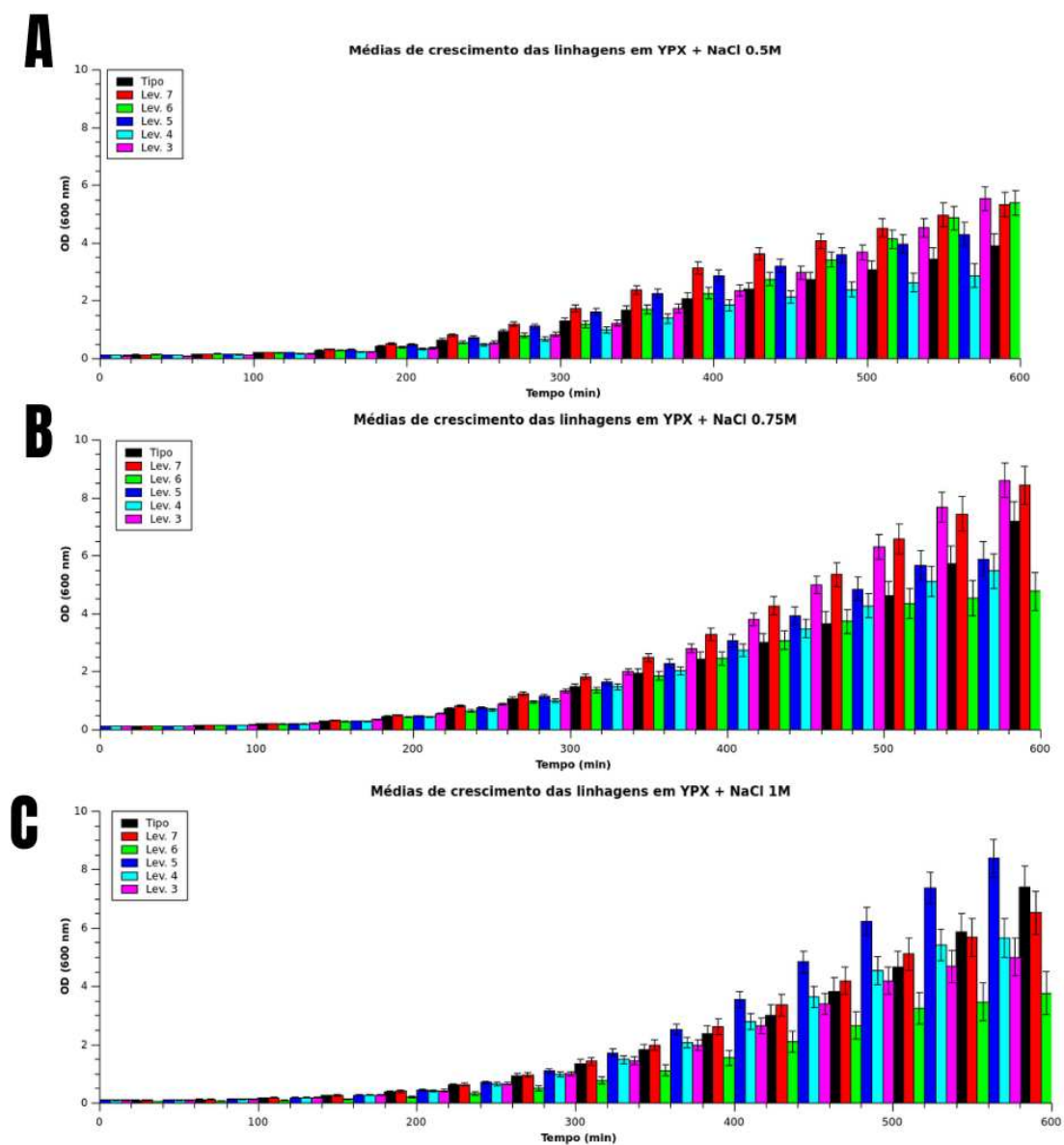


Fig. 11. Média dos valores de crescimento das linhagens na presença de diferentes valores de NaCl. (A) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 0.5M de NaCl em YPX; (B) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 0.75M de NaCl em YPX; (C) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 1 mM de NaCl em YPX.

### 5.1.3 Perfil de crescimento das linhagens de *S. passalidarum* em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio YPD e YPX

Em relação a este mesmo meio, as linhagens não apresentaram dificuldades de crescimento, sendo possível observar altos valores de O.D. A figura 12 (A) demonstra que a maioria das linhagens cresceram de maneira superior à linhagem de referência em 7 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo a levedura 7 a que mais demonstrou dificuldades de crescimento para essa concentração. O teste ANOVA demonstrou que as linhagens não apresentam comportamento significativamente distintos dentro dessa concentração.

Contudo, com o aumento da concentração para 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a linhagem *NRRL Y-27907* obteve metade do valor de OD em relação a concentração anterior. É possível visualizar tal redução de acordo com a figura 12 (B). Já sob a visão dos isolados, estatisticamente, as linhagens continuam não apresentando comportamento significativamente distinto de acordo com o teste ANOVA.

