

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis
Gabriela Maria Pereira Barbosa

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LEVEDURAS SELVAGENS PARA A
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE D-XILOSE

Diamantina

2017

Gabriela Maria Pereira Barbosa

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LEVEDURAS SELVAGENS PARA A
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE D-XILOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Biocombustíveis.

Orientadora:

Profa. Dra. Lílian de Araújo Pantoja

Coorientador:

Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos

Diamantina

2017

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

B238a Barbosa, Gabriela Maria Pereira
 Avaliação do potencial de leveduras selvagens para a fermentação
 alcoólica de D-xilose / Gabriela Maria Pereira Barbosa. – Diamantina,
 2017.
 87 p. : il.

 Orientador: Lílian de Araújo Pantoja
 Coorientador: Alexandre Soares dos Santos

 Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em
 Biocombustíveis) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
 Mucuri.

 1. Etanol. 2. Lignocelulose. 3. Biocombustíveis. 4. Pentose.
 I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e
 Mucuri.

CDD 662.669

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gabriela Maria Pereira Barbosa

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE LEVEDURAS SELVAGENS PARA A
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DE D-XILOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Biocombustíveis.

Orientadora:

Profa. Dra. Lílian de Araújo Pantoja

Coorientador:

Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos

Data da aprovação: 19/05/2017



Prof.^a Dr.^a CINTIA LACERDA RAMOS - UFVJM



Prof.^a Dr.^a MARIA GABRIELA DA CRUZ PEDROZO MIGUEL - UFLA



Prof.Dr. RONNIE VON DOS SANTOS VELOSO - UFVJM



Prof.^a Dr.^a LILIAN DE ARAUJO PANTOJA - UFVJM

Diamantina

À minha família, em especial à minha avó Maria Auzira (*in memoriam*). Sem vocês, nenhuma vitória teria sentido. A vocês, fonte do verdadeiro amor, minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida e dar força e coragem para superar as dificuldades do dia-a-dia.

Aos meus pais, João e Marlete, por serem exemplos de honestidade e humildade. Agradeço pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim. Obrigado por fazerem dos meus sonhos, os seus!

Os meus orientadores, Profa. Dra. Lílian de Araújo Pantoja e Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos, pela oportunidade e confiança a mim concedida, pelos ensinamentos que tanto contribuíram para a minha formação.

Aos meus irmãos, por sempre me motivarem e acreditarem no meu potencial. Agradeço pela amizade e companheirismo, por se esforçarem junto comigo para que mais etapa da minha vida pudesse ser concluída.

Ao Pedro Chaves, por sempre me encorajar diante de todas as dificuldades. Obrigada pela sua paciência, amor e companheirismo.

Às minhas avós, Maria Auzira (*in memoriam*) e Avelina, pelo amor, carinho e dedicação que sempre tiveram por mim.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à UFVJM pelo apoio estrutural e pedagógico.

Agradeço a toda equipe do LabBBio! Sem o apoio e amizade de vocês, a realização deste sonho não seria possível. Em especial, agradeço ao Philipe Brito e a Angeliane Reis pelo auxílio durante os processos fermentativos.

Aos meus amigos e demais familiares, por tornarem meus dias muito mais felizes, me dando força para enfrentar os desafios que surgem.

RESUMO

As pentoses oriundas da hidrólise da fração hemicelulósica de biomassas vegetais podem ser fermentadas a etanol. Entretanto, são poucas as espécies conhecidas de micro-organismos capazes de converter pentoses a etanol e, mesmo essas, mostram-se ineficientes e susceptíveis à presença de inibidores produzidos durante o pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo identificar e avaliar seis linhagens de leveduras isoladas a partir de biomassas vegetais quanto a capacidade de realizar a fermentação alcoólica da D-xilose utilizando diferentes formulações de meios sintéticos. As linhagens foram submetidas a identificação morfológica e molecular. Os processos fermentativos foram conduzidos em batelada simples em frascos cônicos sob agitação a 150 rpm e temperatura de 30°C por até 145 horas. Os bioprocessos foram monitorados a intervalos regulares de tempo quanto à concentração de açúcares redutores, glicose, etanol e biomassa celular. Ao final do processo, foram determinados os valores das variáveis de resposta rendimento ($Y_{P/S}$), produtividade (Q_P) e taxa de consumo de açúcares (q_S). Todas as linhagens avaliadas foram capazes de produzir álcool em meio sintético contendo somente xilose como carboidrato. Os maiores valores de produção e rendimento alcóolico foram obtidos em meios que continham além da xilose, a glicose. O maior valor de $Y_{P/S}$ observado foi de 0,38, em condições experimentais com produção de 3,33 g L⁻¹ de etanol. A composição de microelementos e fontes de nitrogênio afetou a fermentação alcoólica.

Palavras chave: etanol, lignocelulose, biocombustíveis, pentose

ABSTRACT

The pentoses from the hydrolysis of the hemicellulosic fraction of plant biomass can be fermented to ethanol. However, few known species of microorganisms are capable of converting pentoses to ethanol, and even those, are inefficient and susceptible to the presence of inhibitors produced during pretreatment of lignocellulosic biomasses. In this context, main objective of this work is to identify and evaluate six yeast strains isolated from plant biomasses in order to perform the alcoholic fermentation of D-xylose using different formulations of synthetic media. The strains were submitted to morphological and molecular identification at the species level. The fermentative processes were conducted in single batch in conical flasks under agitation at 150 rpm and at 30 °C for up to 145 hours. The bioprocesses were monitored at regular intervals for the concentration of reducing sugars, glucose, ethanol and cell biomass. At the end of the process, the values of the response variables $Y_{P/S}$, Q_P e q_S were determined. All the evaluated strains were able to produce alcohol in synthetic medium containing only xylose as a carbohydrate. The highest values of production and alcoholic yield were obtained in media that contained beyond xylose, glucose. The highest value of $Y_{P/S}$ observed was 0.38, under experimental conditions with production of 3.33 g L⁻¹ of ethanol. The composition of microelements and nitrogen sources affected the alcoholic fermentation.

Keywords: ethanol, lignocellulose, biofuels, pentose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção mundial de bioetanol e biodiesel entre os anos de 2000 a 2014.....	24
Figura 2 - Capacidade mundial de usinas instaladas para produção de etanol de segunda geração.....	25
Figura 3 - Esquema da estrutura da biomassa lignocelulósica.	26
Figura 4 - Representação química da reação de hidrólise da molécula de celulose.....	27
Figura 5 - Representação química do polímero de xilana na hemicelulose.	27
Figura 6 - Etapas básicas do processo de produção do etanol lignocelulósico (2G).....	29
Figura 7 - Vias propostas para o metabolismo de xilose e glicose em leveduras fermentadoras de pentose.	31
Figura 8 - Esquema simplificado do metabolismo dos principais açúcares liberados durante o processo de hidrólise da hemicelulose	32
Figura 9 - Representação esquemática da célula de levedura.	33
Figura 10 - Fluxograma da metodologia empregada no presente estudo.	37
Figura 11 - Representação esquemática da câmara úmida de microcultivo empregada no preparo das lâminas para observação das estruturas microscópicas.....	39
Figura 12 - Representação esquemática das etapas de condução dos processos fermentativos utilizando diferentes meios de cultivo para produção de etanol empregando linhagens fermentadoras de D-xilose.....	44
Figura 13 - Filogenia Bayesiana derivada de análises do conjunto de dados da região ITS para o gênero <i>Spotothrix</i>	48
Figura 14 - Aspecto morfológico macroscópico e microscópico da espécie <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2G) cultivada no meio YEPM a 30 °C.	50
Figura 15 - Aspecto morfológico macroscópico e microscópico da espécie <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (8G) cultivada no meio YEPM a 30 °C.	50
Figura 16 - Aspecto morfológico macroscópico e microscópico da espécie <i>Candida orthopsilosis</i> (4G).....	51
Figura 17 - Aspecto morfológico macroscópico e microscópico da linhagem <i>Sporothrix</i> sp. (5G), cultivada a 30°C no meio YEPM.	52
Figura 18 - Aspecto morfológico macroscópico e microscópico das linhagens <i>Galactomyces geotrichum</i> (R10) e (R150), cultivadas a 30°C no meio YEPM.	52
Figura 19 -. Cinética fermentativa do consumo de açúcares redutores (AR), glicose e xilose, e	

crescimento celular das linhagens. A) *Rhodothorula mucilaginosa* (2G); B) *Candida orthopsilosis* (4G); C) *Sporothrix sp.* (5G); D) *R. mucilaginosa* (8G); E) *Galactomyces geotrichum* (R10) e F) *G. geotrichum* (R150) cultivadas no Meio 1 (20 g L⁻¹ de xilose, 1,25 g L⁻¹ de ureia, 1,1 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹ de extrato de levedura e 40 ml L⁻¹ de uma solução de sais). 64

Figura 20 - Cinética fermentativa do consumo de açúcares redutores (AR), glicose e xilose e crescimento celular das linhagens. A) *Rhodothorula mucilaginosa* (2G); B) *Candida orthopsilosis* (4G); C) *Sporothrix sp.* (5G); D) *R. mucilaginosa* (8G); E) *Galactomyces geotrichum* (R10) e F) *G. geotrichum* (R150) cultivadas no Meio 2 (20 g L⁻¹ de xilose, 30 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 0,47 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 12,8 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,51 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,47 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O). 65

Figura 21 - Cinética fermentativa do consumo de açúcares redutores (AR), glicose e xilose, e crescimento celular das linhagens. A) *Rhodothorula mucilaginosa* (2G); B) *Candida orthopsilosis* (4G); C) *Sporothrix sp.* (5G); D) *R. mucilaginosa* (8G); E) *Galactomyces geotrichum* (R10) e F) *G. geotrichum* (R150) cultivadas no Meio 3 (30 g L⁻¹ de xilose, 15 g L⁻¹ de glicose, 3,0 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2,3 g L⁻¹ de ureia, 1,0 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O). 66

