

WALTER SILVA BRAGA STANGE

**FERMENTAÇÃO E COFERMENTAÇÃO DE GLICOSE, XILOSE E ARABINOSE
POR *Meyerozyma caribbica***

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

Orientador: Tiago Antônio de O. Mendes

Coorientadora: Ramila C. Rodrigues

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

S785f
2022

Stange, Walter Silva Braga, 1997-
Fermentação e cofermentação de glicose, xilose e arabinose
por *Meyerozyma caribbica* / Walter Silva Braga Stange. –
Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (50 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.
Referências bibliográficas: f. 44-50.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.018>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Fermentação. 2. Leveduras. 3. *Meyerozyma caribbica*. 4.
Xilitol. 5. Biocombustíveis. 6. Lignocelulose. 7. Resíduos como
combustível. I. Mendes, Tiago Antônio de Oliveira, 1986-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 572.49

WALTER SILVA BRAGA STANGE

**FERMENTAÇÃO E COFERMENTAÇÃO DE GLICOSE, XILOSE E ARABINOSE
POR *Meyerozyma caribbica***

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

APROVADA: 30 de junho de 2022

Assentimento:



Walter Silva Braga Stange
Autor



Tiago Antônio de Oliveira Mendes
Orientador

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos meus pais, Mara e Sérgio, pelo auxílio e compreensão que sempre ofereceram. Sei que estão aqui sempre que eu precisar.

À UFV, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e a pós-graduação em Bioquímica aplicada, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao professor orientador Tiago, pela oportunidade e pela orientação.

À coorientadora Ramila, pela orientação e ajuda oferecida quando necessário.

Aos membros da banca, pelas contribuições com o trabalho.

À Lílian, pelas dicas e esclarecimentos frequentes.

Ao João, pela ajuda com o HPLC.

Ao Laboratório de Biotecnologia Molecular, por toda convivência, ajuda ao usar equipamentos.

Ao Fernando, pela companhia e apoio durante esse tempo de pandemia.

À Clara, Larissa, Isabella, Léo, Yaankha, Érika e Camila, pelas fofocas diárias e pelas distrações nos momentos necessários.

A todos outros amigos, por estarem aqui sempre que precisei, e por fazerem tudo ser mais leve. Não vou citar nomes, porque vocês sabem que sempre esqueço alguém.

RESUMO

STANGE, Walter Silva Braga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2022. **Fermentação e cofermentação de glicose, xilose e arabinose por *Meyerozyma caribbica***. Orientador: Tiago Antônio de Oliveira Mendes. Coorientadora: Ramila Cristiane Rodrigues.

Uma das soluções para a descarbonização do setor de transportes é a utilização de biocombustíveis, uma vez que o carbono liberado na queima desses é reabsorvido durante o crescimento das plantas. Uma das problemáticas quanto à produção de biocombustíveis, contudo, é a possível competição entre essa e a indústria de alimentos por matéria-prima. Os combustíveis de segunda geração (2G) destacam-se como possíveis soluções para que ambas as indústrias consigam utilizar seus insumos. Nesses, a produção é feita a partir de resíduos alternativos que não seriam utilizados pela indústria alimentícia. A diversidade de carboidratos da matriz lignocelulósica é o principal empecilho para a produção de bioetanol 2G. Busca-se com esse intuito leveduras que sejam capazes de fermentar a maior quantidade possível de carboidratos e possuam outras vantagens para produção de biocombustíveis, como alto rendimento e resistência ao etanol gerado. A *Meyerozyma caribbica*, levedura prospectada para esse estudo, demonstrou em artigos de literatura capacidade de fermentar isoladamente pentoses e hexoses, além de um possível mecanismo para resistência a álcoois baseados na presença de transportadores da família dos facilitadores majoritários na membrana celular, previamente caracterizada pelo nosso grupo de pesquisa. Assim sendo, o objetivo desse trabalho é avaliar se a *M. caribbica* é capaz de fermentar e cofermentar pentoses e hexoses eficientemente, mantendo uma boa resistência ao etanol gerado. Para isso, a levedura foi inoculada em meio contendo os carboidratos (glicose, xilose e arabinose) individualmente e em conjunto, sendo medido o consumo desses e a produção de etanol ao final do processo. Além disso, também foram testadas diferentes concentrações de etanol (de 0 a 16%), a fim de avaliar a capacidade de sobrevivência da levedura. A levedura manteve viabilidade e crescimento até 8% (v/v) de etanol. Notou-se que a *Meyerozyma caribbica* foi incapaz de fermentar simultaneamente glicose e pentoses, consumindo preferencialmente a glicose presente no meio. Além disso, a levedura apresentou

baixa taxa de conversão de substrato a etanol a partir de glicose ($0,19 \text{ g.g}^{-1}$) se comparado com as leveduras controles (*Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*). Na fermentação de xilose, por outro lado, a levedura produziu grande quantidade de xilitol, com eficiência de fermentação de 79% em relação ao valor teórico. Desse modo, pôde-se concluir que, para utilização em resíduos lignocelulósicos, a levedura ainda deve ser aprimorada ou melhor caracterizada para maior expressão da enzima xilitol desidrogenase, podendo assim ocorrer a conversão do xilitol para xilulose e, a partir dessa, etanol. Outra possível alternativa é a revisão do objetivo para que a levedura seja utilizada na produção de xilitol, um adoçante natural amplamente utilizado na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Xilitol. Bioetanol. Resíduos lignocelulósicos. Levedura.

ABSTRACT

STANGE, Walter Silva Braga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2022. **Glucose, xylose and arabinose fermentation and cofermentation by *Meyerozyma caribbica***. Adviser: Tiago Antônio de Oliveira Mendes. Co-adviser: Ramila Cristiane Rodrigues.

A possible solution for the decarbonization of the transport sector is the use of biofuels, since the carbon released when burning them is reabsorbed during plant growth. One of the problems regarding the production of biofuels, however, is the possible competition between this and the food industry for raw materials. Second generation fuels (2G) stand out as possible solutions for both industries, as they are able to use their inputs. In these, production is made from alternative waste that would not be used by the food industry. The carbohydrate diversity of the lignocellulosic matrix is the main obstacle for the production of 2G bioethanol. For this purpose, there's a need to search yeasts that are capable of fermenting the highest possible amount of carbohydrates and have other advantages for the production of biofuels, such as high yield and resistance to the ethanol generated. *Meyerozyma caribbica*, the yeast prospected for this study, demonstrated in literature articles the ability to ferment pentoses and hexoses in isolation, as well as a possible mechanism for resistance to alcohols based on the presence of transporters from the family of major facilitators in the cell membrane, previously characterized by our research team. Therefore, the objective of this work is to evaluate whether *M. caribbica* is capable of fermenting and co-fermenting pentoses and hexoses efficiently, maintaining a good resistance to the generated ethanol. For this, the yeast was inoculated in a medium containing carbohydrates (glucose, xylose and arabinose) individually and together, and their consumption and ethanol production were measured at the end of the process. In addition, different concentrations of ethanol (from 0 to 16%) were also tested in order to evaluate the yeast's ability to survive. The yeast maintained viability and growth up to 8% (v/v) ethanol. It was noted that *Meyerozyma caribbica* was unable to simultaneously ferment glucose and pentoses, preferentially consuming the glucose present in the medium. In addition, the yeast showed a low conversion rate of substrate to ethanol from glucose (0.19 g.g⁻¹) compared to control yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces*

marxianus). In the xylose fermentation, on the other hand, the yeast produced a large amount of xylitol, with a fermentation efficiency of 79% in relation to the theoretical value. Thus, it could be concluded that, for use in lignocellulosic residues, the yeast still needs to be improved or better characterized for greater expression of the enzyme xylitol dehydrogenase, thus allowing the conversion of xylitol to xylulose and, from this, ethanol. Another possible alternative is to revise the objective for yeast to be used in the production of xylitol, a natural sweetener widely used in the food industry.

Keywords: Xylitol. Bioethanol. Lignocellulosic residues. Yeast.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Variação do crescimento das leveduras expostas a diferentes concentrações de etanol	31
Figura 2. Plaqueamento das leveduras após ser exposta a 48 h de variadas concentrações de etanol	33
Figura 3. Variação do crescimento das leveduras em diferentes fontes de carbono	34
Figura 4. Plaqueamento das leveduras testadas em glicose, xilose e xilose acrescida de 2-DG	36
Figura 5. Variação dos metabólitos consumidos e gerados por <i>M. caribbica</i> durante 48h de fermentação com glicose a 4%	37
Figura 6. Variação dos metabólitos consumidos e gerados por <i>M. caribbica</i> durante 24h de fermentação (glicose ou xilose a 4%) e cofermentação (glicose e xilose, a 2% cada)	38
Figura 7. Variação dos metabólitos consumidos e gerados por <i>K. marxianus</i> durante 24h de fermentação (glicose a 4%) e cofermentação (glicose e xilose, a 2% cada).	39
Figura 8. Variação dos metabólitos consumidos e gerados por <i>S. cerevisiae</i> durante 24h de fermentação (glicose ou xilose a 4%) e cofermentação (glicose e xilose, a 2% cada)	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Velocidade específica de crescimento e população máxima alcançada para as leveduras em variadas concentrações de etanol	32
Tabela 2. Viabilidade e contagem das células em câmara de Neubauer após 48h de exposição a condições estressantes	32
Tabela 3. Velocidade específica de crescimento e população máxima alcançada para as leveduras em variadas fontes de carbono	35
Tabela 4. Parâmetros fermentativos e de crescimento da levedura, considerando a produção de etanol.....	40
Tabela 5. Parâmetros fermentativos e de crescimento da levedura, considerando a produção de xilitol	41

SUMÁRIO

1 Introdução	12
2 Revisão de literatura	14
2.1 Fermentação alcoólica	14
2.2 Biocombustíveis e etanol de segunda geração	15
2.3 Leveduras utilizadas na fermentação	18
2.4 <i>Meyerozyma caribbica</i>	20
3 Objetivos	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 Metodologia	24
4.1 Manutenção dos microrganismos e meios de cultivo	24
4.2 Teste de resistência a etanol	24
4.3 Ensaios de fermentação e cofermentação de glicose, xilose e arabinose	25
4.4 Efeito da 2-deoxiglicose no metabolismo de xilose	26
4.5 Relação entre absorvância a 600nm e massa celular seca (g.L ⁻¹)	26
4.6 Análise do consumo e produtos da fermentação e cofermentação	28
4.7 Parâmetros fermentativos e de crescimento	28
4.8 Análises estatísticas	29
5 Resultados e discussão	30
5.1 Fermentação em diferentes concentrações de etanol	30
5.2 Fermentação em diferentes fontes de carbono	34
5.3 Efeito da 2-deoxiglicose no metabolismo de xilose	36
5.4 Análise do consumo e produtos da fermentação e cofermentação	37

6 Conclusões	43
7 Referências bibliográficas	44

1 Introdução

Com o aumento da preocupação mundial sobre energias renováveis, grandes esforços são destinados a encontrar uma solução para a descarbonização do setor de transportes. Uma dessas soluções é a utilização de biocombustíveis, nos quais, ao contrário dos combustíveis oriundos de matrizes fósseis, o carbono liberado durante a queima é novamente capturado pelas plantas na etapa de crescimento. Além disso, as biomassas vegetais são fontes renováveis, ou seja, possuem origem natural e são facilmente repostas. Contudo, uma das problemáticas levantadas quanto à produção de biocombustíveis, principalmente o bioetanol, é a possível competição entre essa e a indústria de alimentos por matéria-prima (GOES; MARRA, 2008; VIDAL, 2019).

Assim sendo, surge uma solução para que ambas as indústrias consigam utilizar seus insumos: os combustíveis de segunda geração (2G). Nesses, a produção é feita a partir de matérias-primas alternativas, como subprodutos agroindustriais, resíduos florestais e resíduos urbanos, que não seriam utilizados pela indústria alimentícia (VIDAL, 2019).