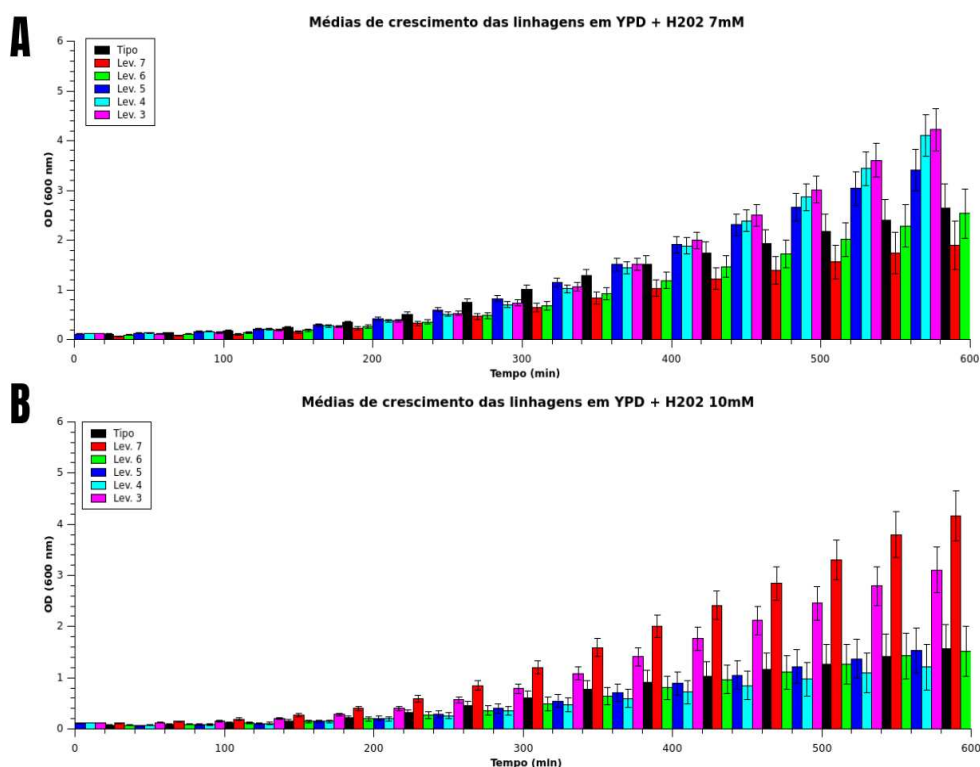


Fig. 12. Média dos valores de crescimento das linhagens na presença de diferentes valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (A) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 7mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em YPD; (B) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 10mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em YPD;

Em termos de uso da xilose como fonte principal de carbono, a figura 13 demonstrou que diferentes leveduras se destacaram para 7mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em comparação com o uso de glicose. Para esta fonte de carbono, destaca-se o desempenho da levedura de referência e a número 6. As demais linhagens não cresceram, permanecendo assim, na O.D próxima a 0,1. O teste ANOVA comprovou o que está sendo representado pelo gráfico, visto que o resultado foi de significativa diferença entre as linhagens. É importante destacar que, para essa concentração, em relação com o uso de glicose, os valores de OD foram reduzidos pela metade. Ainda assim, é possível destacar a resiliência das leveduras de número 4 e 6 dentre as demais.

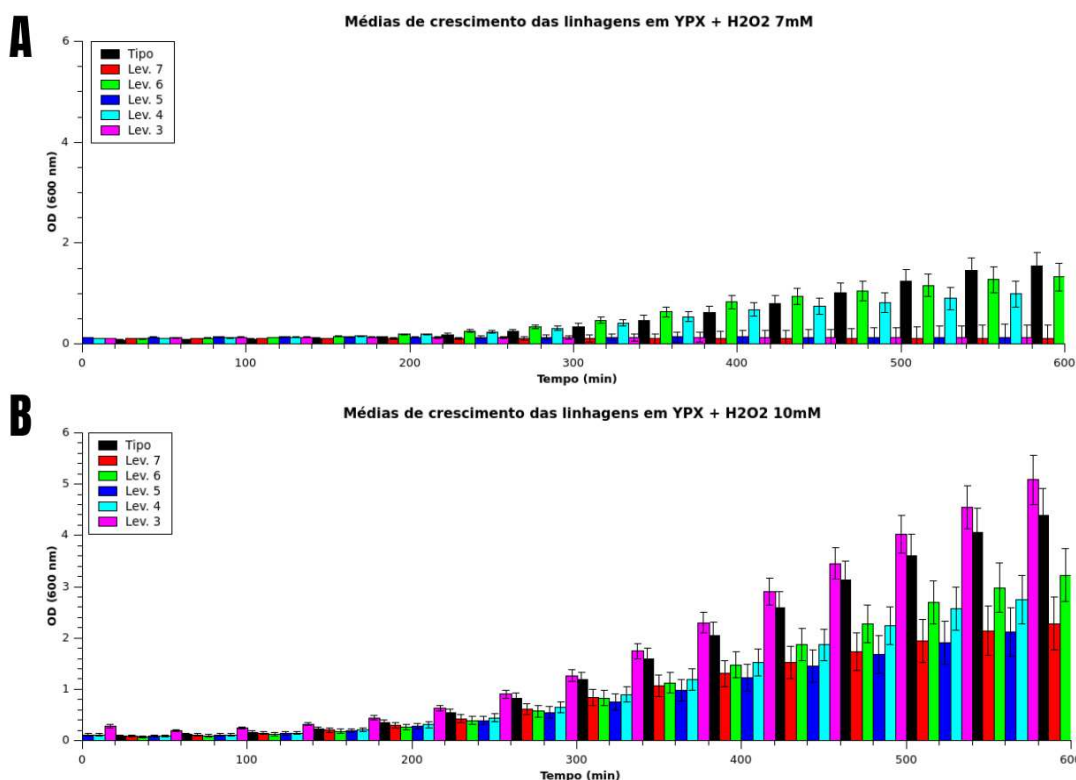


Fig. 13. Média dos valores de crescimento das linhagens na presença de diferentes valores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (A) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 7mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em YPX; (B) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 10mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em YPX;

O aumento da concentração do fator estressante não implicou em decréscimo de valores de OD. Como visto na figura 13 (A) e 13 (B), passando de

7 mM para 10 mM, as linhagens previamente inibidas começaram a apresentar melhores valores de crescimento. Para a concentração de 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a xilose proporcionou maiores valores de OD. Dentro da concentração de 10 mM, o teste ANOVA demonstrou que as linhagens não apresentaram comportamento significativamente diferente, sendo seu p. valor correspondente a 0.06.