Figura 22 - Cinética fermentativa do consumo de açúcares redutores (AR), glicose e xilose, e crescimento celular das linhagens. A) *Rhodothorula mucilaginosa* (2G); B) *Candida orthopsilosis* (4G); C) *Sporothrix sp.* (5G); D) *R. mucilaginosa* (8G); E) *Galactomyces geotrichum* (R10) e F) *G. geotrichum* (R150) cultivadas no Meio 4 (10 g L⁻¹ de xilose, 10 g L⁻¹ de glicose, 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,1 g L⁻¹ de MnSO₄). 67

Figura 23 - Cinética fermentativa do consumo de açúcares redutores (AR), glicose e xilose e crescimento celular das linhagens. A) *Rhodothorula mucilaginosa* (2G); B) *Candida orthopsilosis* (4G); C) *Sporothrix sp.* (5G); D) *R. mucilaginosa* (8G); E) *Galactomyces geotrichum* (R10) e F) *G. geotrichum* (R150) cultivadas no Meio 5: 20 g L⁻¹ de xilose, 30 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 1,0 g L⁻¹ de MgCl, 1,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄. 68

Figura 24 - Dendrograma de similaridade entre os ensaios fermentativos analisados para as linhagens A) *Rhodothorula mucilaginosa* 2G; B) *Candida orthopsilosis* 4G; C) *Sporothrix sp.* 5G; D) *R. mucilaginosa* 8G; E) *Galactomyces geotrichum* R10 e F) *G. geotrichum* R150. ... 72

Figura 25 - Análise de componentes principais (PCA) para os ensaios fermentativos realizados para as linhagens *Rhodothorula mucilaginosa* (2G), *Candida orthopsilosis* (4G), *Sporothrix sp.*

(5G), *R. mucilaginosa* (8G), *Galactomyces geotrichum* (R10) e *G. geotrichum* (R150)..... 73

Figura 26 - Dendrograma de similaridade dos ensaios fermentativos analisados para as linhagens *Rhodotorula mucilaginosa* (2G), *Candida orthopsilosis* (4G), *Sporothrix sp.* (5G), *R. mucilaginosa* (8G), *Galactomyces geotrichum* (R10) e *G. geotrichum* (R150). 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Unidades industriais de produção de etanol de segunda geração (2G) no Brasil...25	25
Tabela 2 - Composição química de resíduos agrícolas (%) utilizados na produção de etanol de segunda geração.....28	28
Tabela 3 - Principais carboidratos presentes nos resíduos agrícolas (%).28	28
Tabela 4 - Composição dos meios de cultura utilizados nos processos fermentativos, com base na literatura, para produção de etanol a partir de linhagens fermentadoras de D-xilose.....43	43
Tabela 5 - Identificação e origem da coleta das linhagens de leveduras fermentadoras de D-xilose utilizadas nos ensaios fermentativos para produção de etanol.....49	49
Tabela 6 - Tamanho das colônias das linhagens <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2G), <i>Candida orthopsilosis</i> (4G), <i>Sporothrix sp.</i> (5G), <i>R. mucilaginosa</i> (8G) e <i>Galactomyces geotrichum</i> (R10), <i>G. geotrichum</i> (R150), em função do tempo de cultivo nos meios YEPM e Ágar-Acetato a 28°C.53	53
Tabela 7 - Resultados dos testes bioquímicos de urease, hidrólise de amido e DBB realizados para as linhagens de leveduras selecionadas como fermentadoras de D-xilose.....54	54
Tabela 8 - Resultado do teste de crescimento em diferentes meios e temperatura realizado para as linhagens <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2G), <i>Candida orthopsilosis</i> (4G), <i>Sporothrix sp.</i> (5G), <i>R. mucilaginosa</i> (8G), <i>Galactomyces geotrichum</i> (R10) e <i>G. geotrichum</i> (R150).....55	55
Tabela 9 - Resultados dos testes de assimilação de carboidratos e nitrogênio para as linhagens <i>Galactomyces geotrichum</i> (R10), <i>G. geotrichum</i> (R150), <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2G), <i>Candida orthopsilosis</i> (4G), <i>Sporothrix sp.</i> (5G) e <i>R. mucilaginosa</i> (8G).....56	56
Tabela 10 - Resultados dos testes de fermentação de carboidratos realizados para as linhagens <i>Galactomyces geotrichum</i> (R10), <i>G. geotrichum</i> (R150), <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2G), <i>Candida orthopsilosis</i> (4G), <i>Sporothrix sp.</i> (5G) e <i>R. mucilaginosa</i> (8G).....57	57
Tabela 11 - Parâmetros do monitoramento empregados nos processos fermentativos para as linhagens <i>Galactomyces geotrichum</i> (R10), <i>G. geotrichum</i> (R150), <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (2G), <i>Candida orthopsilosis</i> (4G), <i>Sporothrix sp.</i> (5G) e <i>R. mucilaginosa</i> (8G). cultivadas em diferentes meios de fermentação.59	59
Tabela 12 - Valores de rendimento (Yp/s) do processo fermentativo em etanol, obtidos em diferentes estudos e respectivos micro-organismos e autores.61	61
Tabela 13 -. Relação entre as taxas máximas de consumo de xilose e glicose em porcentagem ($q_{\text{máx,xilose}}/q_{\text{máx,glicose}}$) para as linhagens <i>Rhodothorula mucilaginosa</i> (2G); <i>Candida orthopsilosis</i> (4G); <i>Sporothrix sp.</i> (5G); <i>R. mucilaginosa</i> (8G); <i>Galactomyces geotrichum</i> (R10) e <i>G.</i>	

geotrichum (R150) cultivadas em diferentes meios de fermentação.....69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1 Panorama da Produção de Etanol de 1^a e 2^a Geração	23
3.2 Biomassa Lignocelulósica no contexto da produção de Bioetanol Lignocelulósico ...	26
3.3 Leveduras	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Aquisição e manutenção dos micro-organismos	37
4.2 Identificação morfológica e bioquímica das leveduras fermentadoras de D-xilose	38
4.2.1 Características morfológicas	38
4.2.2 Características bioquímicas	39
4.2.2.1 Diazonium B Blue (DBB)	39
4.2.2.2 Teste de urease	40
4.2.2.3 Hidrólise de amido	40
4.2.2.4 Teste de Assimilação de Carboidratos e Nitrogênio	40
4.2.2.5 Teste de fermentação de Carboidratos	41
4.3 Identificação Molecular	41
4.4 Ensaios Fermentativos	42
4.4.1 Monitoramento do bioprocesso	44
4.4.1.1 Açúcares Redutores (AR)	44
4.4.1.2 Determinação da concentração de glicose	45
4.4.1.3 Dosagem de etanol	45
4.4.2 Variáveis respostas	45
4.4.2.1 Rendimento de produção de etanol ($Y_{P/S}$)	45
4.4.2.2 Produtividade volumétrica (Q_p)	46
4.4.2.3 Taxa máxima de consumo de substrato (q_s)	46
4.4.3 Análise estatística	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Identificação molecular e morfológica	47
5.1.1 Análises Bioquímicas e Fisiológicas	53

5.2 Ensaio fermentativo.....	57
6 CONCLUSÃO.....	77
7 REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

O cenário mundial relacionado com os problemas ambientais causados pelos gases de efeito estufa e a limitação das reservas de combustíveis fósseis, culminou na busca pela diversificação da matriz energética mundial através do uso de combustíveis alternativos, economicamente competitivos e prontamente disponíveis (BELLIDO *et al.*, 2013; ZABED *et al.*, 2016). Diante deste cenário, as pesquisas sobre combustíveis passaram a explorar diferentes opções para a produção de etanol utilizando variadas matérias-primas, buscando torna-la uma alternativa economicamente viável para a substituição dos combustíveis fósseis (NOVY *et al.*, 2013; ISMAIL *et al.*, 2014; ZABED *et al.*, 2016). As biomassas lignocelulósicas ganharam grande destaque como matérias-primas a serem exploradas para a produção deste biocombustível, uma vez que, as mesmas são fontes vegetais abundantes e compostas por açúcares que podem ser utilizados como substratos para a fermentação alcoólica (PEREIRA *et al.*, 2011; KO *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2016). Todavia, a produção comercial do etanol lignocelulósico ainda enfrenta alguns entraves tecnológicos que diminuem a sua competitividade frente ao etanol de primeira geração. Os principais desafios desta produção se concentram no alto consumo de energia associada aos processos de pré-tratamento da biomassa, bem como, na grande variabilidade da composição da matéria-prima (ZABED *et al.*, 2016). Além destes, um dos principais gargalos é a incapacidade dos micro-organismos convencionalmente empregados nos processos fermentativos em metabolizar os açúcares de cinco carbonos liberados durante a hidrólise da hemicelulose (ZABED *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2016).

Na hidrólise da hemicelulose, que ocorre durante os processos de pré-tratamento das biomassas lignocelulósicas, vários monossacarídeos são liberados, tais como, a arabinose, galactose, glicose, manose e a xilose, este último é considerado o mais abundante (SILVA., 2012; KO, UM, LEE, 2016; AGBOGBOG *et al.*, 2006). O aproveitamento integral dos açúcares provenientes deste processo pode proporcionar aumento da produção de etanol de 2ª geração (ISHOLA, BRANDBERG, TAHERZADEH, 2015). Sendo assim, a consolidação de tecnologias de produção de etanol lignocelulósico está intimamente relacionada com a seleção de leveduras capazes de fermentar pentoses (PEREIRA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2015). Atualmente, ainda não há relatos de linhagens, naturalmente ocorrentes, que realizem a fermentação alcoólica a partir de pentoses com o mesmo desempenho ou robustez que leveduras fermentadoras de hexoses, como a *Saccharomyces cerevisiae* (HOU, YAO, 2012, ZABED *et al.*, 2016).

A avaliação do comportamento dos micro-organismos durante o metabolismo das pentoses, neste sentido, é um fator indispensável para se obter maiores rendimentos e produtividade em etanol. A disponibilidade de nutrientes influencia significativamente a produção de etanol, uma vez que a presença de íons, fontes de nitrogênio e de carboidratos podem afetar positivamente no desenvolvimento e metabolismo das células (GUTIÉRREZ-RIVERA *et al.*, 2015). Alguns íons como magnésio e zinco são relacionados como elementos que auxiliam as leveduras a tolerar a toxicidade do etanol, como também aumentam a resistência a choques térmicos (BIRCH; WALKER, 2000; ISMAIL *et al.*, 2014).