Apesar disso, existe uma problemática para a produção de bioetanol 2G: a disponibilidade de carboidratos. Ao final da hidrólise, há grande diversidade de pentoses e hexoses. Busca-se uma levedura que seja capaz de fermentar maior diversidade possível desses, uma vez que isso levaria a maior rendimento de etanol ao final da fermentação. A levedura mais utilizada na fermentação, *Saccharomyces cerevisiae*, é naturalmente incapaz de fermentar pentoses, por exemplo (RUBIN, 2008).

Para aumentar a eficiência dos processos fermentativos, é necessário encontrar microrganismos que sejam capazes de atender ao maior número possível de requerimentos do processo: resistir a grandes concentrações de produtos, ter facilidade de cultivo e manutenção, alta produtividade e a capacidade de fermentar pentoses e hexoses ao mesmo tempo. Assim, avalia-se a possibilidade da *M. caribbica*, previamente bioprospectada pelo grupo de pesquisa, cumprir os requisitos anteriores, tendo em vista mecanismos previamente observados em seu crescimento: a capacidade aparente de resistir a limoneno e álcool perílico, sendo o primeiro um terpeno tóxico para microrganismos e o segundo um produto com importância biotecnológica obtido a partir do limoneno (TEIXEIRA, 2019).

Desse modo, a hipótese desse trabalho é de que a *M. caribbica* desta linhagem é capaz de fermentar de maneira simultânea e eficiente pentoses e hexoses, em especial, glicose, xilose e arabinose, mesmo em altas concentrações de etanol, facilitando seu uso em resíduos de biomassa vegetal.

2 Revisão de literatura

2.1 Fermentação alcoólica

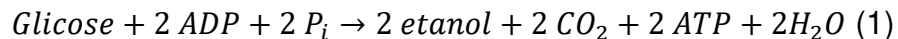
Segundo NELSON e COX (2011), fermentação é “um termo geral para a degradação anaeróbica da glicose ou de outros nutrientes orgânicos para obtenção de energia, conservada como ATP”. Hoje, essa definição já encontra-se desatualizada, com o conhecimento de leveduras que conseguem realizar fermentação aeróbica, conhecidas como leveduras *Crabtree* positivas, a fim de chegar à maiores concentrações celulares em grande disponibilidade de glicose (MALINA *et al.*, 2021). Autores mais recentes, como MAICAS (2020), trazem uma definição mais feral para o processo, sendo aquele no qual um organismo converte um carboidrato a um álcool ou ácido.

O processo fermentativo pode ser classificado em tipos dependendo do produto gerado. Os tipos de fermentação mais comuns são a fermentação láctica, quando há formação de ácido láctico, a fermentação acética, quando há formação de ácido acético, e a fermentação alcoólica (também conhecida como fermentação etanólica), quando o principal produto formado é o etanol.

A fermentação alcoólica é uma das tecnologias humanas mais antigas, mesmo que, potencialmente, descoberta por acidente. Existem registros de vasos de cerâmica no norte da China datados de aproximadamente nove mil anos atrás, contendo traços de uma bebida fermentada a base de uvas, mel e arroz (VIDRIH; HRIBAR, 2016). Achados arqueológicos recentes na Geórgia, datados da faixa de 6.000 a 5.000 a.C., mostram uma tradição industrial, ainda que primitiva, na produção de vinho, com jarros próprios para vinificação e armazenamento (MCGOVERN *et al.*, 2017). Na idade contemporânea, o químico e microbiologista francês Louis Pasteur foi o primeiro cientista a estudar a fermentação, entre os anos de 1850 e 1870, demonstrando que essa ocorre pela ação de organismos vivos (MAICAS, 2020). Atualmente, a fermentação alcoólica é um processo muito utilizado em grande quantidade de indústrias, como a de bebidas, de panificação, de combustíveis e de perfumaria, além de aplicações médicas e laboratoriais.

O processo da fermentação alcoólica consiste na conversão, sem participação de O₂ no processo, de piruvato (obtido no fim da glicólise) a etanol e gás carbônico, na proporção de 1:1:1, pela ação de duas enzimas: a piruvato-descarboxilase e a

álcool-desidrogenase. A primeira, com o auxílio de íons Mg^{2+} e uma coenzima denominada tiamina-pirofosfato, descarboxila o piruvato, resultando na formação de acetaldeído e gás carbônico. A segunda reduz o acetaldeído da reação anterior a etanol, utilizando uma molécula de NADH (NELSON; COX, 2011). A equação geral da produção de etanol a partir de glicose, portanto, é evidenciada abaixo (Equação 1).



Uma vez que a produção de ATP é baixa, quando comparada ao processo de respiração celular, há um maior consumo de glicose pelos organismos fermentadores, resultando em um acúmulo de etanol no meio (MAICAS, 2020).

A ausência da piruvato-descarboxilase em vertebrados impede que tais organismos realizem a fermentação alcoólica, sendo essa realizada apenas em certos tecidos vegetais, alguns invertebrados, protistas, bactérias e fungos (NELSON; COX, 2011). Por outro lado, a álcool-desidrogenase é encontrada em maior variedade de organismos, inclusive em humanos, tendo participação na oxidação do etanol ingerido, por exemplo.

2.2 Biocombustíveis e etanol de segunda geração

Com o aumento da preocupação mundial sobre energias renováveis, grandes esforços são destinados a encontrar uma solução para a descarbonização do setor de transportes. A queima de combustíveis fósseis, como o petróleo, o carvão e o gás natural, libera dióxido de carbono para a atmosfera, sendo esse um dos principais contribuintes para o desequilíbrio do efeito estufa, conhecido como aquecimento global (GOES; MARRA, 2008). Uma alternativa viável para esse problema é a produção e consumo de biocombustíveis.

Entende-se por biocombustíveis aqueles produzidos a partir de biomassas, como as agrícolas ou vegetais. Ao contrário das matrizes fósseis, o carbono liberado na queima dos biocombustíveis é novamente capturado pelas plantas na etapa de crescimento para utilização durante o processo de fotossíntese, resultando em um menor acúmulo dos gases na atmosfera. Destacam-se como biocombustíveis o biodiesel, obtido pela transesterificação de óleos extraídos da soja, mamona ou dendê, e o etanol, principalmente obtido pela fermentação de açúcares produzidos

e/ou derivados de culturas como a cana-de-açúcar, milho e mandioca (SOARES, 2009; SCHIRMER; RIBEIRO, 2017).

No Brasil, desde a década de 70, houve um incentivo governamental para maior produção e utilização de etanol combustível. O Programa Nacional do Álcool (Proálcool), aliado a um foco da indústria automobilística a produzir veículos movidos inteiramente a álcool, resultou na diminuição em cerca de 16% dos barris de petróleo utilizados como combustíveis. Apesar disso, o programa teve fim alguns anos depois, devido à queda do valor do petróleo e ao mito de que esse seria um recurso infinito. Hoje, com maior conhecimento sobre o assunto, grande parte dos veículos já consegue utilizar tecnologia *flex*, ou seja, os motores funcionam tanto pela combustão de gasolina quanto de etanol (SILVA; MIGOT; DA SILVA, 2019).

Atualmente, o Brasil registrou, na safra de 2019/20, a maior produção de etanol da história, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab): foram produzidos 35,6 bilhões de litros, representando um aumento de 7,5% em comparação a safra de 2018/19 (CONAB, 2020).

Contudo, uma das problemáticas levantadas quanto a produção de bioetanol é a possível competição entre essa e a produção de alimentos, ao passo em que a primeira drena matérias-primas potencialmente utilizadas pela indústria alimentícia. Assim sendo, surge uma solução para que ambas as indústrias consigam utilizar seus insumos: os combustíveis de segunda geração (2G).

Os combustíveis de segunda geração são aqueles produzidos a partir de resíduos alternativos, como resíduos agroindustriais, resíduos florestais e resíduos urbanos. Assim, destacam-se como vantagens em relação aos combustíveis convencionais a diminuição dos conflitos por terra para o cultivo de alimentos, o baixo custo das fontes e o menor impacto ambiental, uma vez que há menor emissão de dióxido de carbono quando comparado aos combustíveis de primeira geração (VIDAL, 2019).

Segundo a Federação das Indústrias do Estado de São Paulo, para cada tonelada de cana-de-açúcar cultivada, são gerados 260kg de resíduo seco de bagaço (FIESP, 2001). CONAB (2020) destaca que, para a safra de 2019/20, a produção de cana-de-açúcar pelo Brasil foi de mais de 642 milhões de toneladas, ou seja, cerca de 167 milhões de toneladas de bagaço. Esses dados mostram a grande capacidade de uso desses resíduos, tendo em vista que foi levado em consideração apenas um dos inúmeros que podem ser utilizados.

A principal dificuldade na produção do etanol 2G, contudo, é a baixa disponibilidade de açúcares fermentescíveis, uma vez que os carboidratos menores já foram extraídos em etapas anteriores. Assim sendo, sobram na matriz carboidratos mais complexos e ramificados, como a celulose e a hemicelulose, e lignina, um polímero de fenilpropanóides componente da parede celular vegetal (RUBIN, 2008).

Torna-se necessário, portanto, realizar um pré-tratamento na matéria prima, a fim de desconstruir sua estrutura para que enzimas possam penetrar na matriz. Os pré-tratamentos mais comuns podem ser ácidos, alcalinos ou hidrotérmicos (HARUN *et al.*, 2011; HARUN; DANQUAH, 2011; JAIN *et al.*, 2014).

Uma outra etapa necessária antes da fermentação é a sacarificação, na qual um conjunto de enzimas é utilizado a fim de hidrolisar os carboidratos da matriz a unidades menores, as quais as leveduras conseguem fermentar. Os carboidratos encontrados em cada matriz definem o conjunto de enzimas a ser utilizado em cada uma delas, contudo, destacam-se aquelas utilizadas em celulose e a hemicelulose devido ao alto teor desses polissacarídeos nas principais biomassas. Na primeira, as principais enzimas atuantes são a endoglucanase e a exoglucanase, que hidrolisam as ligações β -1,4 formando di ou trissacarídeos, e a β -glicosidase, que hidrolisam tais oligossacarídeos, formando monômeros de glicose. Por outro lado, a hemicelulose é um carboidrato muito mais ramificado e complexo em relação aos resíduos encontrados em sua cadeia. Assim, é necessária uma gama maior de enzimas a fim de eficientemente hidrolisar a cadeia. Para a xilana, o tipo de hemicelulose mais comum, por exemplo, é necessário o uso de endoxilanase (que hidrolisará a cadeia principal de xilose em mono, di ou trissacarídeos) e betaxilosidase (que hidrolisará os oligossacarídeos menores em xilose), além de outras enzimas para atuar nas ramificações e monômeros diferentes de xilose (β -galactosidase, α -arabinofuranosidase, feruloil-esterase, acetil-esterase, alfa-glucuranosidase, entre outras) (BERKA *et al.*, 2011; VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011). Esse processo é extremamente complexo e oneroso, sendo o principal entrave da produção de etanol 2G.

A etapa seguinte é a fermentação, realizada por leveduras. É válido pontuar a diversidade final de açúcares encontrada no mosto ao fim da etapa anterior: majoritariamente, é possível obter glicose e xilose, além de quantidade significativa de arabinose e outros carboidratos obtidos na hidrólise da hemicelulose (com teor

variado, dependendo da matéria prima). A principal levedura utilizada para fermentação é incapaz de metabolizar pentoses (como a xilose e a arabinose) (MOHD AZHAR *et al.*, 2017). Tais carboidratos, conforme apontado por AGUILAR *et al.* (2002) e BOUSSARSAR, ROGÉ e MATHLOUTHI (2009), correspondem a aproximadamente 26% da massa seca do bagaço de cana-de-açúcar, de modo que a não utilização desses se torna um desperdício para a indústria.

Por fim, para a obtenção do bioetanol, realiza-se uma destilação, com o intuito de obter maior pureza do álcool (KISS; SUSZWALAK, 2012).