A não inibição de crescimento mesmo na presença de peróxido de hidrogênio já foi amplamente discutida na literatura. Quan et. al. utiliza-se do conceito de que o peróxido de hidrogênio pode atuar como molécula sinalizadora, sendo capaz de regular a expressão de genes e respostas ao estresse de maneira conservada para vários eucariotos, inclusive leveduras (QUAN, 2007). Em consonância, o estudo realizado por Mesquita et. al sugere que a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em níveis controlados pode ser responsável pela promoção da longevidade e adaptação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (MESQUITA, 2010). Ainda dentro desta espécie, o estudo realizado por Ruslana Vasylykowska et. al. discute a influência de fontes de carbono para o crescimento de leveduras como pré-condição do fenótipo hormético induzido por peróxido de hidrogênio. De acordo com a teoria da hormese, baixas doses de fatores indutores de estresse levam à resposta de hormese estimulatória e à melhoria das funções biológicas, enquanto em altas doses os efeitos deletérios prevalecem, podendo propiciar um melhor crescimento. O grupo obteve como resultado a demonstração de resposta hormética de pico acentuado até 7,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para *Saccharomyces cerevisiae* (VASYLKOVSKA, 2015). Portanto, é possível afirmar que o peróxido de hidrogênio pode ser um fator estressante letal de acordo com as condições ótimas de crescimento do microrganismo, porém, da mesma maneira, pode atuar como um promotor de crescimento do mesmo.

#### **5.1.4 Perfil de crescimento das linhagens de *S. passalidarum* em diferentes concentrações de glicose em meio YPD**

Foram escolhidas as concentrações 2%, 18%, 20%, 25% e 30% de glicose a fim de testar a resiliência das linhagens em altas concentrações desta fonte de carbono. Foi tido como controle positivo a concentração de 2%. Como esperado, esta foi a concentração cujo crescimento foi o mais expressivo, assim visto na figura 14. A linhagem de referência destacou-se perante as demais, porém todos os isolados tiveram um bom desempenho nessa concentração.

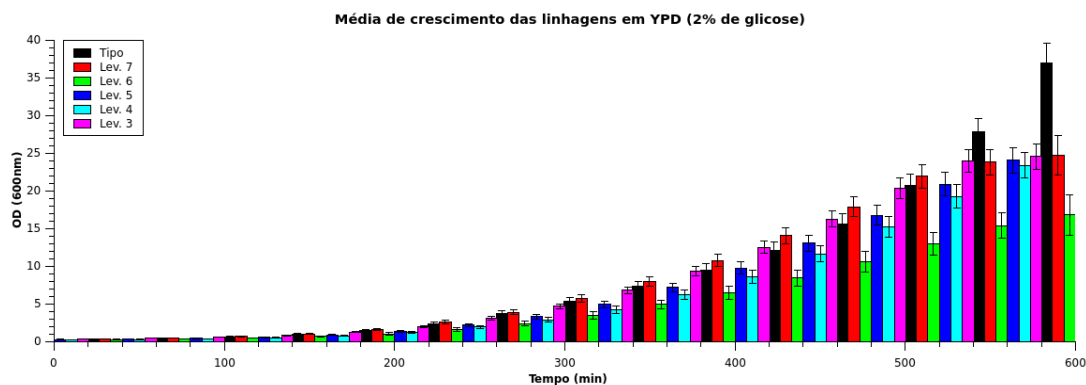


Fig. 14. Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 2% de glicose em meio YPD.

Em 18% de glicose, presente na figura 15 (A), é possível perceber uma grande redução do crescimento para todas as linhagens. De acordo com o teste ANOVA, utilizando um nível de significância de 0.05, as linhagens não apresentaram comportamento significativamente diferente, visto que seu p. valor foi de 0,9.

Comportamento similar foi encontrado nas concentrações de 20% e 25% representadas pelas figuras 15(B) e 15(C), respectivamente. Todas as linhagens apresentaram dificuldades de crescimento e redução no valor de OD. O ANOVA de ambas as concentrações demonstrou que as linhagens não se comportaram de maneira significativamente diferente, visto que o seu p. valor  $> 0.05$ .