Um dos mecanismos de conversão da xilose à etanol proposto para as leveduras envolve a atuação das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) que possuem especificidades quanto ao cofator utilizado. Convencionalmente, a enzima XR utiliza o NADPH como cofator, enquanto a enzima XDH é dependente de NAD⁺, essa preferência pode levar ao desequilíbrio redox, e conseqüentemente, a redução da produção de etanol (NOVY *et al.*, 2013; HASUNUMA *et al.*, 2011). Pesquisas propõem que o equilíbrio redox possa ser obtido através do controle das taxas de oxigenação, bem como, por meio da co-fermentação da xilose e glicose (SILVA *et al.*, 2012; SIGNORI *et al.*, 2014; WILKINS *et al.*, 2008).

Deste modo, o presente estudo teve por objetivo identificar e avaliar a capacidade de leveduras naturalmente ocorrentes quanto a capacidade de fermentar xilose, bem como, conhecer o comportamento destes micro-organismos frente à diferentes formulações nutricionais dos meios de cultivo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo identificar e avaliar o comportamento de leveduras fermentadoras de D-xilose para a produção de etanol utilizando diferentes formulações de meios sintéticos.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Caracterizar as linhagens estudadas quanto aos aspectos morfológicos (macro e microscópicos) e bioquímicos;
- II. Identificar, por métodos moleculares, as linhagens leveduriformes fermentadoras de D-xilose em nível de espécie;
- III. Avaliar o potencial fermentativo das linhagens estudadas quanto à produção de etanol a partir de D-xilose;
- IV. Avaliar o comportamento das linhagens estudadas frente à diferentes formulações de meios de cultivo.

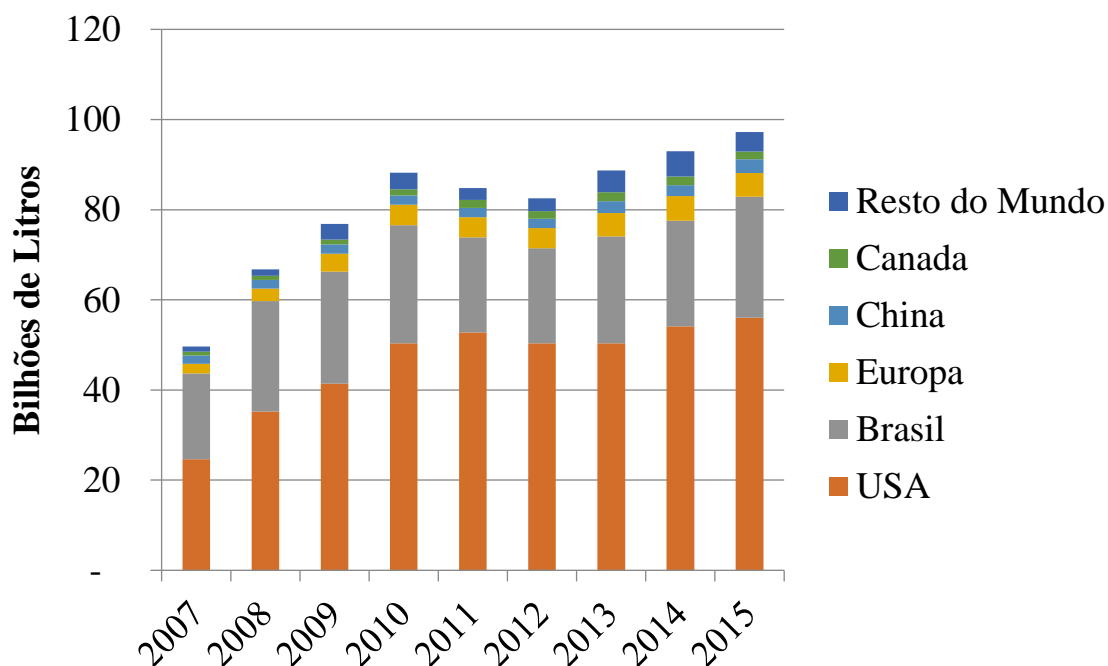
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Panorama da Produção de Etanol de 1^a e 2^a Geração

O bioetanol é produzido a partir da fermentação dos açúcares encontrados em diversas matérias-primas, tais como cereais, raízes, tubérculos e outras biomassas. Nos Estados Unidos e na maioria dos países europeus o etanol de primeira geração é essencialmente produzido a partir de cereais, diferentemente do Brasil, que utiliza a cana-de-açúcar como principal matéria-prima (NAÇÕES UNIDAS, 2016). A utilização do etanol como combustível é vista como uma alternativa para diminuir os problemas ambientais e energéticos globais derivados do uso de combustíveis fósseis. Atualmente, o etanol de primeira geração é o combustível de origem renovável mais consumido mundialmente (EIA, 2017).

No Brasil, a produção de etanol teve como finalidade solucionar as sucessivas crises do setor açucareiro e a dependência do petróleo importado. Neste sentido, os investimentos realizados pelo governo, através do Proálcool em 1975, tornaram o Brasil o detentor da tecnologia de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, tornando-o maior produtor mundial desse combustível (TÁVORA, 2011; NOGUEIRA, CAPAZ, 2013). Entretanto, a partir do ano de 2005, os Estados Unidos assumiram o posto de maior produtor de etanol após investimentos no setor (ALVES, MACRI, 2013, EIA, 2017). O apoio governamental através das políticas nacionais de produção dos biocombustíveis permitiu que o Brasil e os Estados Unidos se tornassem os principais produtores de bioetanol, responsáveis por 85 % da produção global, Figura 1 (Renewable Fuels Association, 2016).

O etanol pode ser classificado em gerações de acordo com as tecnologias de produção empregadas, que exigem alterações de acordo com a matéria-prima utilizada no processo. O etanol de primeira geração é produzido a partir das hexoses disponíveis em matérias-primas convencionais, tais como cana-de-açúcar, cereais, beterraba-açucareira, dentre outras (AZHAR *et al.*, 2017). O bioetanol lignocelulósico ou etanol de segunda geração, pode ser compreendido como combustível originado por meio da fermentação dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica. Devido ao seu apelo sustentável, as biomassas utilizadas no processo são, geralmente, provenientes de resíduos agroindustriais, florestais e urbanos (ALFENORE, 2016).

Figura 1 - Produção anual de bioetanol por país ou região.

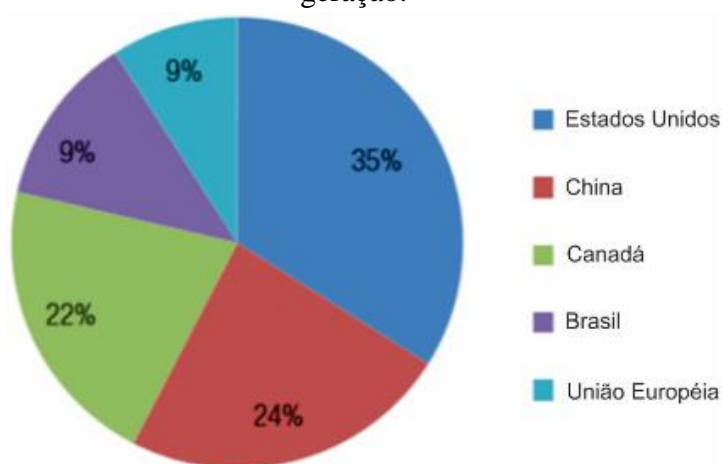
Fonte: Renewable Fuels Association 2017.

A expansão da produção de etanol é um fator determinante para a consolidação do combustível nas matrizes energéticas diante do crescimento da demanda mundial por energia. Entretanto, tal expansão se opõe às políticas de segurança alimentar, o que tem impulsionado a busca por matérias-primas não convencionais para a produção desse biocombustível (RAGHU *et al.*, 2011, SERRA, ZILBERMAN, 2013, ZABED *et al.*, 2016). Neste contexto, as perspectivas do etanol de segunda geração são promissoras em virtude do aumento da produção, sem que seja necessária a ampliação da área cultivável, pois utiliza biomassas residuais como matérias-primas. Outra vantagem apresentada pelo processo está relacionada a ampla disponibilidade de biomassas a baixo custo, ressaltando assim, a possibilidade de resultados satisfatórios e economicamente viáveis (ZABED *et al.*, 2016, KODAMA *et al.*, 2013). No Brasil, por exemplo, foram produzidos mais de 600 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra de 2014/2015, sendo gerados mais de 168 milhões de toneladas de bagaço (CONAB, 2016; EMBRAPA, 2017). O biocombustível a partir de biomassa lignocelulósica amplia as rotas de conversão, aumentando a segurança energética do país, como também, o coloca em posição de destaque na produção de combustíveis renováveis e bem desenvolvidos em relação às tecnologias aplicadas (NYKO *et al.*, 2010).

Segundo as Nações Unidas (2016), a maioria dos biocombustíveis de segunda geração, também conhecidos como biocombustíveis avançados, estão nas fases iniciais da

comercialização ou na fase produção em escala piloto, todavia, prevê-se crescimento de 50% no mercado de biocombustíveis de segunda geração entre 2014-2020. Os Estados Unidos lideram a produção do etanol lignocelulósico com 35% da capacidade instalada para a produção deste combustível, enquanto que o Brasil, até o ano de 2015 apresentou apenas 9% da capacidade instalada de etanol de segunda geração em relação à capacidade mundial, Figura 2.

Figura 2 - Capacidade mundial de usinas instaladas para produção de etanol de segunda geração.



Fonte: Nações Unidas, 2016.

No Brasil, atualmente, existem três usinas de etanol lignocelulósico implantadas, sendo essas as unidades da Raízen (SP), GranBio (AL) e o projeto piloto da CTC (SP), com capacidade produtiva de 40, 82 e 3 milhões de litros anuais, respectivamente, Tabela 1, (EPE, 2016; RAIZEN, 2017; GRANBIO, 2017). Todavia, ano após ano, o volume real destes combustíveis, principalmente o etanol de origem lignocelulósica, manteve-se aquém das metas originalmente previstas (EPE, 2016).

Tabela 1 - Unidades industriais de produção de etanol de segunda geração (2G) no Brasil.