2.3 Leveduras utilizadas na fermentação

Um dos principais fatores a ser considerado durante um processo fermentativo é o microrganismo utilizado. Leveduras são organismos unicelulares pertencentes ao reino Fungi. KURTZMAN, FELL e BOEKHOUT (2011) as definem como “os fungos cujo crescimento assexuado é predominantemente via brotamento ou fissão binária, e que não forma seu estado sexual dentro ou sobre um corpo de frutificação”. Cerca de 1500 espécies de leveduras agrupadas em mais de 100 gêneros foram isoladas até hoje, sendo encontradas em ambientes terrestres, aquáticos e atmosféricos, além de associadas a plantas, animais e insetos. Apesar disso, estimativas apontam que esse número corresponde a aproximadamente 1% das leveduras existentes (SATYNARAYANA; KUNZE, 2009).

A maioria das leveduras conhecidas são mesofílicas, com temperatura de maior crescimento entre 20 e 25 °C (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). A tolerância a diferentes temperaturas, contudo, varia entre as espécies. TINÔCO, GENIER e DA SILVEIRA (2021), por exemplo, demonstraram que a cepa CCT 7735 de *Kluyveromyces marxianus* foi capaz de crescer à temperatura de 45 °C. Por outro lado, a cepa de *Metschnikowia australis* W7-5, isolada na Antártica, foi capaz de crescer à temperatura de 5 °C (WEI *et al.*, 2021).

Além disso, as leveduras são também classificadas, em sua maioria, como anaeróbicas facultativas, ou seja, realizam respiração aeróbica em presença de oxigênio (convertendo carboidratos a CO₂ e água). Porém, na ausência de oxigênio, conseguem produzir energia realizando fermentação. Contudo, certas espécies, como as do gênero *Rhodotorula* e algumas do gênero *Cryptococcus*, são aeróbicas estritas, ou seja, não conseguem se desenvolver na ausência de oxigênio (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

A espécie de levedura mais amplamente utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, especialmente nas indústrias de bebidas e panificação. Isso se deve ao fato da levedura ser capaz de manter crescimento em ampla faixa de pH e temperaturas suficientemente altas para o processo fermentativo (LIN *et al.*, 2012). Outra vantagem de sua utilização é a capacidade de flocular, ou seja, sedimentar ao fim da fermentação. Isso garante maior facilidade nas etapas *downstream*, ao passo em que é uma maneira efetiva, simples e barata de separação no processo de produção, além de garantir maior produtividade (CHOI *et al.*, 2010; JIN; ALEX SPEERS, 1998).

Além disso, quando comparada com cepas de outros gêneros, leveduras dessa espécie foram capazes de resistir a maior concentração de etanol, o que também é um fator muito desejado em indústrias dependentes da fermentação alcoólica. A busca por leveduras capazes de tolerar maiores concentrações, contudo, continua sendo válida para a indústria etanoica, principalmente por permitir o desenvolvimento de processos mais produtivos (DE LA TORRE-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

A principal desvantagem do uso da *S. cerevisiae*, contudo, é a ausência de mecanismos celulares naturais para fermentar pentoses. Especialmente na indústria de biocombustíveis de segunda geração, como foi discutido anteriormente, essa desvantagem diminui significativamente a eficácia do processo, uma vez que a levedura não conseguirá fermentar todos os carboidratos disponíveis (MOHD AZHAR *et al.*, 2017; YOUNG; LEE; ALPER, 2010).

Alternativas para solucionar o problema previamente destacado são buscadas constantemente. Uma delas é a engenharia metabólica da levedura, na qual são adicionadas rotas metabólicas novas para a produção de moléculas de interesse (nesse caso, os transportadores de membrana e as enzimas que permitiriam a fermentação de pentoses). Essa técnica, contudo, é extremamente cara, uma vez que, como organismos complexos, a alteração de uma via pode alterar todo o sistema, de modo em que a produtividade teórica não é alcançada (DOĞAN *et al.*, 2014; LANE; DONG; JIN, 2018).

A segunda alternativa estudada é a bioprospecção. Essa consiste na busca em ambientes naturais de leveduras capazes de realizar o processo de interesse. O processo é significativamente mais barato do que o destacado anteriormente, porém, também mostra sua dificuldade, considerando a baixa fração de microrganismos que

potencialmente realizam o objetivo em relação a todos microrganismos possíveis de serem encontrados. Além disso, não se descarta a possibilidade de encontrar um microrganismo que supra uma necessidade, mas tenha uma outra desvantagem que dificulte o processo (por exemplo, um microrganismo capaz de fermentar pentoses e hexoses, mas com baixa resistência a etanol) (ROTTAVA *et al.*, 2010).

2.4 *Meyerozyma caribbica*

Anteriormente conhecida como *Pichia caribbica*, *M. caribbica* é uma levedura descrita como o estado ascospórico de *Candida fermentati* (VAUGHANMARTINI *et al.*, 2005). Algumas de suas aplicações biotecnológicas já são descritas em literatura, sendo a principal delas o biocontrole em frutas. CAO *et al.* (2013), por exemplo, descrevem a utilização da levedura no controle do apodrecimento de maçãs por mofo azul, causado pela espécie *Penicillium expansum*, e na degradação da micotoxina produzida por essa, a patulina. BAUTISTA-ROSALES *et al.* (2013) utilizam a levedura para controle do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, causador de antracnose em mangas. Essa é uma alternativa mais ecologicamente correta quando comparado ao uso de fungicidas químicos.

Os relatos do uso da levedura para fermentação alcoólica são escassos. Em Pernambuco, uma cepa de *M. caribbica* foi encontrada no inóculo preparado com leveduras selvagens para fermentação de cachaça artesanal (NOVA *et al.*, 2009). SAUCEDO-LUNA *et al.* (2011) estudam a aplicação da levedura na fermentação do bagaço de *Agave tequilana*, planta considerada ingrediente básico na produção de tequila, para produção de bioetanol, sendo uma solução possível para o descarte desse subproduto agroindustrial.

Algumas características do crescimento da levedura e das fontes de carbono possíveis de serem utilizadas por essa foram encontradas em estudos a nível laboratorial. HANDE, MAHAJAN e PRABHUNE (2013) isolaram uma cepa de *M. caribbica*, denominada BY2, de bananas maduras em meio enriquecido com xilose. Em condição estática, a 28 °C, a levedura foi capaz de fermentar eficientemente glicose, sacarose, manose e galactose. Contudo, quando submetida a condição de agitação, na mesma temperatura, a levedura conseguiu fermentar os carboidratos previamente citados com a mesma eficiência, além de fermentar também xilose e pequenas quantidades de arabinose e celobiose. Esse fato pode se mostrar útil, ao ponto em que demonstra que a levedura em questão é capaz de fermentar pentoses

e hexoses, habilidade ausente em *S. cerevisiae*. Ao mesmo tempo, a capacidade de fermentar arabinose também é um fator importante, visto que o organismo mais eficiente na fermentação de xilose, *Pichia stipitis*, é incapaz de fazê-lo (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

Além disso, ao fermentar o hidrolisado de bagaço de *Agave tequilana*, SAUCEDO-LUNA *et al.* (2011) demonstraram que, a partir da décima-segunda hora de fermentação, a levedura foi capaz de fermentar simultaneamente glicose e xilose. Esse achado é mais um ponto positivo para a utilização da levedura na fermentação do bioetanol de segunda geração. Em alguns microrganismos utilizados para essa função, a glicose extracelular atua como inibidor de transportadores de pentoses, uma vez que essas têm menor afinidade com o transportador do que a glicose (HANS-HAGERDAL *et al.*, 2007). Sendo assim, as células apenas passam a utilizar xilose quando há baixa concentração de glicose, o que aumenta o tempo para o consumo de todo carboidrato no meio (WU *et al.*, 2016). Cofermentar xilose e glicose é uma habilidade positiva, ao passo em que diminui o tempo de fermentação e, conseqüentemente, aumenta a eficiência do processo.

A levedura a ser utilizada nesse trabalho foi bioprospectada em um trabalho anterior do grupo de pesquisa, via parceria com a Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (TEIXEIRA, 2019). Com o objetivo de isolar microrganismos com capacidade de resistir a limoneno, terpeno com aroma cítrico tóxico a microrganismos, e álcool perílico, um produto com importância biotecnológica obtido da metabolização de limoneno, uma cepa de *M. caribbica* foi isolada de frutos de lobeira (*Solanum lycocarpum*) (SUN, 2007). O estudo demonstrou crescimento exponencial em meio com 2% de limoneno, ao contrário das outras leveduras utilizadas (*Saccharomyces cerevisiae*, *Spathaspora arborariae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Spathaspora passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis*), que apresentaram crescimento discreto. As demais leveduras mantiveram crescimento baixo em concentrações superiores de limoneno (até 6%), enquanto a *M. caribbica* apresentou crescimento acentuado em até 10% do terpeno.

A fim de entender o mecanismo responsável por essa resistência, TEIXEIRA (2019) realizou um estudo de genômica comparativa para identificar possíveis genes relacionados à função. Nessa análise, foram encontrados 58 grupos de genes exclusivos de *M. caribbica*, divididos em sete categorias de proteínas: adesão celular, autofagia, enzimas, fatores de transcrição, repetições ricas em leucina,

oxirredução e transportadores, além de proteínas hipotéticas. Dessas categorias, a mais representativa foi a de transportadores, da qual todas as proteínas foram relacionadas à superfamília dos facilitadores majoritários (MFS). Nessa família, encontram-se transportadores responsáveis pela absorção de nutrientes, bem como liberação de substâncias tóxicas (QUISTGAARD *et al.*, 2016).

O doseamento intracelular de limoneno realizado por TEIXEIRA (2019), associado à indução de expressão de genes codificadores de transportares na presença de metabólitos tóxicos, corrobora com a teoria de que transportadores MFS estariam relacionados à maior eficiência da levedura em tais condições estressantes, uma vez que foi encontrada concentração de limoneno intracelular aproximadamente 50% menor em células de *M. caribbica* quando comparadas às de outras leveduras.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de *M. caribbica* fermentar individualmente e em conjunto glicose e xilose/arabinose e caracterizar a resistência da levedura a etanol.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade de *M. caribbica* em diferentes concentrações de etanol;
- Avaliar a fermentação de glicose, xilose e arabinose por *M. caribbica*;
- Avaliar a cofermentação de glicose e xilose/arabinose por *M. caribbica*;
- Verificar a existência de mecanismos clássicos de repressão em *M. caribbica*.

4 Metodologia

4.1 Manutenção dos microorganismos e meios de cultivo

Todas as leveduras utilizadas nesse trabalho pertencem ao acervo do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM) da Universidade Federal de Viçosa. A principal levedura utilizada para esse estudo, *Meyerozyma caribbica*, foi previamente isolada de frutos de lobeira, em um trabalho em parceria com a Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (TEIXEIRA, 2019), enquanto as leveduras controles utilizadas foram as estirpes *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 e *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. As leveduras foram mantidas em meio YPG (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de peptona, 20% (v/v) de glicerol e 40 g.L⁻¹ de glicose), conservados a -80 °C para armazenamento e a -20 °C para ativação de rotina.

Prévio a cada ensaio, as leveduras foram crescidas por 18h em meio YEPG (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de peptona, 40 g.L⁻¹ de glicose), em tubos de ensaio, a 150 rpm e 30 °C, centrifugados a 8.000 g por 5 minutos e ressuspensas no meio a ser utilizado.

4.2 Teste de resistência a etanol

Com o objetivo de testar a resistência da levedura a etanol, essa foi incubada em meio contendo 40g.L⁻¹ de glicose e concentrações variadas do álcool: 0, 2, 4, 8 e 16% (v/v), em meio YP. As condições do experimento foram de 30 °C, em ambiente de microaerobiose (microplacas de 96 poços vedadas com filme plástico adesivo), sem agitação. Como controles, foram utilizadas as leveduras *K. marxianus*, que possui baixa resistência a etanol, atuando como controle negativo, e *S. cerevisiae*, com alta resistência a etanol, como controle positivo. Ao final, foi avaliado o desenvolvimento, a viabilidade e a capacidade de recuperação das leveduras após as condições estressantes pela avaliação da densidade ótica, contagem com coloração com azul de metileno e plaqueamento em meio sólido (LEE; ROBINSON; WANG, 1981; WANG; SHOPSIS; SCHNEIDER, 1980).