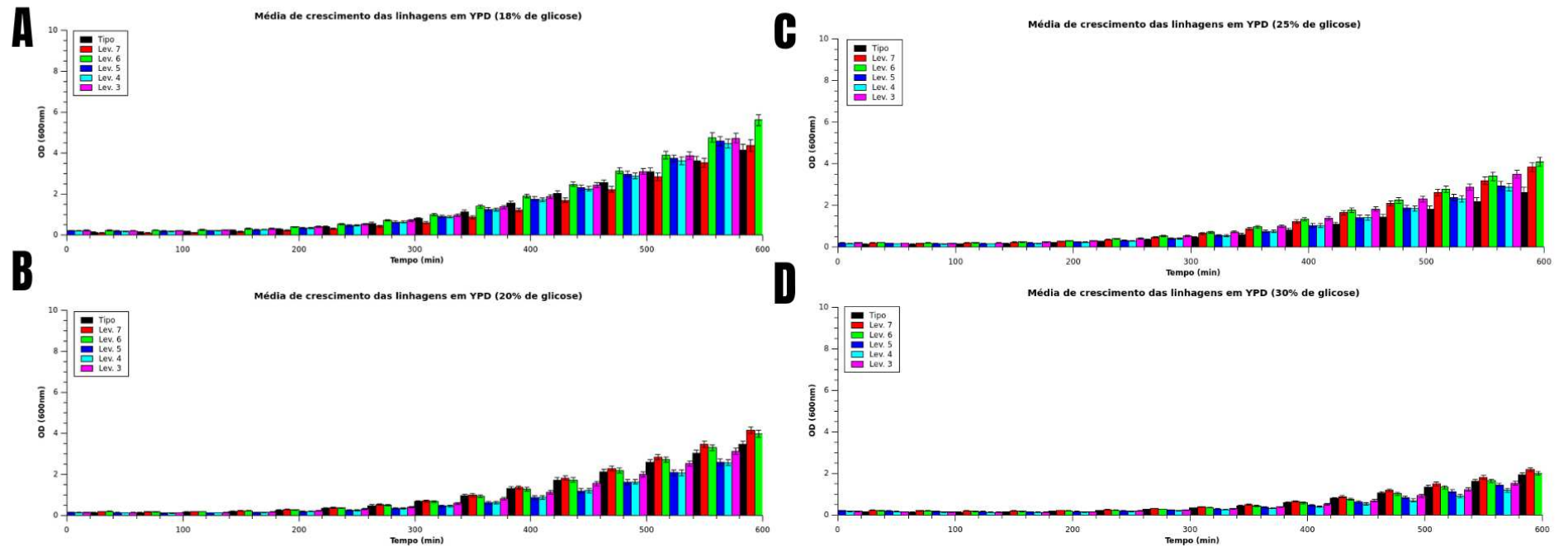


Fig. 15. Média dos valores de crescimento das linhagens na presença de diferentes valores de glicose; (A) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 18% de glicose em meio YPD; (B) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 20% de glicose em meio YPD; (C) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 25% de glicose em meio YPD; (D) Média dos valores de O.D (600 nm) na presença de 30% de glicose em meio YPD.

O aumento progressivo de 18% a 25% de glicose não acarretou em grandes diferenças no crescimento geral das linhagens, como é possível observar nos valores presentes no eixo Y. As linhagens continuaram apresentando dificuldades de crescimento se compararmos com os valores atingidos pelas mesmas no controle.

Na maior porcentagem de glicose escolhida, o crescimento ainda assim não foi inibido, porém obteve-se os menores valores de OD para este ensaio. O mesmo caiu pela metade para todas as linhagens em comparação com 25% de glicose. A linhagem de referência apresentou comportamento similar às linhagens 6 e 7, como visto na figura 15 (D). Neste caso, o teste ANOVA também demonstrou que as linhagens não apresentaram comportamentos significativamente distintos, obtendo um p. valor > 0.05.

## **5.2 Co-fermentações**

As linhagens foram submetidas a dois experimentos de co-fermentação. A primeira foi realizada com as mesmas linhagens submetidas ao tratamento no Growth Profiler (3, 4, 5, 6, 7 e Tipo). A partir das análises dos cromatogramas gerados automaticamente pelo HPLC (Shimadzu), optou-se por realizar novamente o experimento somente com as linhagens 6 e Tipo, visto que foi o isolado de maior rendimento de produção de etanol e a nossa linhagem de referência, respectivamente. Ambas foram realizadas de acordo com o item 4.4 e utilizando o mesmo equipamento.

### **5.2.1 Co-fermentação: análise do consumo de glicose e xilose x produção de etanol**

Os gráficos da figura 16 representam o consumo das fontes de carbono em concomitância com a produção de etanol de todas as linhagens testadas. Em todos os casos, observa-se que a glicose é consumida rapidamente nos primeiros momentos (até 6-12 horas), indicando-a como fonte de carbono preferencial das leveduras. Dentre os valores de consumo de glicose, não houve diferença estatística significativa segundo o teste ANOVA, o que indica que as mesmas consumiram esta fonte de maneira similar. O mesmo resultado estatístico foi encontrado para o padrão de consumo de xilose, sendo não significativamente diferente dentro do nível de significância de 0,05.

O esgotamento de glicose antes de utilizar a xilose já era o comportamento esperado para este teste (HOU, 2017), com exceção da levedura 6. É possível ver na figura 16 (B) que a mesma consumiu a xilose de maneira preferencial e eficiente, além de ter sido a linhagem de maior rendimento (g/L) de etanol ao produzir 10.5g/L em 24h. Por esses dois fatos, a mesma foi encaminhada ao uma nova rodada de experimentos de co-fermentação para maiores investigações.

Através da figura 16 (C), é possível visualizar como a produção de etanol apresentou-se de maneira similar entre todas as linhagens durante a primeira co-fermentação. Consonante com este resultado, o teste ANOVA apresentou que não há diferença significativa dentre os valores de etanol produzido.