Plantas de etanol celulósico (existentes)	Localização	Matéria-prima	Capacidade de Produção (milhões de litros/ano)	Ano de início
GranBio	São Miguel, AL	Bagaço de cana-de-açúcar e palha	82.38	2014
Centro de Tecnologia Canaveira (CTC)	Piracicaba, SP	Bagaço de cana-de-açúcar	3.00	2012
Raizen Energia	Piracicaba, SP	Bagaço de cana-de-açúcar	40.46	2015
Capacidade Total em milhões de litros:			125.65	

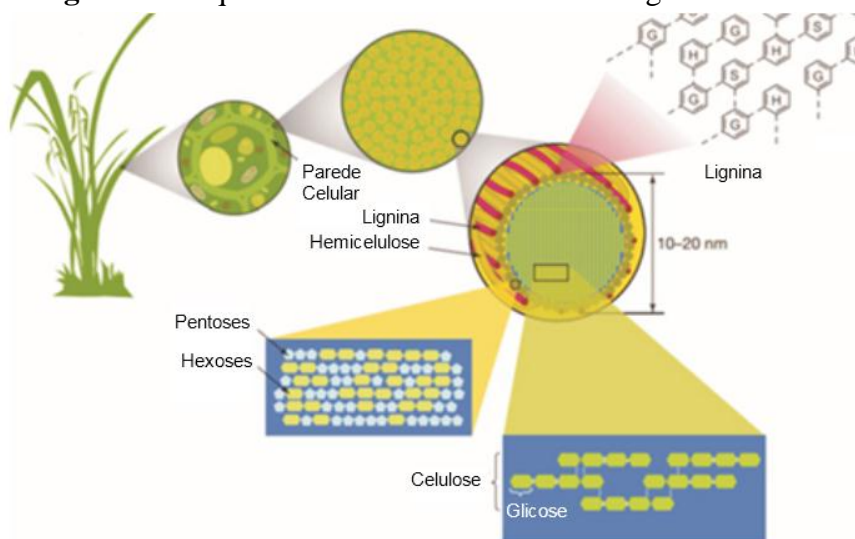
Fonte: Nações Unidas, 2016 (adaptada)

3. 2 Biomassa Lignocelulósica no contexto da produção de Bioetanol Lignocelulósico

Do ponto de vista energético, biomassa é qualquer matéria de origem orgânica capaz de armazenar energia e que ao ser processada, é convertida em energia útil. Segundo o Ministério de Minas e Energia (MME) (2007), a biomassa é a matéria vegetal gerada a partir da fotossíntese, como também seus produtos e subprodutos (florestas, resíduos agrícolas, rejeitos orgânicos industriais e urbanos, dentre outros). Este Ministério também reporta que, a energia química acumulada na biomassa pode ser liberada através da combustão direta ou ser convertida em outros produtos energéticos, tais como etanol, gases combustíveis e de síntese.

As biomassas lignocelulósicas podem ser divididas em grupos como culturas energéticas, plantas aquáticas, biomassa florestal, resíduos agrícolas e fração orgânica de resíduos sólidos municipais. Quanto à composição química, estas matérias-primas apresentam características variadas às quais dependem do tipo de vegetal e das interações ambientais (ZABED *et al.*, 2016, VOLOSHIN *et al.*, 2016, MATOS *et al.*, 2014). A compreensão da estrutura dessa biomassa é de fundamental importância na tecnologia de produção do etanol lignocelulósico ou etanol de segunda geração (2G). Tais biomassas são formadas por estruturas rígidas e fibrosas, constituídas basicamente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, ancorados pela lignina, polímero complexo de fenóis (Figura 3) (ZABED *et al.*, 2016; YUCEL, ASKU, 2015).

Figura 3 - Esquema da estrutura da biomassa lignocelulósica.

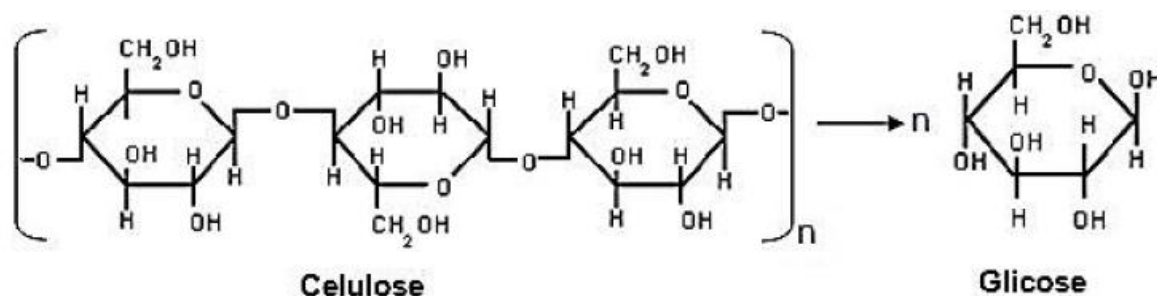


Fonte: RUBIN, 2008.

A celulose é um polímero natural de maior ocorrência no mundo. Possui cadeia linear que, quando hidrolisada, libera moléculas de glicose. A associação das moléculas de

celulose forma uma estrutura cristalina que conferem elevada resistência e tensão a estrutura (WANG et al., 2016). A Figura 4 representa a hidrólise da molécula de celulose, onde as ligações glicosídicas (β 1-4) são quebradas pela reação com a água.

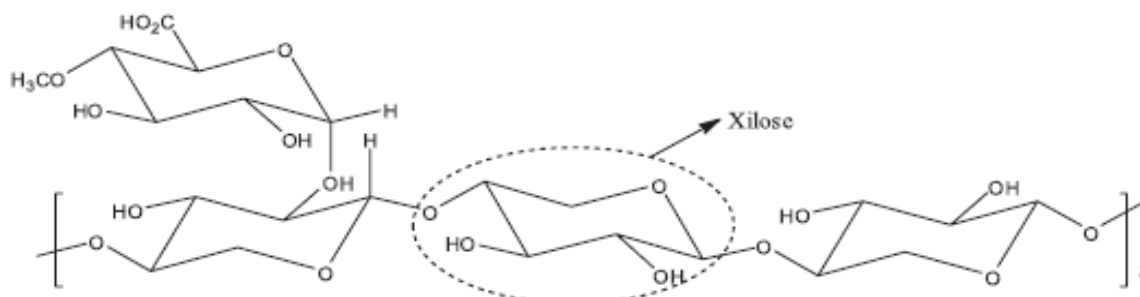
Figura 4 - Representação química da reação de hidrólise da molécula de celulose.



Fonte: SANTOS, 2012.

A hemicelulose, Figura 5, é um heteropolissacarídeo complexo com diversas subunidades de monossacarídeos que se diferenciam de acordo com as espécies de plantas (WANG *et al.*, 2016). Normalmente, é constituída por unidades químicas como *D*-glicose, *D*-galactose, *D*-manose, *D*-xilose, *L*-arabinose, ácido *D*-glucurônico e ácido 4-*O*-metilglucurônico (HUANG *et al.*, 2016; COLLARD, BLIN, 2014; SCHELLER, ULVSKOV, 2010). Este heteropolímero é classificado de acordo com o açúcar predominante na sua cadeia principal, se enquadrando nas classes de xilanas, glucomananas e galactanas (AGBOR *et al.*, 2011). Dentre estas moléculas, as xilanas, moléculas de xilose unidas por ligação β -1,4, se apresentam em maiores proporções (SANTOS *et al.*, 2012). As hemiceluloses diferentemente da celulose, apresentam estruturas ramificadas que proporcionam estabilidade e flexibilidade ao agregado de fibras (ZABED *et al.*, 2016).

Figura 5- Representação química do polímero de xilana na hemicelulose.



FONTE: SANTOS *et al.*, 2012.

Segundo Balat (2008) a hemicelulose pode representar de 20 a 40% da massa seca da biomassa, contudo, segundo Sarkar *et al.* (2012), nos principais resíduos agrícolas a porcentagem deste polímero é na faixa de 20 a 30%, Tabela 2. A xilose, principal pentose presente na hemicelulose, representa 14 a 24% dos carboidratos presentes nessas biomassas, Tabela 3.

Tabela 2 - Composição química de resíduos agrícolas (%) utilizados na produção de etanol de segunda geração.

Resíduos	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Referência
Espiga de milho	42-45	35-39	14-15	Prasad, <i>et al.</i> , 2007
Palha de trigo	35-47	20-30	8-15	Sarkar <i>et al.</i> , 2012
Palha de milho	38-40	24-26	7-19	Zhu <i>et al.</i> , 2005; Saini <i>et al.</i> , 2015
Bagaço de cana-de-açúcar	42-48	28-30	20-40	Saini <i>et al.</i> , 2015; Kim, Day, 2011
Palha de arroz	32-47	19-27	5-24	Sarkar <i>et al.</i> , 2012

Fonte: Próprio Autor

Tabela 3 - Principais carboidratos presentes nos resíduos agrícolas (%).

Resíduos	Glicose	Xilose	Manose	Galactose	Arabinose
Palha de arroz	41,0-43,4	14,8-20,2	1,8	0,4	2,7-4,5
Palha de trigo	38,8±00,5	22,2±00,3	1,7±0,2	2,7±0,1	4,7±0,1
Palha de milho	39,0	14,8	0,3	0,8	3,2
Bagaço de cana-de-açúcar	38,1	23,3	-	1,1	2,5

Fonte: SARKAR *et al.* (2012)

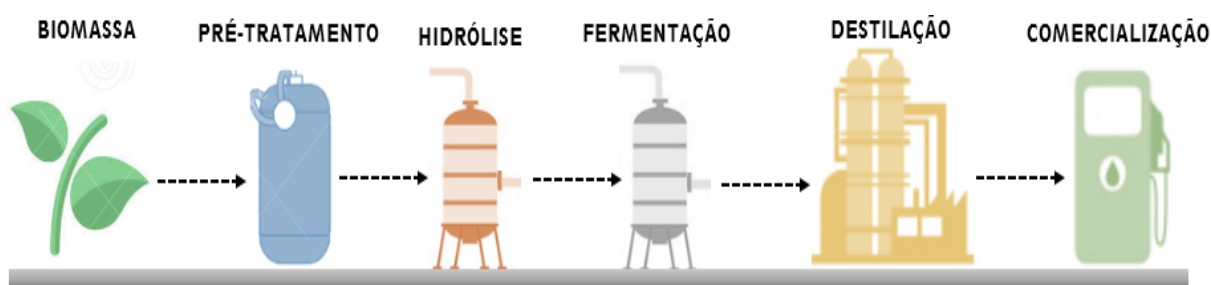
A lignina é a segunda macromolécula mais abundante nas biomassas lignocelulósicas. A composição e organização dos seus constituintes sofrem variações dentre as espécies. Todavia, é basicamente um heteropolímero amorfo que consiste em unidades de fenilpropanos (álcool *p*-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico) (ZABED *et al.*, 2016; SOUSA, 2014).