O desenvolvimento da levedura foi testado pela construção de uma curva de crescimento para cada levedura e cada tratamento, a partir da correlação entre a da densidade ótica a 600 nanômetros e o tempo de fermentação (de zero a 48 horas, em intervalos de meia hora). A densidade ótica inicial foi ajustada para

aproximadamente 0,2, sendo o experimento realizado considerando triplicata biológica. A absorbância foi medida utilizando leitor de microplacas, com curvas construídas pelo software Softmax Pro versão 5.3 e posteriormente analisadas utilizando o software Microsoft Office Excel, versão 2016. A velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) foi calculada a partir da regressão linear do logaritmo natural da densidade ótica pelo tempo em horas, na fase exponencial.

A viabilidade das leveduras após as 48 horas foi aferida utilizando contagem em câmara de Neubauer após coloração com azul de metileno, em procedimento adaptado de KWOLEK-MIREK e ZADRAG-TECZA (2014). Diluiu-se 10 μL do meio de cultura obtido ao final da etapa anterior em 80 μL de água, aos quais foram adicionados 10 μL de solução de azul de metileno. Após 10 minutos de reação, 10 μL dessa mistura foram depositadas sobre câmara de Neubauer. Foi realizada a contagem das células totais e das células mortas (aquelas ainda coloridas em azul por não terem metabolizado o corante). As células viáveis foram obtidas pela diferença entre tais valores, sendo a porcentagem de viabilidade calculada pela Equação 2.

$$\%viabilidade = \frac{(\text{células totais} - \text{células mortas})}{\text{células totais}} \quad (2)$$

Por fim, a capacidade de recuperação foi testada pelo plaqueamento em meio sólido. Partindo do meio de cultivo obtido na microplaca, realizou-se diluição seriada com fatores de diluição de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , os quais foram plaqueados em meio YEPG sólido (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de peptona, 40 g.L⁻¹ de glicose e 2% (m/v) de ágar) pela técnica de *single plate-serial dilution spotting* (SP-SDS) (THOMAS *et al.*, 2015). As placas foram seladas com plástico filme, invertidas e incubadas em estufa microbiológica a 30 °C por 24 horas. Os registros do crescimento foram feitos com fotodocumentador.

4.3 Ensaio de fermentação e cofermentação de glicose, xilose e arabinose

A primeira etapa utilizada para avaliar o potencial de fermentação de *M. caribbica* foi a construção de curva de crescimento em placa de 96 poços, em condições semelhantes as destacadas no item 4.2. Dessa vez, contudo, não houve adição de etanol, mas foram testadas diferentes composições de carboidratos no meio. Para os ensaios de fermentação, testou-se, individualmente, a adição ao meio

YP de 40 g.L⁻¹ de glicose, 40 g.L⁻¹ de xilose ou 40 g.L⁻¹ de arabinose. Para os testes de cofermentação, utilizou 20 g.L⁻¹ de glicose em meio YP, ao qual foi adicionado, individualmente, 20 g.L⁻¹ de xilose ou 20 g.L⁻¹ de arabinose. Foi construída uma curva de crescimento relacionando densidade ótica e tempo para esse ensaio, com pontos analisados em intervalos de 30 minutos durante 48 horas. A partir dessa curva, foi possível calcular a velocidade específica de crescimento, μ , a partir da inclinação da reta obtida relacionando o logaritmo natural das densidades óticas com o tempo de fermentação. Como controles, utilizou-se as leveduras *K. marxianus*, controle positivo capaz de fermentar pentoses, e *S. cerevisiae*, controle negativo incapaz de fermentar pentoses. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4 Efeito da 2-deoxiglicose no metabolismo de xilose

A fim de testar a presença de mecanismos de repressão clássica por glicose, as leveduras foram plaqueadas em meio YP sólido acrescido de 40 g.L⁻¹ de xilose e 0,5% (m/v) de 2-deoxiglicose (2-DG), além de meios YP sólidos contendo 40 g.L⁻¹ de glicose ou 40 g.L⁻¹ de xilose, sem adição de 2-DG, para controle dos resultados. As leveduras foram inoculadas pela técnica de SP-SDS e as placas foram cultivadas em estufa microbiológica, a 30 °C, durante 24 horas. O ensaio foi realizado em duplicata e utilizou como controle as mesmas leveduras utilizadas anteriormente, contudo, dessa vez, ambas como controle negativo: a *K. marxianus*, por possuir mecanismos de repressão clássica (RIBEIRO *et al.*, 2013), e a *S. cerevisiae*, por ser incapaz de fermentar a xilose.

4.5 Relação entre absorbância a 600nm e massa celular seca (g.L⁻¹)

Para determinação da massa celular seca, a fim de posteriormente calcular os parâmetros fermentativos e de crescimento, utilizou protocolo adaptado de SILVEIRA (2014). Inicialmente, as leveduras foram inoculadas em erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de meio YP acrescido de carboidratos (para a fermentação, 40 g.L⁻¹ de glicose ou 40 g.L⁻¹ de xilose; para a cofermentação, 20 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de xilose). Após 18 horas de cultivo em estufa microbiológica a 30 °C e 150 rpm, o meio foi centrifugado a 8000 g por 5 min e ressuspenso em 6 mL de água destilada estéril. Foram retiradas alíquotas para secagem, bem como preparadas as seguintes diluições para o processo: 10⁻¹, 10⁻², 2x10⁻², 3x10⁻² e 4x10⁻². Todas tiveram

suas densidades óticas medidas e posteriormente foram secas em estufa a 90 °C por 24 horas (MALAIRUANG *et al.*, 2020), com peso medido utilizando balança analítica até constância. As retas de correlação foram construídas em software Microsoft Office Excel 2016, sendo uma para cada levedura e cada tratamento. As equações que definem a *M. caribbica* em fermentação de glicose (Equação 3), xilose (Equação 4) e cofermentação de glicose e xilose (Equação 5), *K. marxianus* em fermentação de glicose (Equação 6), xilose (Equação 7) e cofermentação de glicose e xilose (Equação 8) e *S. cerevisiae* em fermentação de glicose (Equação 9) e cofermentação de glicose e xilose (Equação 10) são mostradas abaixo, sendo Y o valor de absorbância e X a massa celular seca (g.L⁻¹).

$$y = 0,5275x + 0,0342$$

$$R^2 = 0,9809 \quad (3)$$

$$y = 0,7452x + 0,035$$

$$R^2 = 0,9789 \quad (4)$$

$$y = 0,7124x + 0,07$$

$$R^2 = 0,9901 \quad (5)$$

$$y = 0,4437x + 0,0414$$

$$R^2 = 0,9812 \quad (6)$$

$$y = 0,8056x + 0,0364$$

$$R^2 = 0,9887 \quad (7)$$

$$y = 0,4814x + 0,0398$$

$$R^2 = 0,9866 \quad (8)$$

$$y = 0,4568x + 0,0552$$

$$R^2 = 0,9834 \quad (9)$$

$$y = 0,5474x + 0,0135$$

$$R^2 = 0,9922 \quad (10)$$

4.6 Análise do consumo e produtos da fermentação e cofermentação

A capacidade de fermentar diferentes carboidratos foi melhor detalhada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Inicialmente, as leveduras foram incubadas em meio YP acrescido dos carboidratos de interesse (para a fermentação, 40 g.L⁻¹ de glicose ou 40 g.L⁻¹ de xilose; para a cofermentação, 20 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de xilose), a temperatura de 30 °C e rotação de 150 rpm. As leveduras foram incubadas em erlenmeyers de 50 mL preenchidos a 20% do volume total (10 mL), com população inicial padronizada a partir da densidade ótica a 600 nanômetros (0,5). Os frascos foram tapados com tampão de algodão para permitir a passagem de ar. Os ensaios foram realizados em triplicata, durante o tempo de 48 horas.

Foram retiradas alíquotas aos tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 horas. A partir dessas, foi possível medir a densidade ótica do meio reacional. Em seguida, centrifugou essa alíquota (8.000 g, 5 minutos). O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm e congelado para análise em HPLC.

O consumo de açúcares e produção de metabólitos (etanol, glicerol e xilitol) foi avaliado utilizando coluna de troca iônica HPX-87H (BIO-RAD), mantida a 45 °C, acoplada a detector SPD-20A. A fase móvel utilizada foi solução de ácido sulfúrico a 5 mM, com taxa de eluição de 0,7 mL.min⁻¹. Para o ensaio, também foram preparados padrões de glicose, xilose, glicerol, xilitol, nas concentrações de 5, 10, 20, 25, 40, 50, 75 e 100 mM, e etanol, nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 e 200 mM. Um sexto padrão também foi preparado, consistindo na mistura de glicose, xilose e xilitol, para os ensaios de cofermentação, nas mesmas concentrações dos primeiros padrões mencionados, uma vez que os tempos de retenção desses compostos são semelhantes.

4.7 Parâmetros fermentativos e de crescimento

A partir dos dados obtidos na etapa anterior, foram calculados os parâmetros da fermentação de rendimento de conversão de substrato em etanol ($Y_{p/s}$), produtividade de etanol (Q_p), rendimento de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$) e eficiência de fermentação ($Y(\%)$) (MENDES *et al.*, 2013; RIBEIRO, 2017).

O rendimento de conversão de substrato em etanol foi calculado pela divisão entre a diferença da massa final e inicial de etanol pela massa inicial e final de açúcares, conforme a equação 11.

$$Y_{p/s} = \frac{\text{massa de etanol final} - \text{massa de etanol inicial}}{\text{massa de açúcares inicial} - \text{massa de açúcares final}} \quad (11)$$

O rendimento de conversão de substrato em célula foi calculado pela divisão da diferença da massa celular durante o processo pela quantidade usada de açúcares durante a fermentação, conforme a equação 12.

$$Y_{x/s} = \frac{\text{massa celular final} - \text{massa celular inicial}}{\text{massa de açúcares inicial} - \text{massa de açúcares final}} \quad (12)$$

A produtividade de etanol foi calculada dividindo a diferença da concentração máxima de etanol pelo tempo de maior produção do álcool, conforme a equação 13.

$$Q_p = \frac{\text{concentração de etanol final} - \text{concentração de etanol inicial}}{\text{tempo de maior produção de etanol}} \quad (13)$$

Por fim, a eficiência de fermentação foi calculada pela diferença do valor de $Y_{p/s}$ encontrado nesse experimento e o seu valor teórico (0,51 gramas de etanol por grama de carboidrato), conforme equação 14.

$$Y(\%) = \frac{Y_{p/s}}{0,51} \quad (14)$$

4.8 Análises estatísticas

Para as análises de viabilidade, as análises estatísticas foram realizadas via construção de ANOVA, seguida de teste T de Tukey, a nível de significância de 0,05, por meio do pacote de análise de dados do software Microsoft Office Excel (2016).

Para a comparação das curvas de crescimento a diferentes concentrações de etanol e a diferentes carboidratos, as análises estatísticas foram realizadas com ANOVA unilateral, seguida de teste Bonferroni, a nível de significância de 0,05. Dessa vez, o software utilizado foi GraphPad Prism 9.3.1.

5 Resultados e discussão

5.1 Fermentação em diferentes concentrações de etanol

A Figura 1 mostra o crescimento das leveduras testadas em variadas concentrações de etanol, a 30 °C.

Os resultados mostram que a *Meyerozyma caribbica* tem maior resistência a etanol entre 0 e 4%. A partir de 8%, há uma diminuição na velocidade de crescimento, sendo essa redução ainda mais drástica em 16% do álcool.