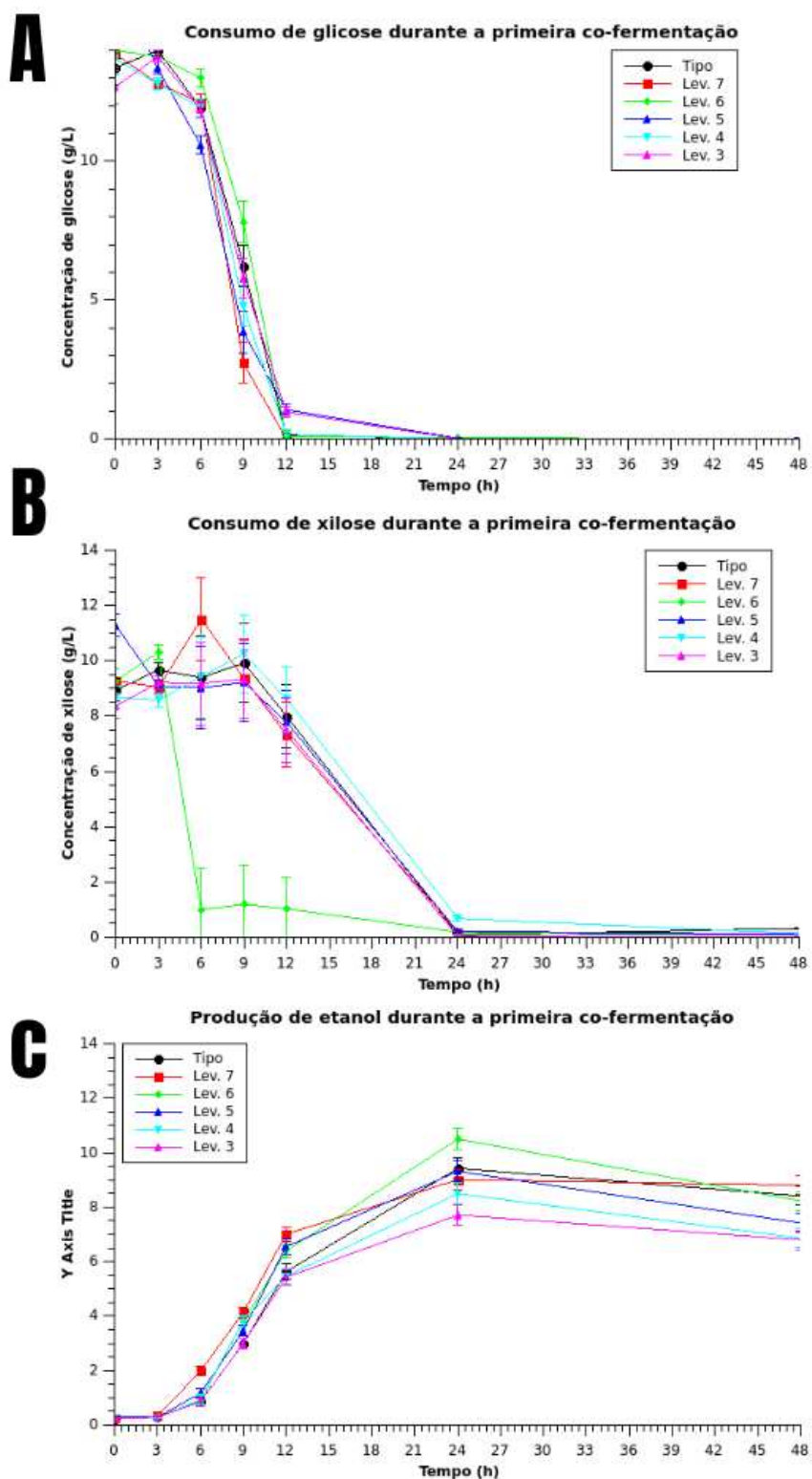


Fig. 16. Representações gráficas de consumo de fonte de carbono e produção de etanol durante o experimento de co-fermentação. (A) Consumo de glicose durante a primeira co-fermentação; (B) Consumo de xilose durante a primeira co-fermentação; (C) Produção de etanol durante a primeira co-fermentação.

### **5.2.2 Co-fermentação: análise consumo de glicose e xilose x Produção de Etanol das leveduras 6 e Tipo**

A segunda rodada de experimentos co-fermentativos foi realizada a partir do dobro do valor das concentrações de xilose e glicose anterior a fim de investigar se o comportamento de consumo primário da xilose continuaria para a levedura número 6. Porém, a linhagem não apresentou os mesmos resultados da produção anterior. O fenótipo de consumo primário da xilose não ocorreu novamente, como é possível observar na figura 16 (A).

Neste momento, a levedura 6 demonstrou preferência pela glicose, tendo em vista que o acréscimo na produção de etanol ocorre concomitantemente com o consumo desta fonte de açúcar (12h). Logo após as 12h, a xilose é consumida integralmente e a produção de etanol atinge seu pico em 24h. Comportamento muito similar ocorreu também com a levedura de referência, como visto na figura 16 (B). Os gráficos corroboram com a análise obtida através do teste ANOVA. O resultado apontou que as linhagens não apresentam diferença estatística significativa no quesito consumo de glicose.

A figura 16 (B) representa graficamente o consumo de xilose ao longo da segunda co-fermentação. Não é possível visualizar diferenças significativas de consumo desta fonte de carbono entre as duas linhagens abordadas de acordo com o teste ANOVA. Para além disso, é possível notar que ambas as linhagens só começaram a consumir tal fonte de carbono após decréscimo na concentração de glicose.

A figura 17 (C) representa graficamente a média de produção de etanol das linhagens 6 e Tipo. De acordo com o teste ANOVA, não há diferença significativa em relação a produção de etanol pelas duas linhagens, como é possível perceber também na figura. Tendo em vista o aumento da concentração de açúcares, a concentração final de etanol também aumentou, seguindo um comportamento regular esperado.