Segundo Silva (2012), o conceito de etanol 2G é bastante antigo, sendo datada de 1819 a primeira nota publicada sobre a extração de álcool a partir de madeira, submetendo-a a hidrólise e fermentação. Desde então, a comunidade científica tem intensificado esforços no

desenvolvimento de tecnologias que aprimorem o processo produtivo de obtenção desse combustível.

A produção do etanol de segunda geração, de modo simplificado, consiste nas etapas de pré-tratamento da biomassa, a hidrólise da celulose e da hemicelulose, fermentação e destilação, Figura 6. Segundo Balat (2011), os desafios tecnológicos da produção comercial do etanol lignocelulósico estão relacionados com a diversidade das matérias-primas e a necessidade de encontrar micro-organismos capazes de fermentar eficientemente os açúcares liberados na hidrólise da celulose e hemicelulose (ZABED *et al.*, 2016; MUPONDWA *et al.*, 2017; MUPONDWA *et al.*, 2016).

Figura 6 - Etapas básicas do processo de produção do etanol lignocelulósico (2G).



Fonte: Próprio autor.

A bioconversão de materiais lignocelulósicos em etanol é possível desde que a matéria-prima passe por processos de pré-tratamento que possibilitem a ação de enzimas durante a hidrólise. Durante esse processo ocorre a remoção ou alteração da lignina presente na biomassa com a finalidade de aumentar a área de contato do material, reduzir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, possibilitando uma digestão enzimática mais eficiente (CANILHA *et al.*, 2010). As tecnologias de pré-tratamento envolvem procedimentos físicos, químicos, físico-químicos ou ainda, biológicos, proporcionando diferentes impactos na biomassa (ZABED *et al.*, 2016).

Na fermentação, processo que abrange um conjunto de reações intracelulares que são enzimaticamente controladas, moléculas orgânicas são degradadas em compostos mais simples, liberando energia para o crescimento e manutenção das atividades metabólicas das células microbianas. Em contraste com a eficiente fermentação da glicose, a fermentação com xilose é desafiadora, pois, embora muitos micro-organismos utilizem a xilose como fonte de carbono, apenas alguns produzem, a partir desta, etanol (ZHANG *et al.*, 2015).

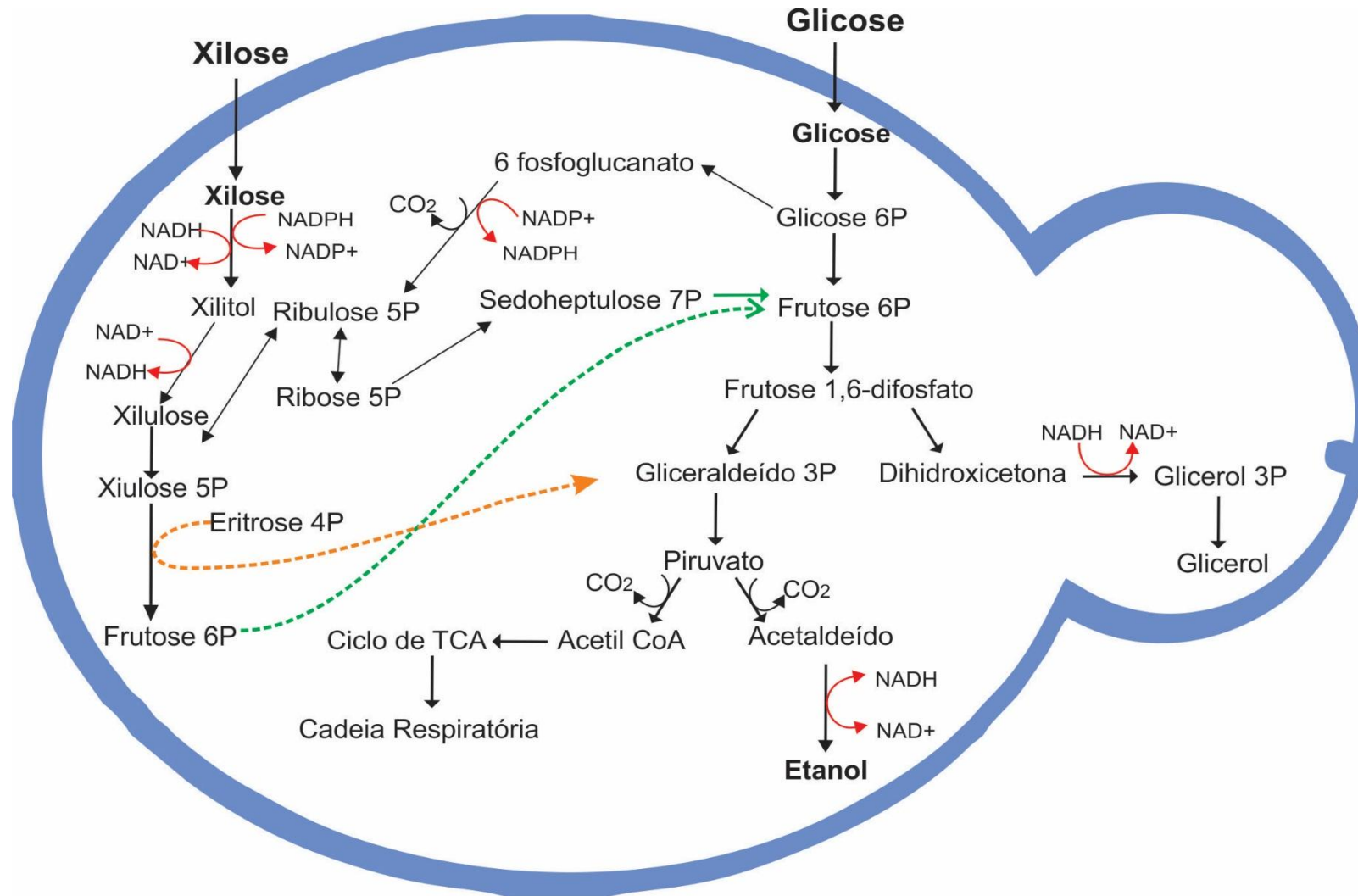
As leveduras, principais micro-organismos envolvidos na fermentação alcoólica,

convertem xilose a etanol por meio da via metabólica das pentoses-fosfato, diferentemente da glicose, como demonstrado na Figura 7. A primeira etapa do metabolismo da D-xilose consiste no transporte do açúcar através da membrana celular mediado por transportadores de glicose na ausência de um transportador específico para a xilose (RAO, BHADRA, SHIVAJI, 2008). No interior da célula, citoplasma, a xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose-redutase (XR) dependente de NADPH, o qual é oxidado a xilulose pela xilitol desidrogenase (XDH) dependente de NAD⁺. Na etapa subsequente, tanto em leveduras como em bactérias, a xilulose é fosforilada formando xilulose-5-fosfato que, então entra na via das pentoses-fosfato (GOSHIMA *et al.*, 2013; NOVY *et al.*, 2013; SUGA *et al.*, 2013; KO *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015).

A taxa de fermentação da xilose em condições anaeróbias é extremamente baixa, além de se obter o xilitol como produto principal (JO *et al.*, 2016). Algumas alternativas estudadas para controlar o equilíbrio das reações de óxido-redução são: o fornecimento de oxigênio em um nível baixo e controlado para as leveduras, ou ainda, adicionar glicose ao meio fermentativo proporcionando a cofermentação da glicose e xilose (PROMPT, 2012; MATSUSHIKA *et al.*, 2008; HOU *et al.*, 2012).

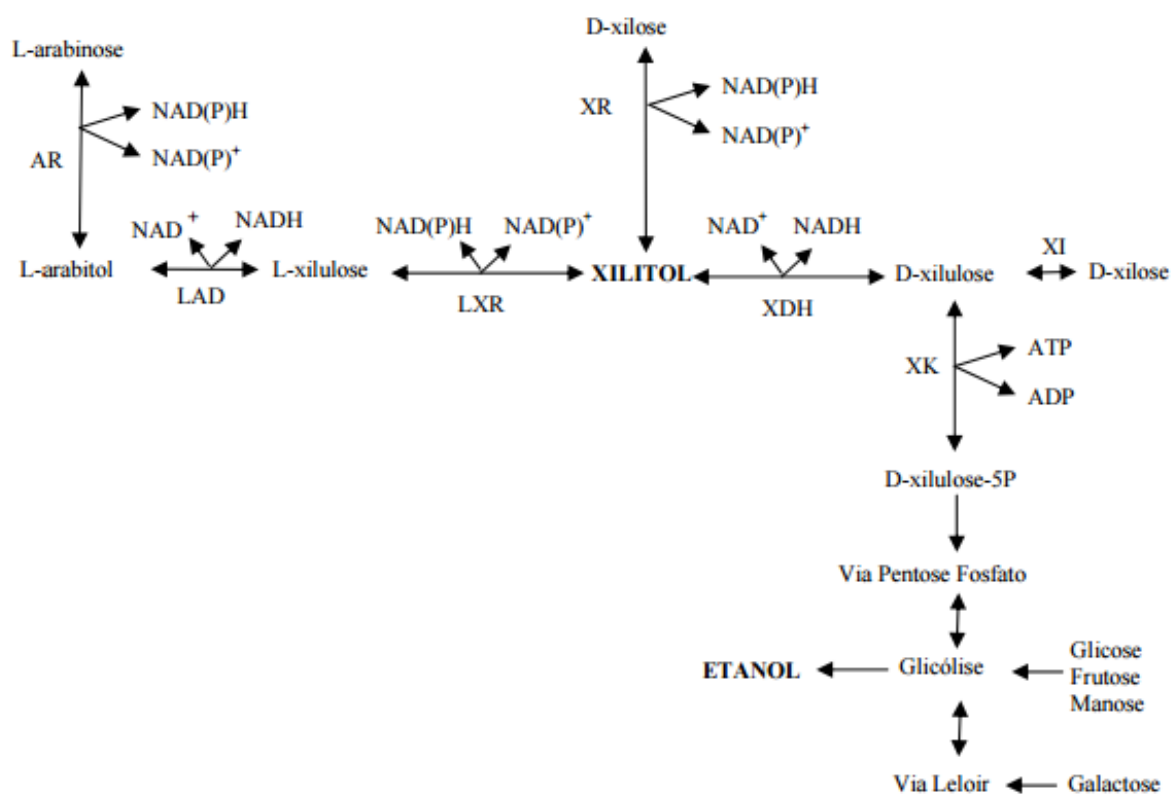
O processo fermentativo da L-arabinose, segunda pentose com maior expressividade na hemicelulose, também ocorre através da via metabólica das pentoses-fosfato. No entanto, a L-arabinose passa por etapas de oxi-redução, nas quais a pentose é oxidada a L-arabitol pela enzima L-arabinose redutase (AR), seguida pela ação de redução da enzima L-arabinitol 4-desidrogenase (LAD) originando a L-xilulose. O produto da LAD é posteriormente oxidado a xilitol pela L-xilulose redutase (LXR), seguindo então a via da pentose-fosfato, Figura 8 (STAMBUK *et al.*, 2008).