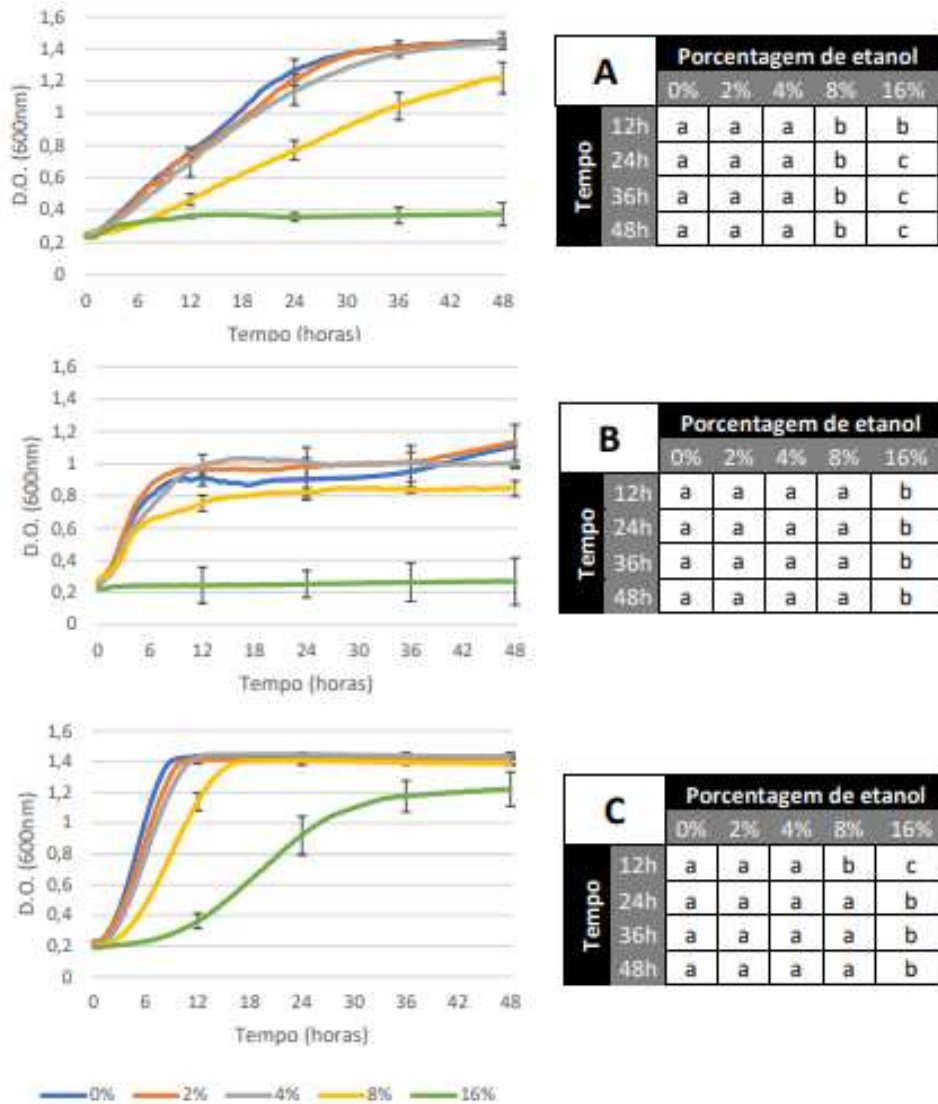
Como esperado, a *S. cerevisiae* teve resistência a todas as concentrações testadas. A maior concentração, 16%, reduziu parcialmente o crescimento, mas não o suficiente para que a levedura não reproduzisse. MA e LIU (2010) citam mutantes da levedura capazes de crescer em até 20% de álcool, mostrando a eficiência do uso da espécie em tal condição estressante.

Por outro lado, a população final de *K. marxianus* é relativamente menor do que a de *M. caribbica*. COSTA *et al.* também mostra uma redução significativa do crescimento da espécie a 8% de etanol e 30 °C. A 16% do álcool o crescimento foi insignificante, considerando o desvio padrão.

Segundo HUGOT e JENKINS (2014), a densidade do bagaço armazenado, com umidade de 44%, é de 176,2g.L⁻¹. CHANDEL *et al.* (2011), por outro lado, aponta que, da massa seca do material, 67,7% correspondem a celulose e hemicelulose. Com esses valores, concluímos que um litro de bagaço de cana pode possuir, no máximo, 66,8g de açúcares fermentescíveis. Partindo do rendimento teórico de formação de etanol (0,51 grama de etanol por grama de carboidrato), a quantidade máxima de etanol possível de ser formada a partir de um litro de bagaço de cana é 34,06g.L⁻¹.

Utilizando a densidade do etanol, 789g.L⁻¹, convertemos essa concentração para porcentagem (v/v), chegamos a uma solução de aproximadamente 4,3% de etanol. Em tal concentração, nenhuma das leveduras estudadas teve crescimento fortemente inibido, prevalecendo assim as leveduras que possuem maiores rendimentos e velocidades de crescimento. SILVEIRA (2014) também chegou à conclusão que a levedura *Meyerozyma guilliermondii*, levedura do mesmo gênero da *M. caribbica*, não teria grande perda de atividade partindo do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar.

Figura 1 - Variação na densidade ótica a 600 nanômetros das leveduras (A – *Meyerozyma caribbica*; B- *Kluyveromyces marxianus*; C- *Saccharomyces cerevisiae*) em diferentes concentrações de etanol através do tempo. As cores representam as concentrações de etanol testadas, sendo azul para 0%, vermelho para 2%, cinza para 4%, amarelo para 8% e verde para 16%. Os desvios padrões são apresentados nos pontos de 12, 24, 36 e 48 horas, sendo as diferenças significativas pelo teste de Bonferroni a 5% de significância apresentadas nos quadros ao lado. Letras numa mesma linha para cada quadro não diferem entre si.



Fonte: o autor.

Comparando as velocidades específicas de crescimento máximas (Tabela 1) com as populações máximas alcançadas, nota-se que a levedura com menor velocidade, no geral, foi a *M. caribbica*. Contudo, o crescimento levou à população máxima semelhante ao observado em *S. cerevisiae*, ao contrário de *K. marxianus*

que, apesar de ter velocidade de crescimento alta, alcançou menor população máxima.

Tabela 1 – Velocidade específica de crescimento e população máxima alcançada para cada levedura em variadas concentrações de etanol.

		Concentração de etanol				
		0%	2%	4%	8%	16%
<i>Meyerozyma caribbica</i>	$\mu_{\text{máx}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,126	0,115	0,097	0,055	0,018
	D.O. 600nm, máx	1,450	1,439	1,443	1,221	0,375
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	$\mu_{\text{máx}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,218	0,209	0,155	0,168	0,030
	D.O. 600nm, máx	1,106	1,135	1,032	0,849	0,270
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\mu_{\text{máx}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0,238	0,223	0,230	0,181	0,077
	D.O. 600nm, máx	1,434	1,422	1,450	1,408	1,221

Fonte: o autor.

Os resultados apresentados nos gráficos anteriores são corroborados pelo teste de viabilidade em azul de metileno, apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultado do teste de viabilidade com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer. A contagem de células mostra as células totais, vivas e mortas, enquanto a viabilidade leva em consideração a razão das células vivas pelas células totais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas devem ser comparadas por colunas, enquanto as letras minúsculas por linhas.

		Concentração de etanol				
		0%	2%	4%	8%	16%
<i>Meyerozyma caribbica</i>	Células/mL	$3,4 \times 10^8$ Aa	$3,3 \times 10^8$ Aa	$3,6 \times 10^8$ Aa	$1,4 \times 10^8$ ABb	$1,6 \times 10^7$ Ac
	Viabilidade	93%	91%	85%	84%	45%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Células/mL	$4,5 \times 10^8$ Ba	$3,3 \times 10^8$ Ab	$3,4 \times 10^8$ Ab	$1,7 \times 10^8$ Bc	$1,8 \times 10^8$ Bc
	Viabilidade	95%	96%	95%	93%	92%
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Células/mL	$1,0 \times 10^8$ Ca	$1,3 \times 10^8$ Ba	$1,1 \times 10^8$ Ba	$1,1 \times 10^8$ Aa	$1,1 \times 10^7$ Cb
	Viabilidade	78%	79%	74%	72%	29%

Fonte: o autor.

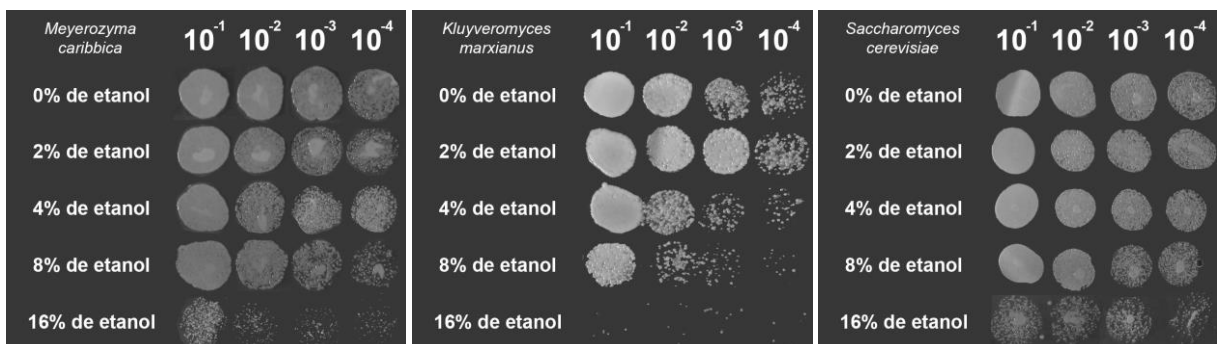
Como mostrado, a exposição da levedura a 48 horas na maior concentração de etanol levou a uma diminuição significativa na quantidade de células viáveis, especialmente em *M. caribbica* e *K. marxianus*.

Foi notado, durante a contagem, que nas maiores concentrações do álcool, as células sobre a área de contagem tinham tamanho reduzido, se comparadas àquelas em meio com baixa concentração de etanol. STANLEY *et al.* (2010) evidenciam que um dos mecanismos do stress de leveduras a essa condição, além da inibição do crescimento e divisão, é a diminuição do volume celular. Dessa forma, há menor contato entre superfície celular e meio, uma vez que o etanol presente nesse pode causar a lise das células.

Parte da perda de viabilidade notada também pode ser explicada pela falta de nutrientes disponíveis no meio. Nota-se que na maioria dos tratamentos foi demonstrado um *plateau* de crescimento, provavelmente devido à escassez da glicose disponibilizada no meio (BROACH, 2012).

Assim como no teste de viabilidade com azul de metileno, observou-se um padrão quando as leveduras foram plaqueadas em meio sólido, como mostrado na Figura 2. Maiores concentrações de etanol levaram a formação de menor número de colônias, resultado que corrobora com a população máxima alcançada nos testes anteriores.

Figura 2 - Plaqueamento de *M. caribbica*, *K. marxianus* e *S. cerevisiae* em meio sólido após 48 horas de estresse em variadas concentrações de etanol.