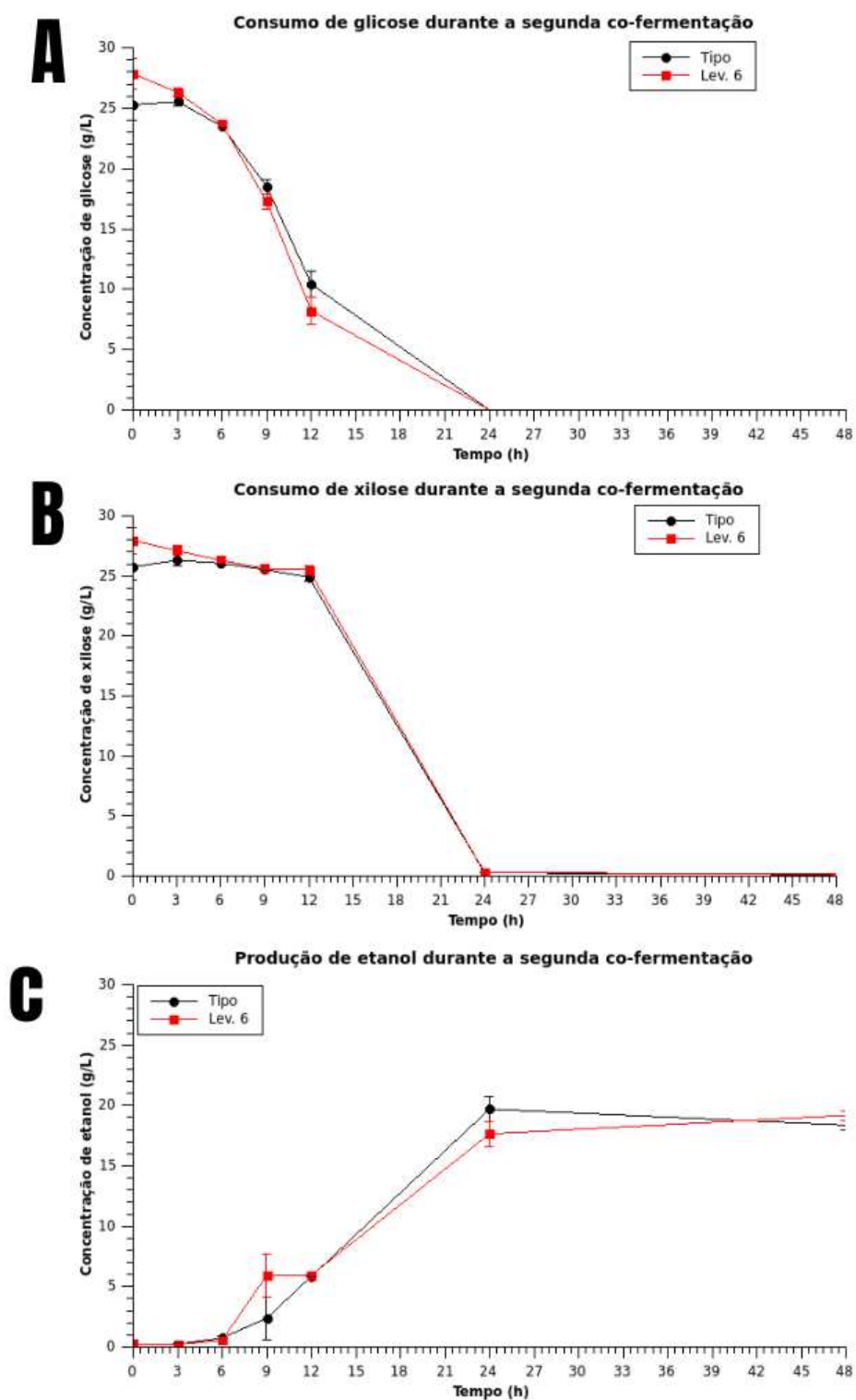


Fig. 17. Representações gráficas de consumo de fonte de carbono e produção de etanol durante o experimento de co-fermentação. (A) Consumo de glicose durante a segunda co-fermentação; (B) Consumo de xilose durante a segunda co-fermentação; (C) Produção de etanol durante a segunda co-fermentação.

## 6. Conclusão

Este trabalho caracterizou fisiologicamente 12 diferentes linhagens de *S. passalidarum*, isoladas da Amazônia, com foco em sua resposta ao efeito do etanol, cloreto de sódio e peróxido de hidrogênio sobre o crescimento, bem como seu respectivo potencial para produção de etanol.

Os ensaios de estresse foram realizados no equipamento Growth Profiler 960 (EnzyScreen). De maneira geral, as linhagens apresentaram maior resistência ao estresse em meio contendo xilose como principal fonte de carbono. No entanto, na presença simultânea de glicose e xilose, as linhagens consomem preferencialmente a glicose.

Inicialmente, nas concentrações de 5% (v/v), 6% (v/v) e 7% (v/v) de etanol em meio com glicose, as linhagens apresentaram comportamentos significativamente diferentes, com destaque para a levedura de referência e a linhagem 6. Contudo, na maior concentração testada (7%), o crescimento de todas as linhagens foi severamente afetado. Já nas mesmas concentrações de etanol em meio com xilose, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens. Apesar da dificuldade de crescimento previamente observada para a linhagem de referência em testes anteriores realizados pelo grupo, seu desempenho nos experimentos conduzidos no equipamento Growth Profiler revelou valores de densidade óptica (OD) superiores nas concentrações moderadas de etanol, como 5% (v/v) e 6% (v/v).

Em relação às concentrações de 0,5 M, 0,75 M e 1 M de NaCl em meios com glicose e xilose, apenas as concentrações de 0,5 M e 0,75 M em YPD apresentaram diferenças significativas no crescimento entre as linhagens. Nessas condições, destacaram-se as linhagens 6 e a Tipo. Para todos os ensaios realizados em YPX, não houve distinção estatística entre as médias de crescimento das leveduras. O crescimento foi mais comprometido na presença de glicose com NaCl, resultado esse que está de acordo com a literatura. Por outro lado, em meio com xilose, o crescimento aumentou proporcionalmente com o acréscimo da concentração de sal. Portanto, as linhagens enfrentaram o estresse osmótico gerado pelo NaCl de forma

mais eficiente na presença de xilose.

De maneira semelhante ao observado no estresse osmótico, as linhagens apresentaram melhor crescimento na presença de maiores concentrações de peróxido de hidrogênio. Em meio com glicose, não foram observadas diferenças significativas entre os isolados. No entanto, em meio com xilose, as médias de crescimento apresentaram diferenças estatisticamente significativas, conforme indicado pelo teste ANOVA. Em YPX acrescido de 7 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, destacaram-se as linhagens 6 e 4, enquanto em YPX com 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os melhores desempenhos foram das linhagens 3 e Tipo.

Altas concentrações de glicose foram avaliadas (18%, 20%, 25% e 30%). De acordo com o teste ANOVA, nenhuma das linhagens apresentou comportamento significativamente distinto dentro dessas concentrações. No entanto, os baixos valores de OD indicam que todas foram severamente comprometidas na última concentração testada (30%).

Por fim, este trabalho também realizou duas cofermentações com o objetivo de avaliar o comportamento das leveduras frente a duas fontes de carbono (glicose e xilose) e sua respectiva produção de etanol. Embora *S. passalidarum* seja um microrganismo capaz de fermentar xilose, todas as linhagens testadas apresentaram preferência pela glicose, consumindo-a primeiramente — como já relatado na literatura. Em ambos os experimentos, não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens nos quesitos consumo de glicose, consumo de xilose e produção de etanol.