Figura 7 - Vias propostas para o metabolismo de xilose e glicose em leveduras fermentadoras de pentose.



Fonte: HAHN-HAGERDAL, 1994 (Modificado).

Figura 8 - Esquema simplificado do metabolismo dos principais açúcares liberados durante o processo de hidrólise da hemicelulose

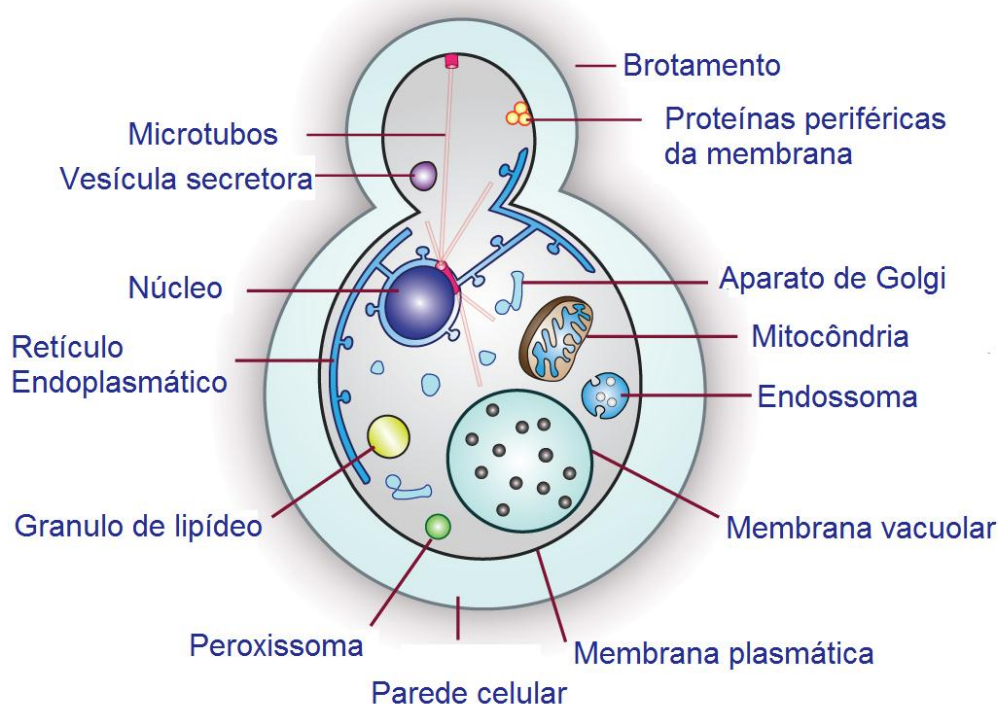


Fonte: PEREIRA, 2010.

3.3 Leveduras

As leveduras são micro-organismos unicelulares heterotróficos pertencentes ao reino *Fungi* e apresentam características típicas do grupo, tais como, presença de parede celular rígida e núcleo organizado com membrana nuclear (KURTZMAN *et al.*, 2011), como ilustrado na Figura 9. Microscopicamente, as células podem apresentar formas variadas, tais como: esféricas, ovais, elípticas, apiculadas, triangulares entre outros. Em se tratando da reprodução, pode ser sexuada ou assexuada, a qual, esta última, ocorre por brotamento ou por cissiparidade (FUENTEFRÍA, 2007; SOARES, 2015; KURTZMAN *et al.*, 2011, DIAS, SCHWAN, 2010). Algumas espécies apresentam dimorfismo sexual e podem produzir pseudo-hifa e hifas verdadeiras durante seu crescimento (DIAS, SCHWAN, 2010). As leveduras estão inseridas no sub-reino *Dikarya*, sendo classificadas de modo generalizado como Ascomycota e Basidiomycota devido a formação de ascósporo (ascomicetos) e basidiósporos (basidiomicetos) (KURTZMAN *et al.*, 2011; ASSUNÇÃO, 2015).

Figura 9 - Representação esquemática da célula de levedura.



Fonte: KARL, 2017

O número de leveduras identificadas tem aumentado a cada ano, com cerca de 1500 espécies descritas até o ano de 2011, entretanto, estima-se que este número represente apenas 1% das espécies existentes no planeta (KURTZMAN *et al.*, 2011, AZHAR, 2017, KURTZMAN *et al.*, 2015).

A identificação dos micro-organismos naturalmente ocorrentes é realizada por meio de comparação com espécies previamente classificadas baseando-se em características similares (KURTZMAN *et al.*, 2011). A primeira etapa do processo de identificação das leveduras consiste na classificação quanto a sua sexualidade (Ascomycetos ou Basidiomycetos). As demais subdivisões taxonômicas (famílias, gêneros e espécies) são estabelecidas pelas características morfológicas, fisiológicas e genéticas dos micro-organismos (AZHAR, 2017).

As análises macro e microscópica de colônias de leveduras compõem etapas necessárias no processo de identificação, possibilitando classificá-las em morfotipos (GUIMARÃES, 2016). Todavia, os testes bioquímicos e fisiológicos tais como, fermentação de carboidratos, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e crescimento em variadas temperaturas, são necessários para uma melhor caracterização destes micro-organismos (PITTY; HOCKING, 2009; KURTZMAN *et al.*, 2011). Atualmente, as análises supracitadas são

complementadas com os testes moleculares a fim de conferir maior segurança e agilidade aos processos de identificação, principalmente para as linhagens, cuja diferenciação não é possível por meio das características morfológicas essenciais (ROSA, PÉTER, 2006; PITY; HOCKING, 2009; KURTZMAN *et al.*, 2015, GUIMARÃES, 2016).

As pesquisas de identificação molecular que empregam técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e suas variações possuem como principal objeto de estudo os DNA ribossomais, os quais estão presentes em todos os micro-organismos (KURTZMAN; FELL, 1998, KURTZMAN *et al.*, 2015). Os genes ribossomais nas leveduras estão agrupados em *clusters* que estão presentes em várias cópias no genoma, com os segmentos 5S, 5.8S, 18S e 26S, na disposição 5'-3'. Os espaços transcritos internos (ITS) são regiões menos conservadas que se intercalam entre esses genes e são denominados ITS1 e ITS2 (KURTZMAN *et al.*, 2015; GUIMARÃES, 2016). O iniciador ITS é favorável para a identificação das leveduras uma vez que possui uma ampla variabilidade entre espécies e pode ser facilmente amplificada com os primers universais NL1/NL4 (SOARES, 2015). O gene 26S são empregados para diferenciação em nível de gênero e espécies, enquanto a região ITS é frequentemente usada para separar espécies próximas e/ou subespécies (ROSA, PÉTER, 2006).