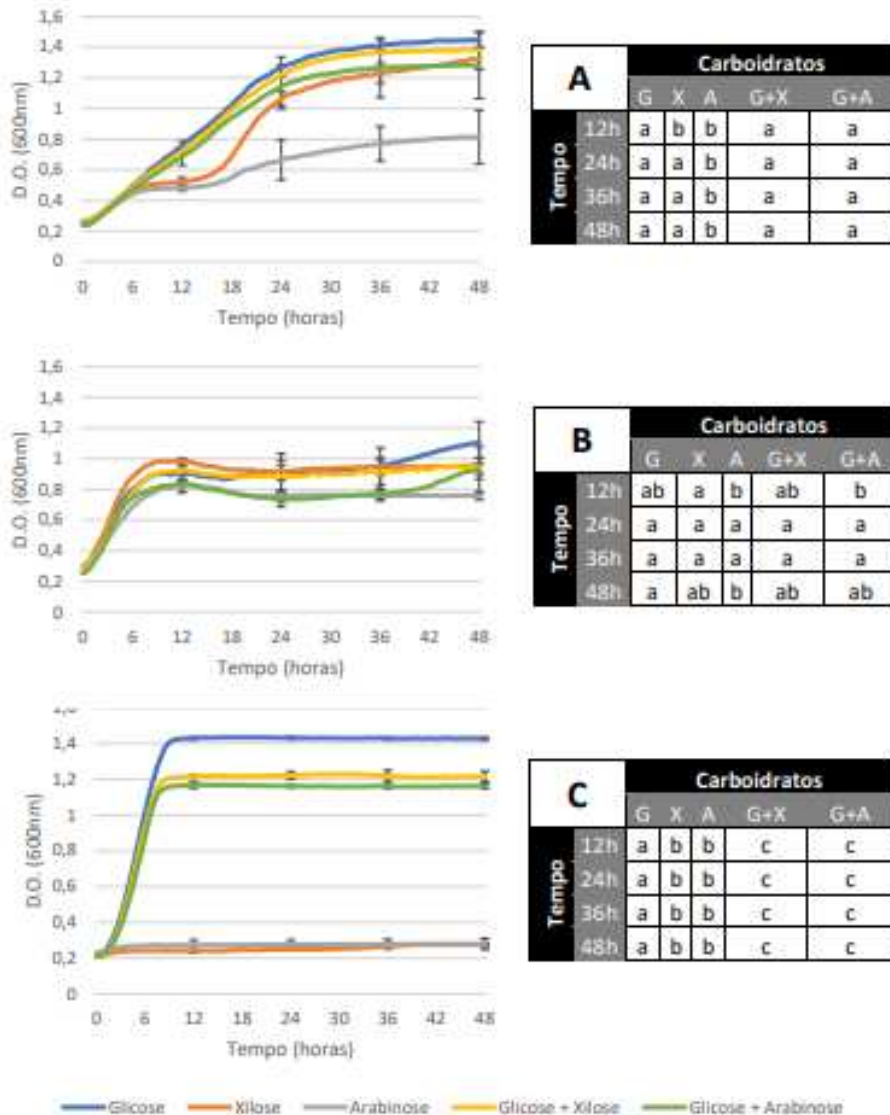


Fonte: o autor.

5.2 Fermentação em diferentes fontes de carbono

As leveduras foram crescidas em meios contendo glicose, xilose e arabinose a 40 g.L⁻¹, bem como cofermentação com 20 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de xilose ou arabinose. Os resultados são mostrados na Figura 3 e Tabela 3.

Figura 3 - Variação na densidade ótica a 600 nanômetros das leveduras (A – *Meyerozyma caribbica*; B- *Kluyveromyces marxianus*; C- *Saccharomyces cerevisiae*) em diferentes carboidratos através do tempo. As cores as fontes de carbono testadas, sendo azul para glicose, vermelho para xilose, cinza para arabinose, amarelo para cofermentação de glicose e xilose e verde para cofermentação de glicose e arabinose. Os desvios padrões são apresentados nos pontos de 12, 24, 36 e 48 horas, sendo as diferenças significativas pelo teste de Bonferroni a 5% de significância apresentadas nos quadros ao lado. Letras numa mesma linha para cada quadro não diferem entre si.



Fonte: o autor.

Tabela 3 – Velocidade específica de crescimento e população máxima alcançada para cada levedura em variadas fontes de carbono.

		Fonte de carbono				
		G	X	A	G+X	G+A
<i>Meyerozyma caribbica</i>	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	0,126	0,100	0,106	0,120	0,108
	D.O. 600nm, máx	1,450	1,326	1,428	1,383	1,281
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	0,218	0,208	0,137	0,183	0,222
	D.O. 600nm, máx	1,106	0,953	0,758	0,936	0,925
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	0,238	0,005	0,008	0,270	0,268
	D.O. 600nm, máx	1,434	0,275	0,279	1,216	1,161

Fonte: o autor.

Quando se avalia as leveduras controle, essas tiveram comportamento esperado segundo a literatura. *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar pentoses, por isso não houve crescimento na presença desses carboidratos individualmente. Em co-fermentação, houve crescimento, mas menor se comparado ao crescimento em meio apenas acrescido de glicose, uma vez que a concentração no primeiro é metade da do segundo. Por outro lado, todos perfis de fermentação pela *K. marxianus* foram bem semelhantes, uma vez que a levedura consegue utilizar os três carboidratos disponibilizados a ela.

Meyerozyma caribbica, por sua vez, também mostrou padrão de crescimento semelhante ao encontrado na literatura. HANDE, MAHAJAN e PRABHUNE (2013) mostraram que a levedura é capaz de crescer em meio contendo apenas arabinose, como foi visto nesse estudo, mesmo que em menor velocidade se comparado às outras fontes de carbono. Isso é um fator positivo pois, como AGBOGBO e COWARD-KELLY (2008) destacam, o organismo mais eficiente na fermentação de xilose, *Pichia stipitis*, é incapaz de fazê-lo.

Os crescimentos de *M. caribbica* com glicose, xilose e cofermentação não diferiram entre si, sendo esse um fator positivo para a utilização dessa levedura no processo de produção de etanol 2G. Nesses casos, é importante saber as concentrações de nutrientes gasta e de produtos formados, bem como os parâmetros fermentativos do processo. Por isso, em sequência, esses tratamentos foram submetidos a avaliação em HPLC para determinação de tais concentrações, resultados que serão abordados posteriormente.

No período de 6-12h para o crescimento em xilose e arabinose houve uma redução na velocidade de crescimento. Isso provavelmente ocorreu para adaptação da levedura ao novo meio, agora com um carboidrato diferente. É provável que houvesse resíduos de glicose no meio para observação de tal comportamento diáuxico (BUSTI *et al.*, 2010).

5.3 Efeito da 2-deoxiglicose no metabolismo de xilose

As três leveduras estudadas foram incubadas em meio contendo 4% de xilose e 0,5% de 2-DG, bem como 4% de glicose ou 4% de xilose (sem 2-DG) como controles. Essa etapa visou avaliar se existe regulação negativa por parte da glicose em relação às pentoses, uma vez que a 2-DG pode ser transportada para dentro da célula, mas não é oxidada. Assim sendo, em caso de regulação negativa, a célula morrerá por falta de energia, uma vez que não conseguirá metabolizar a 2-DG nem absorver as pentoses do meio.

Não houve crescimento para nenhuma das leveduras testadas cultivadas em meio contendo 2-DG (Figura 4). *K. marxianus* já é conhecida na literatura por sofrer repressão clássica (RIBEIRO *et al.*, 2021). *S. cerevisiae*, por outro lado, não consegue fermentar a 2-DG do meio, tampouco a xilose, tendo crescimento interrompido por falta de energia.

Figura 4 - Plaqueamento das leveduras testadas em glicose (G), xilose (X) e xilose com 0,5% de 2-DG (X+2-DG).



Fonte: o autor.

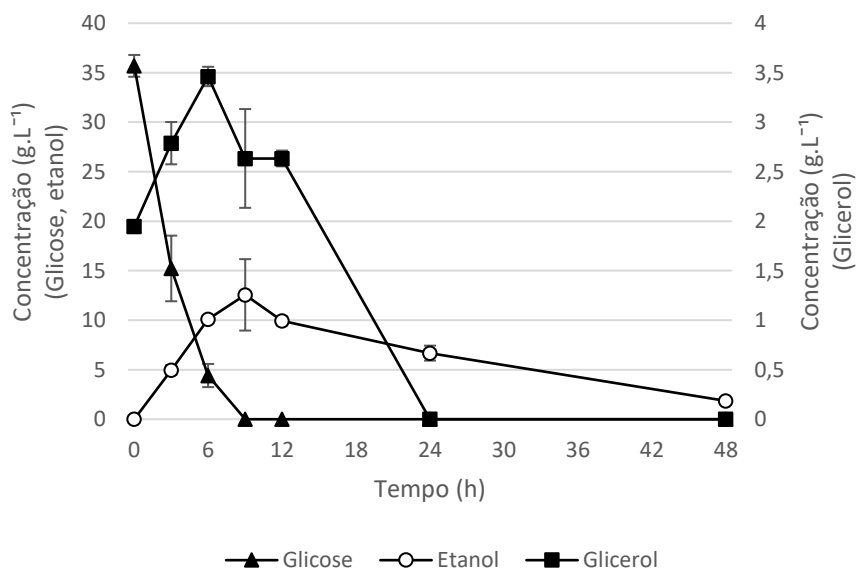
Com esses dados, acredita-se, portanto, que a *M. caribbica* sofra repressão clássica, uma vez que não houve formação de colônias na placa.

5.3 Análise do consumo e produtos da fermentação e cofermentação

A quantificação dos produtos formados e nutrientes gastos foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados foram dados pelas médias das triplicatas e plotados em gráficos relacionando a concentração e o tempo.

Inicialmente, esse ensaio foi realizado considerando tempo máximo de 48h. Contudo, nas últimas 24 horas, notou-se consumo muito grande da quantidade de etanol no meio, uma vez que as demais fontes de carbono haviam acabado. Na fermentação de glicose por *M. caribbica*, por exemplo, a quantidade máxima de etanol encontrada foi de 12,6g.L⁻¹, no tempo de 9 horas. Ao final das 48 horas, contudo, a concentração de etanol no meio era de 1,8g.L⁻¹, menos de 15% da quantidade inicial (Figura 5). Acredita-se que a levedura tenha utilizado o etanol no meio como fonte de carbono devido à escassez de nutrientes, mudando seu mecanismo de obtenção de energia para respiração (BUSTI *et al.*, 2010). Uma vez que as concentrações dos metabólitos no meio influenciam o cálculo dos parâmetros cinéticos, optou por considerá-los até 24 horas, momento em que, na maior parte dos tratamentos, ainda existiam fontes de carbono no meio (glicose, xilose, glicerol e/ou xilitol). Esse resultado ainda se mostra como muito importante, uma vez que explicita a necessidade de considerar o tempo máximo de fermentação em relação a disponibilidade de nutrientes, quando visa-se maior produção possível de etanol.