O estudo reforça a importância de se avaliar linhagens nativas isoladas da biodiversidade brasileira, como forma de ampliar o repertório de microrganismos com potencial biotecnológico, além de contribuir para o enriquecimento da literatura sobre a espécie. As características fisiológicas promissoras identificadas neste trabalho contribuem para a busca de alternativas sustentáveis e eficientes para a produção de bioetanol de segunda geração. Para trabalhos futuros, recomenda-se a aplicação de técnicas genômicas, proteômicas e metabolômicas, a fim de promover um entendimento mais aprofundado dos mecanismos moleculares envolvidos na tolerância ao etanol e no metabolismo da xilose nas linhagens de destaque.

## 7. Referências bibliográficas

ALBARELLI, J. Q. Produção de açúcar e etanol de primeira e segunda geração: simulação, integração energética e análise econômica. 2013. 244 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

ALBUINI, F.M., de Castro, A.G., Campos, V.J. *et al.* Transcriptome profiling brings new insights into the ethanol stress responses of *Spathaspora passalidarum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **107**, 6573–6589 (2023).

ALBUINI, Fernanda Matias. Biotechnological applications of yeasts: stress responses of *Spathaspora passalidarum* and mode of action of the biocontrol agent *Pseudozyma flocculosa*. 2023.

ALMEIDA, João RM *et al.* Aumento da tolerância e conversão de inibidores em hidrolisados lignocelulósicos por *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology* , v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.

BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy conversion and management*, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

BIRCH, Rosslyn M.; WALKER, Graeme M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and microbial technology*, v. 26, n. 9-10, p. 678-687, 2000.

BOLZICO, Bruna C. *et al.* Explorando o metabolismo da xilose em leveduras não convencionais: caracterização cinética e acúmulo de produto sob diferentes condições de aeração. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* , v. 51, p. kuae023, 2024.

BONAN, CIDG. Avaliação da produção de bioetanol sob diferentes condições de transferência de oxigênio para a levedura *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907. Diss. [sn], 2018.

BRASIL. Governo do. Brasil alcança a maior produção de etanol da história. Serviços e Informações do Brasil, [S. l.], p. 1-2, 24 abr. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/pt-br/noticias/agricultura-e-pecuaria/2020/04/brasil-alcanca-a-maior-producao-de-etanol-da-historia>>. Acesso em: 15 fev. 2024.

BRASIL. Governo do. Combustível do Futuro. Ministério de Minas e Energia, [S. l.], p. 1-2, 12 ago. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/secretarias/petroleo-gas-natural-e-biocombustiveis/combustivel-do-futuro>>. Acesso em: 15 fev. 2024.

CADETE, Raquel M. Diversidade e Caracterização Fisiológica de Leveduras Fermentadoras de D-Xilose Isoladas da Floresta Amazônica Brasileira. PLOS ONE, [s. l.], 13 ago. 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043135>>. Acesso em: 6 fev. 2024.

CAMPOS, VJ et al. Comparações fisiológicas entre *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae* e *Scheffersomyces stipitis* revelam os gargalos para seu uso na produção de etanol de segunda geração. Braz J Microbiol, v. 53, p. 977–990, 2022. DOI: 10.1007/s42770-022-00693-6.

CASTRO, Alex Gazolla de. Resposta ao estresse por etanol em *Saccharomyces cerevisiae* e *Spathaspora passalidarum*. 2019. 160 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.

CHU, B. C. H.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. Biotechnology Advances 2007; 25: 425–441.

DE GÓES-FAVONI, Silvana Pedroso et al. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v. 9, n. 4, p. 285-296, 2018.

DE QUEIROZ, José Humberto, et al. Potential of sugarcane straw for ethanol production. *Quim. Nova*, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

DE ANDRADE, Ednilton Tavares, CARVALHO, Sergio Roberto Garcia de, SOUZA, Lucas Fernandes de. Programa do Proálcool e o etanol no Brasil. *Engevista*, 2009.

DOES, Amy L.; BISSON, LINDA F. Comparação da cinética de captação de glicose em diferentes leveduras. *Journal of bacteriology*, v. 171, n. 3, p. 1303-1308, 1989.

ELIASSON, Anna et al. Fermentação anaeróbica de xilose por *Saccharomyces cerevisiae* recombinante contendo XYL1, XYL2 e XKS1 em culturas quimiostáticas em meio mineral. *Microbiologia Aplicada e Ambiental*, v. 66, n. 8, p. 3381-3386, 2000.

FERREIRA, Juliana. ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO: definição e perspectivas. *Conexão Eletrônica*, v. 12, p. 1-11, 2015.

FLORES, Carmen-Lisset et al. Metabolismo de carboidratos e produção de energia em leveduras não convencionais. *FEMS microbiology reviews*, v. 24, n. 4, p. 507-529, 2000.

GANCEDO, Juana M. Repressão de catabólitos de carbono em leveduras. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 2, p. 334-361, 1998.

GEIJER, C., Faria-Oliveira, F., Moreno, AD *et al.* A análise genômica e transcriptômica de *Candida intermedia* revela os determinantes genéticos de sua capacidade de conversão de xilose. *Biotechnol Biofuels* 13, 48 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1663-9>

HAHN-HÄGERDAL, Bärbel et al. Engenharia metabólica para utilização de pentoses em *Saccharomyces cerevisiae*. *Biocombustíveis* , p. 147-177, 2007.

HAHN-HÄGERDAL, Bärbel et al. Rumo a linhagens de leveduras industriais fermentadoras de pentoses. *Microbiologia e biotecnologia aplicadas* , v. 74, p. 937-953, 2007.

HAMACHER, Tanja et al. Caracterização das propriedades de transporte de xilose de transportadores de hexose de levedura e sua influência na utilização de xilose. *Microbiology* , v. 148, n. 9, p. 2783-2788, 2002.

HARNER, Nicole K., et al. Melhoramento genético de leveduras fermentadoras de xilose nativas para produção de etanol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 42, n. 1, p. 1–20, 2015. DOI: 10.1007/s10295-014-1535-z.