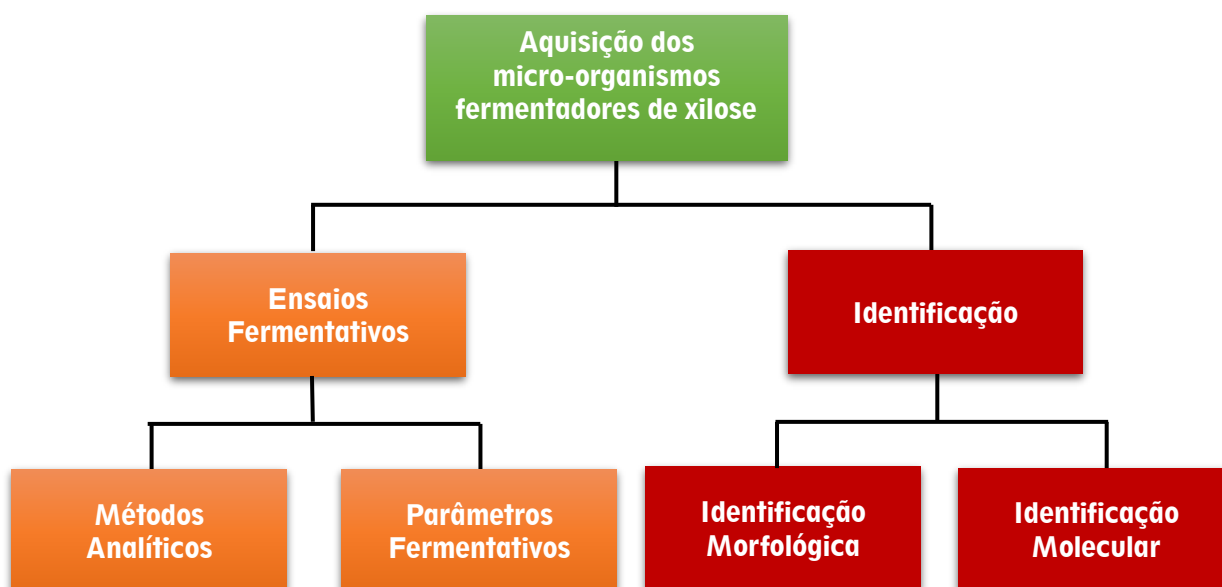
As leveduras têm beneficiado a humanidade há milênios, e apresentam papel fundamental na indústria. Neste sentido algumas linhagens desempenham papel relevante nos processos biotecnológicos, principalmente nos setores de produção de bebidas, alimentos, fármacos, dentre outros (SOUZA, 2011, KURTZMAN, FELL, BOEKHOUT, 2011). Algumas espécies têm papel chave na produção de biocombustíveis, dentre elas, a na indústria do bioetanol de primeira geração. Algumas linhagens podem ainda, ser utilizadas como matéria-prima para a produção de combustíveis, como é caso do gênero *Rhodotorula spp.*, leveduras empregado na produção de biodiesel (IRAZUSTA, 2013; HUBENOVA *et al.*, 2017; ZHAO *et al.*, 2010, CHI *et al.*, 2016). Na indústria do etanol lignocelulósico, além da *S. cerevisiae* utilizada na conversão das hexoses, tem-se os gêneros *Kluyveromyces sp*, *Scheffersomyces sp*, *Hansenula sp*, *Debaryomyces sp* e *Spathaspora sp*, *Clavispora sp*, *Issatchenkia sp*, *Pachysolen sp.*, *Meyerozyma sp.*, *Candida sp* descritos como capazes de converter pentoses, com a D-xilose, à etanol, com diferentes graus de rendimento (PROMPT, 2012; RAO, BHADRA, SHIVAJI, 2008; MUPONDWA *et al.*, 2016, AGBOGBO *et al.*, 2006). Dentre as espécies atualmente identificadas como fermentadoras de pentose, as que mais se destacam são a *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia stiptis*), *Meyerozyma guilliermondii* (*Candida guilliermondii* / *Pichia guilliermondii*), *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora passalidarum* e *Candida tenuis*

(SOARES, 2015). Pesquisas na última década têm-se centrado em modificações moleculares/genéticas da *Saccharomyces sp.* para a produção eficiente e viável de etanol utilizando os açúcares de cinco carbonos como substrato (HUBENOVA *et al.*, 2017; MUPONDWA *et al.*, 2016, AZHAR *et al.*, 2017). A habilidade de leveduras, como a *S. cerevisiae*, para a produção de etanol e outros produtos orgânicos impulsionam as pesquisas que empregam tais micro-organismos na tecnologia de produção de biocombustíveis (KURTZMAN, FELL, BOEKHOUT, 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas de identificação das leveduras fermentadoras de xilose e a avaliação do potencial fermentativo das mesmas encontram-se descritas a seguir e resumidas de forma esquemática na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma da metodologia empregada no presente estudo.



Fonte: Próprio autor.

4.1 Aquisição e manutenção dos micro-organismos

As seis linhagens de culturas leveduriformes utilizadas neste estudo, mantidas sob congelamento em microtubos tipo *Eppendorf* em meio YEPM (3,0 g L⁻¹ de extrato de levedura, 3,0 g L⁻¹ de extrato de malte, 5,0 g L⁻¹ de peptona de soja, 10g L⁻¹ de glicose) com 10% de glicerol, fazem parte do banco de micro-organismos do grupo de pesquisa do LabBBio/UFVJM. As linhagens de leveduras codificadas como R10, R150, 2G, 4G, 5G e 8G foram reativadas em meio YEPM acrescido de 1,5% (m/v) de ágar-ágar, por inóculo em estria, com incubação a 30°C por 48 horas, para os posteriores ensaios descritos a seguir. A manutenção dos micro-organismos se deu pela mesma metodologia da reativação, seguida do armazenamento das colônias crescidas em geladeira a 4°C.

4.2 Identificação morfológica e bioquímica das leveduras fermentadoras de D-xilose

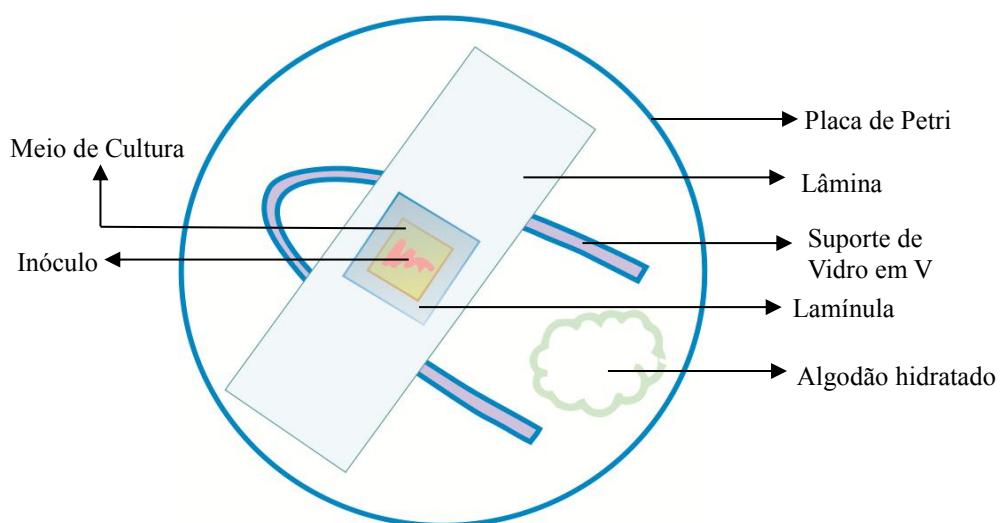
As linhagens de leveduras selecionadas com base no seu potencial para a produção de etanol a partir de xilose foram submetidas ao processo de identificação, empregando métodos bioquímicos e morfológicos.

4.2.1 Características morfológicas

As linhagens previamente isoladas de biomassas vegetais foram reativadas e submetidas às análises morfológicas macro e microscópicas. As análises macroscópicas foram realizadas a partir das colônias, onde retirou-se uma alçada de biomassa e transferiu-a para um microtubo tipo *Eppendorf* com 1 mL de água destilada estéril para o esgotamento das fontes energéticas por 48 h a 28°C. As linhagens esgotadas foram inoculadas, por microgotas (10 µL), em duplicatas nos meios YEPM-ágar e Ágar acetato. As culturas foram avaliadas quanto ao seu crescimento em diferentes temperaturas de incubação (28 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C e 40 °C). Foram observados como parâmetros da colônia o tamanho, a cor, o tipo de borda (lisa, irregular, ondulada) e perfil (lisa, rugosa, côncava, convexa, achatada) das culturas, sendo monitoradas por um período de até 21 dias.

As análises microscópicas foram realizadas pela técnica de cultivo em lâmina (Ridell, 1950), com câmaras de microcultivo preparadas com o meio YEPM, Figura 11, e incubadas a 28 °C. Foram observadas as características estruturais e reprodutivas dos microorganismos, tais como: tipo de reprodução, formação de pseudohifa e hifa verdadeira, forma da célula e presença de clamidósporo e conídeos. As observações foram realizadas em microscópio óptico (microscópio bioval e *Bel Photonic*) utilizando as lentes objetivas de 40x e 100x. As imagens microscópicas foram capturadas com câmera digital Canon *Bel Photonic* de 5,0 Mpixel.

Figura 11 - Representação esquemática da câmara úmida de microcultivo empregada no preparo das lâminas para observação das estruturas microscópicas.



Fonte: Próprio autor.

4.2.2 Características bioquímicas

Os testes fisiológicos e bioquímicos de DBB, hidrólise de amido, hidrólise de ureia e assimilação de carbono e nitrogênio, utilizados no presente estudo, estão descritos na literatura como os mais comumente utilizados para caracterização e identificação de leveduras (PITTY; HOCKING, 2009; KURTZMAN, FELL, BOEKHOUT, 2011).

4.2.2.1 *Diazonium B Blue (DBB)*

O *Diazonium B Blue test* (DBB) é um teste químico que distingue os fungos leveduriformes em dois grandes grupos, ascomicetos e os basidiomicetos (HAGLER; AHEARN, 1981). O teste foi realizado a partir de linhagens cultivadas em meio YMPD por 10 dias a 28°C seguido de incubação por 6 horas a 55°C. Em seguida, procedeu-se a adição de 50 µL do reagente DBB (1mg mL⁻¹ de DBB em solução de tampão Tris-HCl a 0,1M com pH 7,0) sobre as colônias. Após dois minutos de reação, procedeu-se a leitura dos resultados através da observação da coloração da superfície da colônia. A presença da coloração vermelha proveniente de uma reação com a solução tampão de DBB, indica resultado positivo para o grupo basidiomiceto (KURTZMAN *et al.*, 2011).

4.2.2.2 Teste de urease

A hidrólise da ureia, consequente da secreção da urease, foi realizada a partir de culturas previamente cultivadas por 48 horas em meio YEPM. Para tanto foram adicionados, assepticamente, em um tubo de ensaio rosqueado, 1 mL do meio urease composto por 0,1 g L⁻¹ de extrato de levedura, 0,091 g L⁻¹ de fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄), 0,095 g L⁻¹ de fosfato monobásico de sódio (Na₂HPO₄), 20 g L⁻¹ de ureia e 0,01 g L⁻¹ de vermelho fenol, com pH de 6,9. O meio teste foi inoculado com uma alçada de células de leveduras reativadas em meio YEPM, como já descrito, e incubado a 37 °C. Os tubos foram monitorados a cada trinta minutos, por quatro horas. A mudança de coloração do meio de amarelo para vermelho ou laranja indicou atividades positivas.

4.2.2.3 Hidrólise de amido

A hidrólise do amido foi analisada a partir do inóculo de 10 µL proveniente da suspensão esgotada de células das linhagens estudadas, no meio de cultura contendo, extrato de carne 3,0 g L⁻¹, amido 10,0 g L⁻¹ e ágar 12,0 g L⁻¹, seguido de incubação a 28 °C por um período de 48 horas. Após a adição de lugol sobre a superfície do meio, procedeu-se a leitura do teste através da observação da formação de halo ao redor da colônia, indicando a atividade de hidrólise de amido (positiva).