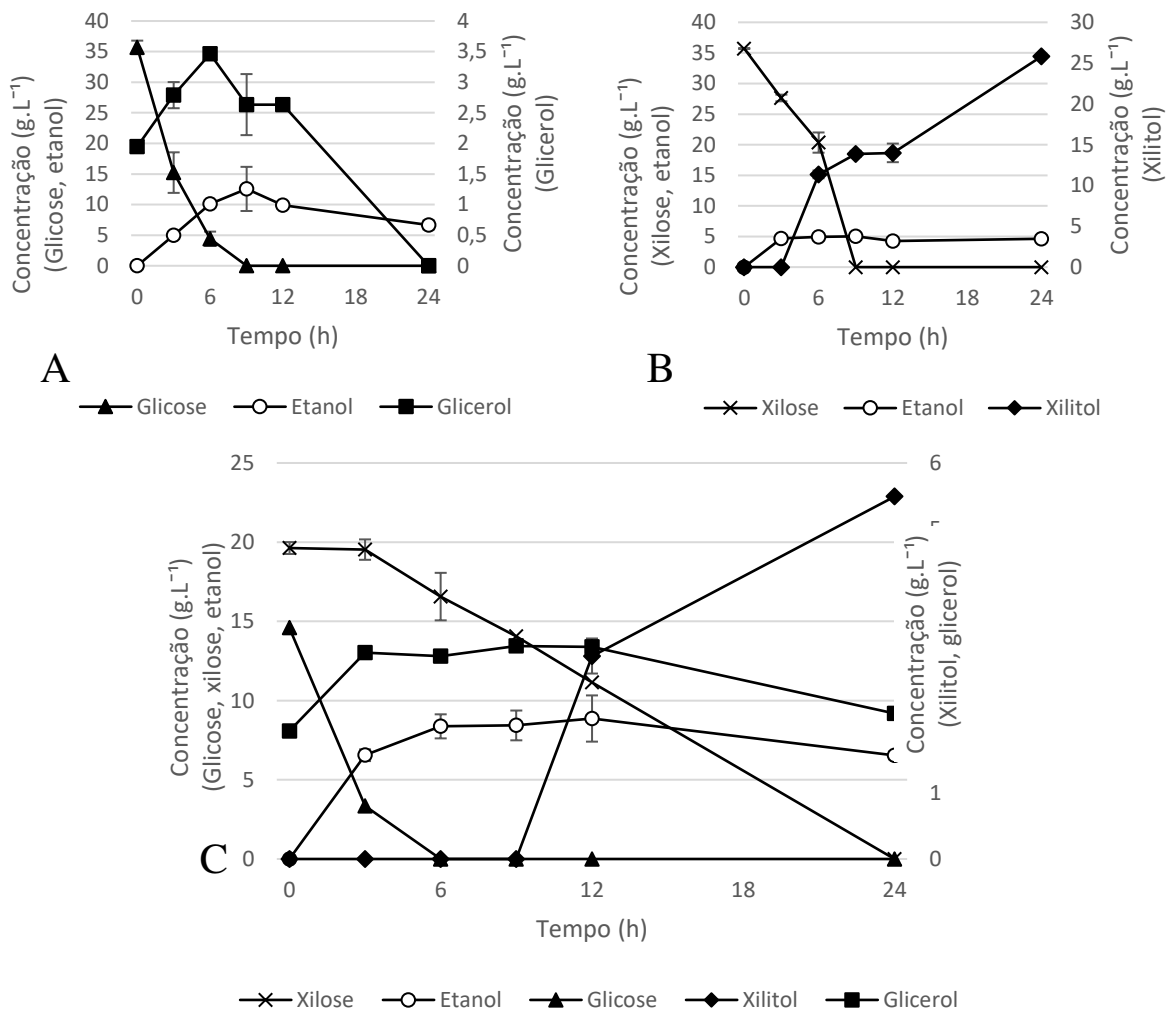
Figura 5 – Concentrações dos principais metabólitos de interesse na fermentação de *Meyerozyma caribbica* em meio contendo 4% de glicose durante 48h.



Fonte: o autor.

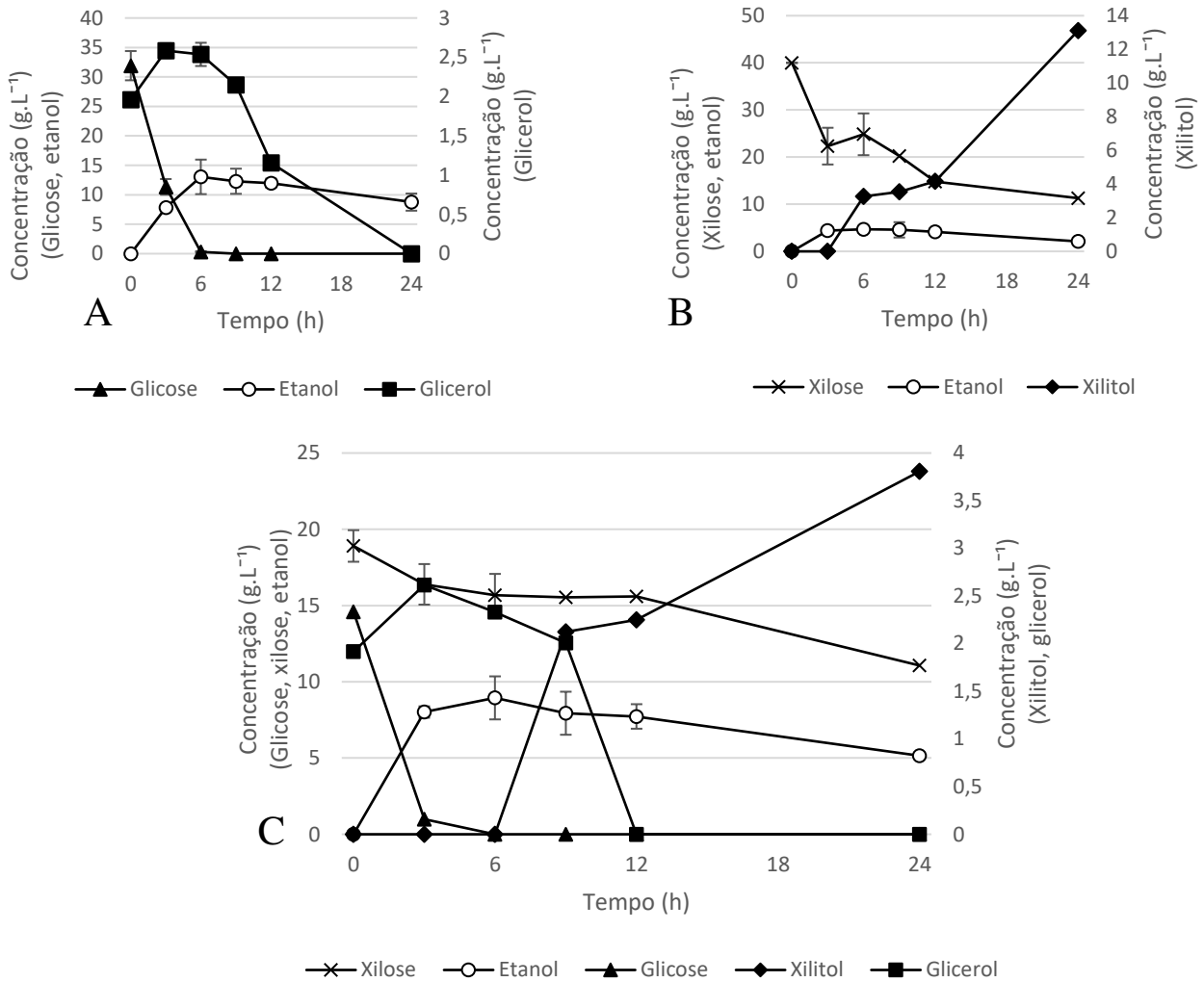
Assim sendo, os gráficos de variação das concentrações de metabólitos em 24h de fermentação são mostrados nas Figura 6, 7 e 8.

Figura 6 – Concentrações dos principais metabólitos de interesse na fermentação, durante 24h, de A- *Meyerozyma caribbica* em meio contendo 4% de glicose; B- *Meyerozyma caribbica* em meio contendo 4% de xilose e; C- *Meyerozyma caribbica* em meio contendo 2% de glicose e 2% de xilose.



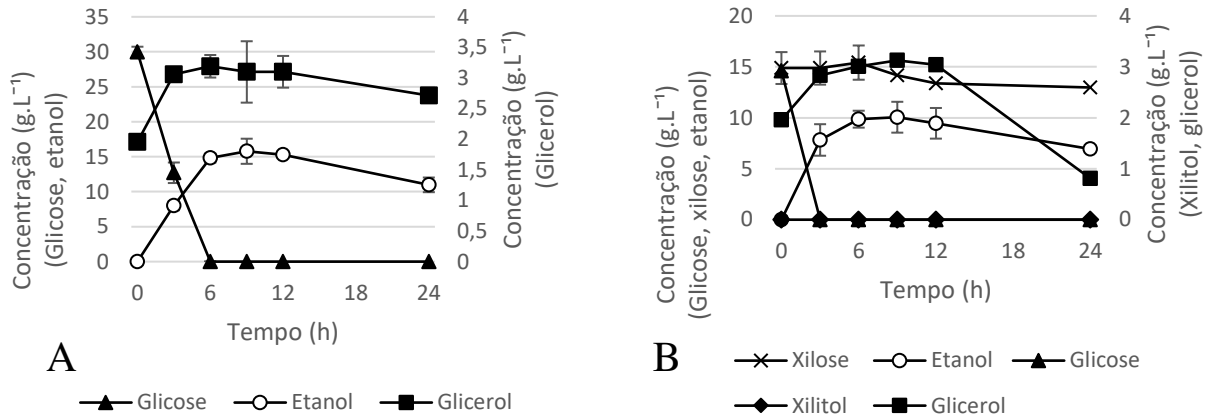
Fonte: o autor.

Figura 7 – Concentrações dos principais metabólitos de interesse na fermentação, durante 24h, de A- *Kluyveromyces marxianus* em meio contendo 4% de glicose; B- *Kluyveromyces marxianus* em meio contendo 4% de xilose; C- *Kluyveromyces marxianus* em meio contendo 2% de glicose e 2% de xilose.



Fonte: o autor.

Figura 8 – Concentrações dos principais metabólitos de interesse na fermentação, durante 24h, de A- *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo 4% de glicose e; B- *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo 2% de glicose e 2% de xilose.



Fonte: o autor.

Os parâmetros fermentativos e de crescimento calculados a partir dos dados anteriores são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros fermentativos e de crescimento das leveduras utilizadas no trabalho, sob diferentes fontes de carbono, avaliando-se a formação de etanol. Sendo- [etanol]: concentração de etanol, em g.L⁻¹, $Y_{p/s}$: taxa de conversão de substrato em etanol, em g.g⁻¹; Q_p : produtividade de etanol, em g.g⁻¹.h⁻¹, $Y_{x/s}$: taxa de conversão de substrato em célula, em g.g⁻¹ e; Y(%): eficiência de fermentação, em porcentagem.

		Parâmetros fermentativos e de crescimento				
		[etanol]	$Y_{p/s}$	Y(%)	$Y_{x/s}$	Q_p
		(g.L ⁻¹)	(g.g ⁻¹)	(%)	(g.g ⁻¹)	(g.g ⁻¹ .h ⁻¹)
<i>Meyerozyma caribbica</i>	Glicose	6,68	0,19	37%	0,05	0,74
	Xilose	6,68	0,13	25%	0,04	0,51
	Cofermentação	6,54	0,19	37%	0,04	0,54
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Glicose	8,75	0,27	54%	0,07	1,46
	Xilose	2,09	0,07	14%	0,05	1,46
	Cofermentação	5,16	0,23	45%	0,09	0,35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glicose	10,98	0,37	72%	0,07	0,86
	Cofermentação	6,93	0,42	82%	0,09	0,77

Fonte: o autor.

No meio contendo xilose, *M. caribbica* alcançou menor concentração de etanol do que *K. marxianus*. Contudo, quando se avalia a produção de xilitol, essa é aproximadamente o dobro na primeira comparada a segunda. Esse resultado não era esperado, mas tem grande relevância, uma vez que tal açúcar tem recebido destaque como adoçante pela indústria de alimentos. Com poder adoçante semelhante ao da sacarose, mas consideravelmente menos calórico, é considerado um substituto na alimentação para pessoas com diabetes, além de não levar à formação de cáries por não ser susceptível a ação bacteriológica (TOCHAMPA *et al.*, 2005).

Esse acúmulo de xilitol provavelmente se deve a alguma deficiência ou baixa expressão da enzima xilitol desidrogenase, que converte o xilitol em xilulose, que, por sua vez, será integrada na via das pentose-fosfato na forma de xilulose-5-fosfato para produção de energia (RIBEIRO, 2017). Assim, entende-se a necessidade de estudos posteriores para caracterizar a expressão gênica dos genes associados a expressão das enzimas relacionadas a essa via fermentativa na levedura.

Para avaliação e comparação da formação de xilitol, foram calculadas a taxa de conversão de substrato em xilitol e a eficiência de fermentação. O valor de rendimento teórico utilizado foi de $0,917\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (BRANCO, 2010). Esses resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros fermentativos das leveduras utilizadas no trabalho, sob diferentes fontes de carbono, avaliando-se a formação de xilitol. Sendo- [xilitol]: concentração de xilitol, em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $Y_{p/s}$: taxa de conversão de substrato em xilitol, em $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e; $Y(\%)$: eficiência de fermentação, em porcentagem.