HELLE, Steve S. et al. Fermentação de xilose por *Saccharomyces cerevisiae* 259ST geneticamente modificado em licor de sulfito usado. *Bioresource Technology* , v. 92, n. 2, p. 163-171, 2004.

HOHENSCHUH, William et al. Desenvolvimento e caracterização de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para superexpressar a via das pentoses fosfato, que regula o fator de transcrição STB5, na presença de xilose. *Systems Microbiology and Biomanufacturing* , v. 1, p. 42-57, 2021.

HOU, Xiaoru. Fermentação anaeróbica de xilose por *Spathaspora passalidarum*. *Microbiologia e biotecnologia aplicadas* , v. 94, p. 205-214, 2012.

JEFFRIES, TW; JIN, Y.-S. Engenharia metabólica para fermentação aprimorada de pentoses por leveduras. *Microbiologia e biotecnologia aplicadas* , v. 63, p. 495-509, 2004.

KAYIKCI, Ömur; NIELSEN, Jens. Repressão de glicose em *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* , v. 15, n. 6, p. fov068, 2015.

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

KLINKE, Helene Bendstrup; THOMSEN, A. B.; AHRING, Birgitte Kiær. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 66, p. 10-26, 2004.

MACHADO, Breno R., et al. Avaliação da adaptação de *Spathaspora passalidarum* na fermentação de frações hemicelulósicas. *Pesquisa e Inovação da 70770*, 2015, p. 24.

MARTINS, Camila Zanetoni. Avaliação da produção de etanol de segunda geração. 2018. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

MESQUITA, Ana et al. A restrição calórica ou inativação da catalase prolonga a vida cronológica da levedura induzindo a atividade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e superóxido dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 34, p. 15123-15128, 2010.

MICHELLON, Ednaldo, et al. Breve descrição do Proálcool e perspectivas futuras para o etanol produzido no Brasil. 2008.

NGUYEN, N. H., SUH, S-O., MARSHALL, C. J., BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. Nov. and *Candida jeffriesii* sp. Nov. *Mycological Research* 2006; 110: 1232-1241.

NIJLAND, Jeroen G.; DRIESSEN, Arnold JM. Engenharia do transporte de pentoses em *Saccharomyces cerevisiae* para aplicações biotecnológicas. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, p. 464, 2020.

NOVY, Vera et al. Cofermentação de açúcares hexose e pentose em uma matriz de licor de sulfito usado com *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada. *Bioresource technology*, v. 130, p. 439-448, 2013.

PALMA, Carol Manzoli; PALMA, Mario Sergio. Bioprospecção no Brasil: análise crítica de alguns conceitos. *Cienc. Cult.*, v. 64, n. 3, p. 22-26, 2012. Disponível em: <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252012000300009&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252012000300009&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 29 jan. 2024. <http://dx.doi.org/10.21800/S0009-67252012000300009>.

PROPEQ. Etanol de segunda geração: o combustível do futuro?. PROPEQ - Mercado, [s. l.], 23 jul. 2020. Disponível em: <<https://propeq.com/etanol-de-segunda-geracao/>>. Acesso em: 29 jan. 2024.

RIBEIRO, Lílian Emídio. Análise da influência da glicose sobre o metabolismo de xilose em *Spathaspora passalidarum*. 2017.

SANCHEZ, Oscar J.; CARDONA, Carlos A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANTIAGO, B. L. S.; RODRIGUES, F. A. Processamento de biomassa lignocelulósica para produção de etanol: uma revisão. *The Journal of Engineering and Exact Sciences- JCEC*, v. 03, n. 07, p. 1011-1022, 2017.

SHARMA, Shalley et al. Aumentando a utilização de pentoses e a produção de etanol de LN nativo de *Saccharomyces cerevisiae* usando engenharia de meio e metodologia de superfície de resposta. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 6, p. 132, 2018.

SHU-HSIEN, HUNG; CHIH-WEN, YU; LIN, Chin Ho. O peróxido de hidrogênio funciona como um sinal de estresse em plantas. ***Botanical Bulletin of Academia Sinica***, v. 46, 2005.

SILVA, Adriana Aparecida; MIZIARA, Fausto. Avanço do setor sucroalcooleiro e expansão da fronteira agrícola em Goiás. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 41, p. 399-407, 2011.

SONDEREGGER, Marco et al. Desempenho da fermentação de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* projetadas e evoluídas, fermentadoras de xilose. *Biotecnologia e bioengenharia* , v. 87, n. 1, p. 90-98, 2004.

SPENCER, Jennifer et al. Tolerance of pentose utilising yeast to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *BMC research notes*, v. 7, p. 1-12, 2014.

SUBTIL, Thorsten; BOLES, Eckhard. Melhorando a utilização de L-arabinose em células de *Saccharomyces cerevisiae* fermentadoras de pentose por meio da expressão heteróloga de transportadores de açúcares que transportam L-arabinose. *Biotecnologia para biocombustíveis* , v. 4, p. 1-10, 2011.

VASYLKOVSKA, Ruslana; PETRIV, Natalia; SEMCHYSHYN, Halyna. Carbon sources for yeast growth as a precondition of hydrogen peroxide induced hormetic phenotype. *International Journal of Microbiology*, v. 2015, n. 1, p. 697813, 2015.

VERHO, Ritva et al. Engenharia de regeneração de cofatores redox para fermentação aprimorada de pentoses em *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiologia Aplicada e Ambiental* , v. 69, n. 10, p. 5892-5897, 2003.

WEI, Chia-Jenn; TANNER, Robert D.; MALANEY, George W. Efeito do cloreto de sódio no crescimento de fermento de panificação em gelatina. *Microbiologia Aplicada e Ambiental* , v. 43, n. 4, p. 757-763, 1982.

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: . Acesso em: 28/5/2014.

ZÚÑIGA, Ursula Fabiola Rodríguez. Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração. 2010. 228 f. Tese (Doutorado) – Curso de Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.