		Parâmetros fermentativos		
		[Xilitol]	$Y_{p/s}$	$Y(\%)$
		($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	(%)
<i>Meyerozyma</i>	Xilose	25,81	0,72	79%
<i>caribbica</i>	Cofermentação	5,49	0,28	31%
<i>Kluyveromyces</i>	Xilose	13,12	0,46	50%
<i>marxianus</i>	Cofermentação	3,81	0,22	24%

Fonte: o autor.

De fato, o valor da eficiência de fermentação encontrado são superiores a valores encontrados para leveduras semelhantes na literatura. SILVEIRA (2014) quantificou a eficiência de conversão de xilose em xilitol para *M. guilliermondii* em

55,3%. DE MELLO *et al.* (2022), utilizou leveduras da espécie *S. cerevisiae* engenheiradas e chegou a eficiências entre 69 e 100%. Estratégias semelhantes podem ser utilizadas nessa levedura com fins diferentes: seja para aumentar ainda mais a produção de xilitol ou para eficientemente convertê-lo a etanol.

Em cofermentação, observa-se a queda da pentose apenas quando a hexose esgota, reforçando a ideia de repressão clássica observada nessas leveduras.

A taxa de conversão de substrato em etanol foi maior em glicose do que em xilose, como era esperado, levando em consideração a maior formação de xilitol encontrada no tratamento com a pentose. Esse resultado é consoante com o encontrado na literatura. SILVEIRA (2014), ao realizar testes com *M. guilliermondii*, também encontrou maior produção de xilitol do que de etanol para a levedura do mesmo gênero. O mesmo autor sugere que maior concentração de oxigênio no meio pode levar a maior produção de etanol, sendo essa uma saída possível para a utilização da levedura para esse objetivo.

Esses indícios colaboram com a ideia de que o oxigênio interfere no balanço redox das reações de fermentação, que envolvem a conversão de NADH a NAD⁺. Maiores concentrações de oxigênio levam a maior formação do cofator NAD⁺, uma vez que esse é oxidado na cadeia transportadora de elétrons, sendo esse essencial na reação conversora de xilitol a etanol (DEKKER *et al.*, 2022).

Como esperado, a maior eficiência de fermentação foi observada na levedura mais utilizada com esse fim, *S. cerevisiae*. Contudo, deve-se destacar que, na cofermentação, apesar de ser altamente eficiente, ainda resta grande quantidade de carboidratos no meio, que não foram metabolizados pela levedura, sendo essa uma desvantagem de sua utilização. A eficiência da *M. caribbica* pode ser melhorada com estratégias que visem aumentar a expressão da enzima conversora de xilitol, a fim de que esse composto não fique acumulado no meio.

6 Conclusões

A partir desse estudo, foi possível caracterizar o processo fermentativo de *M. caribbica*. Notou-se que a levedura tem resistência considerável a etanol, não havendo perda significativa a até 4% e mantendo crescimento considerável a 8%.

Foi notado mecanismo clássico de repressão por glicose na levedura, prejudicando sua utilização em cofermentação.

A levedura conseguiu utilizar como fontes de carbono tanto hexoses, como a glicose, quanto pentoses, como xilose e arabinose. Contudo, quando utilizou xilose, teve como principal produto a formação de xilitol, e não de etanol, como esperado.

Outro ponto importante destacável é a necessidade de manter certa quantidade de açúcares fermentescíveis no meio, ou que o processo seja cessado assim que esses acabarem, uma vez que a levedura rapidamente consome o etanol gerado. Em processos com o objetivo de ter maior quantidade do álcool, essa característica é negativa, uma vez que pode levar a prejuízos.

Assim, sugere-se que a levedura passe por estudos de modificação na expressão gênica para que possa ser utilizada com o objetivo de produzir etanol. Outra saída, contudo, é a reformulação desse objetivo, uma vez que se mostrou como forte candidata para a produção de xilitol.

7 Referências bibliográficas

AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1515–1524, 23 set. 2008.

AGUILAR, R. *et al.* Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, n. 4, p. 309–318, 2002.

BAUTISTA-ROSALES, P. U. *et al.* Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological Control**, v. 65, n. 3, p. 293–301, 2013.

BERKA, R. M. *et al.* Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 922–929, 2011.

BOUSSARSAR, H.; ROGÉ, B.; MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6537–6542, dez. 2009.

BRANCO, R. F. **Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de regeneração de coenzima como alternativa às vias química e microbiológica de obtenção**. 2010. 132 p. (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2010.

BROACH, J. R. Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. **Genetics**, v. 192, n. 1, p. 73–105, set. 2012.

BUSTI, S. *et al.* Glucose Signaling-Mediated Coordination of Cell Growth and Cell Cycle in *Saccharomyces Cerevisiae*. **Sensors**, v. 10, n. 6, p. 6195–6240, 21 jun. 2010.

CAO, J. *et al.* Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 167–173, 2013.

CHANDEL, A. *et al.* Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. 1, p. 8-020, 2011.

CHOI, G.-W. *et al.* Bioethanol production by a flocculent hybrid, CHFY0321 obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 8, p. 1232–1242, ago. 2010.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira – cana-de-açúcar – safra 2019/2020**. Brasília, v. 6, n. 4, 62p. 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>.

COSTA, D. A. *et al.* Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3829–3840, 18 fev. 2014.

DE LA TORRE-GONZÁLEZ, F. J. *et al.* Ethanol tolerance is decreased by fructose in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 67, p. 1–7, abr. 2016.

DEKKER, W. J. C. *et al.* Respiratory reoxidation of NADH is a key contributor to high oxygen requirements of oxygen-limited cultures of *Ogataea parapolymorpha*. **FEMS Yeast Research**, v. 22, n. 1, p. foac007, 1 jan. 2022.

DIDERICH, J. A. *et al.* Glucose Uptake Kinetics and Transcription of HXT Genes in Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 22, p. 15350–15359, maio 1999.

DOĞAN, A. *et al.* Improvements of Tolerance to Stress Conditions by Genetic Engineering in *Saccharomyces Cerevisiae* during Ethanol Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 28–42, 8 set. 2014.

FIESP. FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Ampliação da oferta de energia através da biomassa**. São Paulo, 85p. 2001. Disponível em: <<https://www.fiesp.com.br/arquivo-download/?id=4505>>.

GOES, T.; MARRA, R. Biocombustíveis: uma alternativa para o mundo, uma oportunidade para o Brasil. **A Lavoura**, v. 668, p. 15–19, 2008.

HAHN-HÄGERDAL, B. *et al.* Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937–953, abr. 2007.

HANDE, A.; MAHAJAN, S.; PRABHUNE, A. Evaluation of ethanol production by a new isolate of yeast during fermentation in synthetic medium and sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 63–70, 2013.

HARUN, R. *et al.* Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3464–3467, out. 2011.

HARUN, R.; DANQUAH, M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 304–309, jan. 2011.

HUGOT, E.; JENKINS, G. H. **Handbook of cane sugar engineering**. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 2014.

JAIN, A. *et al.* Hydrothermal pre-treatment for mesoporous carbon synthesis: enhancement of chemical activation. **J. Mater. Chem. A**, v. 2, n. 2, p. 520–528, 2014.

JIN, Y.-L.; ALEX SPEERS, R. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v. 31, n. 6–7, p. 421–440, ago. 1998.

KISS, A. A.; SUSZWALAK, D. J.-. P. C. Enhanced bioethanol dehydration by extractive and azeotropic distillation in dividing-wall columns. **Separation and Purification Technology**, v. 86, p. 70–78, fev. 2012.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2011.

KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 7, p. n/a-n/a, set. 2014.

LANE, S.; DONG, J.; JIN, Y. S. Value-added biotransformation of cellulosic sugars by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 260, n. April, p. 380–394, 2018.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, n. 3, 1981.

LIN, Y. *et al.* Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 395–401, dez. 2012.

MA, M.; LIU, Z. L. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 829–845, 13 maio 2010.

MAICAS, S. The role of yeasts in fermentation processes. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1–8, 2020.

MALAIRUANG, K. *et al.* High Cell Density Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* with Intensive Multiple Sequential Batches Together with a Novel Technique of Fed-Batch at Cell Level (FBC). **Processes**, v. 8, n. 10, p. 1321, 21 out. 2020.

MCGOVERN, P. *et al.* Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 48, p. E10309–E10318, 2017.

MENDES, T. A. DE O. *et al.* Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 2, p. 81–89, 28 maio 2013.

MOHD AZHAR, S. H. *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, jul. 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2011.

NOVA, M. X. V. *et al.* Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food**

Microbiology, v. 26, n. 5, p. 460–466, 2009.

QUISTGAARD, E. M. *et al.* Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): Structures pave the way. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 2, p. 123–132, 2016.

RIBEIRO, L. E. **Análise da influência da glicose sobre o metabolismo de Xilose em *Spathaspora passalidarum***. 2017. 50 p. (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.

RIBEIRO, L. E. *et al.* Influence of glucose on xylose metabolization by *Spathaspora passalidarum*. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 157, p. 103624, 1 dez. 2021.

ROTTAVA, I. *et al.* Screening of microorganisms for bioconversion of (-) β -pinene and R-(+)-limonene to α -terpineol. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1128–1131, set. 2010.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841–845, 2008.

SATYNARAYANA, T.; KUNZE, G. **Yeast biotechnology: diversity and applications**. 1. ed. Nova Deli: Springer, 2009.

SAUCEDO-LUNA, J. *et al.* Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 725–732, 2011.

SCHIRMER, W. N.; RIBEIRO, C. B. Panorama dos combustíveis e biocombustíveis no Brasil e as emissões gasosas decorrentes do uso da gasolina/etanol. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 2, n. 2, p. 16, 10 ago. 2017.

SILVA, F. S. G.; MIGOT, B. C.; DA SILVA, F. C. A importância do bioetanol dentro do contexto brasileiro, comparação de sua síntese a partir de cana-de-açúcar e milho e bioetanol de segunda geração. **8ª Jornada Científica e Tecnológica da Fatec de Botucatu**. Botucatu, SP, 2019.

- SILVEIRA, F. A. **Seleção de leveduras fermentadoras de xilose e análise do exometaboloma de *Meyerozyma guilliermondii* UFV-1**. 2014. 69 p. (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.
- SOARES, L. H. B. *et al.* **Mitigação das emissões de gases efeito estufa pelo uso de etanol da cana-de-açúcar produzido no Brasil**. Circular Técnica n. 27, Embrapa – Seropédica, Seropédica, RJ, 2009.
- STANLEY, D. *et al.* The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, jan. 2010.
- SUN, J. D-limonene: Safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259–264, 2007.
- TEIXEIRA, F. A. **Isolamento de microrganismos resistentes a limoneno e caracterização do mecanismo molecular**. 2019. 71 p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, 2019.
- TINÔCO, D.; GENIER, H. L. A.; DA SILVEIRA, W. B. Technology valuation of cellulosic ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 from sweet sorghum bagasse at elevated temperatures. **Renewable Energy**, v. 173, p. 188–196, ago. 2021.
- THOMAS, P. *et al.* Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 45–55, dez. 2015.
- TOCHAMPA, W. *et al.* A model of xylitol production by the yeast *Candida mogii*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 28, n. 3, p. 175–183, 8 out. 2005.
- VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1477–1492, 23 set. 2011.

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

VIDAL, M. F. Produção e uso de biocombustíveis no Brasil. **Caderno Setorial ETENE**, n.79. 2019.

VIDRIH, R.; HRIBAR, J. Mead: the oldest alcoholic beverage. **Traditional Foods**, p. 325–338, 2016.

WANG, P. Y.; SHOPSIS, C.; SCHNEIDER, H. Fermentation of a pentose by yeasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 94, n. 1, p. 248–254, maio 1980.

WEI, X. *et al.* The Genome-Wide Mutation Shows the Importance of Cell Wall Integrity in Growth of the Psychrophilic Yeast *Metschnikowia australis* W7-5 at Different Temperatures. **Microbial Ecology**, v. 81, n. 1, p. 52–66, 2021.

WU, Y. *et al.* Metabolic engineering strategies for co-utilization of carbon sources in microbes. **Bioengineering**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2016.

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.