4.2.2.4 Teste de Assimilação de Carboidratos e Nitrogênio

A habilidade de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio pelas linhagens de leveduras foi avaliada utilizando a técnica de réplica *plating* no meio Yeast Nitrogen Base – YNB (0,3% extrato de levedura; 0,3% extrato de malte; 0,5% peptona; 1% glicose; 2% Ágar) adicionando diferentes fontes de carbono e nitrogênio com a concentração de 0,5 M. Os testes de assimilação de carbono foram preparados utilizando as seguintes fontes: amido, glicerol, xilitol, metanol, galactose, maltose, sacarose, melibiose, celobiose, rafinose, melizitose, trealose, inulina, eritrol, D-arabinose e L-arabinose. Os testes de assimilação de nitrogênio foram analisadas empregando: nitrato e nitrito de sódio, etilamina, L-lisina, d-glucosamina, cadaverina, creatinina e D-triptofano. A propriedade de assimilar ou não diferentes fontes de carbono e nitrogênio auxiliam na distinção das espécies de acordo com seu padrão assimilativo

(KURTZMAN, FELL, BOEKHOUT, 2011).

4.2.2.5 Teste de fermentação de Carboidratos

O teste de fermentação de carboidratos foi conduzido utilizando meio base para fermentação, MFB, (0,75% de peptona de soja, 0,5 % de extrato de levedura e 0,4 % de azul de bromotimol); empregando como fontes os seguintes carboidratos: glicose, galactose, maltose, sacarose, melibiose, celobiose, rafinose, melizitose e xilose, na concentração final de 0,05 M. A partir das culturas esgotada foram transferidos 500 µL da suspensão para um tubo de ensaio com tampa rosqueada contendo tubo de Durhan invertido e 3 mL de meio estéril, o ensaio foi incubado a 28°C e monitorado durante 21 dias. A fermentação foi considerada positiva quando ocorreu a fermentação da fonte a qual era observada pela presença de gás no interior dos tubos de Durhan. A produção de ácidos também foi avaliada, sendo observa por meio da mudança da coloração do meio de verde para laranja (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000).

4.3 Identificação Molecular

A extração do DNA das linhagens estudadas utilizando a metodologia do *Fungal Genetics Laboratory (Oklahoma State University)* (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 2000). As linhagens foram cultivadas em Meio sólido YEPM e incubadas a 28°C por 24 horas. A cultura foi transferida para um microtubo do tipo *Eppendorf* com o auxílio de uma alça de inoculação, no qual foi adicionado 1,0 mL de solução de extração tampão (1,0 mL de EDTA 0,5M pH 8,0; 1,0 mL SDS 10%, 8,0 mL água Milli-Q estéril) e incubados em banho-maria a 68°C por 10 minutos. Após o período de incubação procedeu-se a centrifugação a 13.000g durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e a este adicionado 100 µL de acetato de potássio 5M pH de 4,8; seguido de incubação em banho de gelo por 10 minutos. A mistura foi então submetida a centrifugação a 13.000g por 5 minutos e o sobrenadante foi novamente recuperado, e então, adicionado de etanol a 95% na proporção de 2,5 vezes o volume do sobrenadante. Depois de observada a precipitação das proteínas por etanol, a mistura foi novamente centrifugada e o sobrenadante descartado. O *pellet* remanescente do processo de centrifugação foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol a 70% e o precipitado, contendo DNA, foi dissolvido em 50 µL de solução de tampão Tris-EDTA (TE).

As amostras de DNA genômico tiveram as regiões equivalentes do RNA ribossômico das linhagens amplificadas, utilizando iniciadores universais (WHITE *et al.*, 1990).

A reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) foi realizada conforme descrito por Miguel *et al.* (2010). Foram empregados iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAA-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') para a amplificação do domínio D1/D2 da região rDNA 26S e os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para a amplificação da região ITS do rDNA 5.8S.

A partir da reação de PCR e do sequenciamento dos produtos de amplificação, ambos realizados pela empresa *Macrogen USA*, foram feitas as pesquisas de homologia por meio do programa *Basic Local Alignment Sequence Tool* (BLAST) com base nas sequências depositadas no banco de dados GenBank (*National Center for Biotechnology Information*).

4.4 Ensaio Fermentativos

Os meios de fermentação foram preparados com base em diferentes formulações seguindo diferentes autores conforme apresentado na Tabela 4. Os meios após preparados foram autoclavados a 120 °C, 1 atm por 15 minutos. A xilose presente nos meios foi autoclavada separadamente, nas mesmas condições, contudo, por apenas 5 min. O potencial fermentativo das leveduras estudadas foi avaliado utilizando cinco diferentes formulações de meios sintéticos propostos na literatura, os quais foram denominados de: Meio 1, Meio 2, Meio 3, Meio 4 e Meio 5.

Os testes de fermentação, em batelada simples, foram realizados com as linhagens 2G, 4G, 5G, 8G, R10 e R150, com três repetições. O inóculo foi preparado por meio da transferência de uma alçada da cultura reativada em meio YEPM para o meio líquido sintético proposto por OLIVEIRA (2010), seguido de incubação por 48h, a temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm. Após o período de crescimento, a mistura foi centrifugada a 4.000 rpm por 10 minutos. Em seguida a biomassa proveniente do processo de centrifugação (precipitado) foi recuperada e ressuspensa em água destilada estéril até a concentração de uma densidade óptica em leitura espectrofotométrica a 600 nm ($D.O_{600\text{nm}}$). O inóculo foi realizado na proporção de 1:10 (v/v), inóculo:meio. O processo fermentativo foi realizado em frasco cônico de 250 mL contendo 100 mL do meio inoculado e submetido à incubação de 30°C a 150 rpm até ser observado a estabilização do consumo de açúcar.

Os bioprocessos foram monitorados a intervalos regulares de tempo quanto à concentração de açúcares redutores, glicose e biomassa celular. O etanol foi quantificado ao final do processo fermentativo. Na Figura 12 encontra-se um esquema com as etapas gerais do

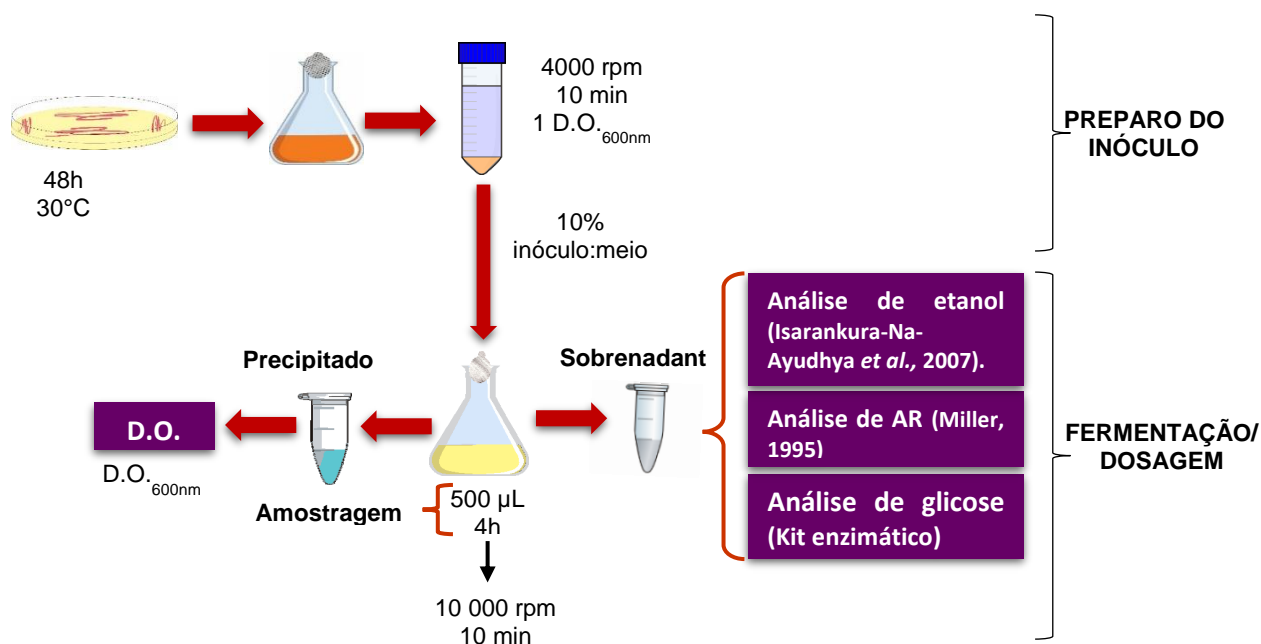
processo de fermentação.

Tabela 4 - Composição dos meios de cultura utilizados nos processos fermentativos, com base na literatura, para produção de etanol a partir de linhagens fermentadoras de D-xilose.

Meio (Autor)	Nutriente	Concentração
MEIO 1 (OLIVEIRA, 2010)	Xilose	20,00 g L ⁻¹
	Ureia	1,25 g L ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	1,10 g L ⁻¹
	Extrato de levedura	2,00 g L ⁻¹
	Soluções de sais*	40,00 mL
MEIO 2 (BELLIDO <i>et al.</i> , 2013)	Xilose	20,00 g L ⁻¹
	Glicose	30,00 g L ⁻¹
	Extrato de levedura	10,00 g L ⁻¹
	Peptona	20,00 g L ⁻¹
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,47 g L ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	12,80 g L ⁻¹
	Na ₂ HPO ₄	0,51 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,47 g L ⁻¹	
MEIO 3 (SILVA <i>et al.</i> , 2012 adaptado)	Xilose	30,00 g L ⁻¹
	Glicose	15,00 g L ⁻¹
	Extrato de levedura	3,00 g L ⁻¹
	Ureia	2,30 g L ⁻¹
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,00 g L ⁻¹
MEIO 4 (WILKINS <i>et al.</i> , 2008 adaptado)	Xilose	10,00 g L ⁻¹
	Glicose	10,00 g L ⁻¹
	Extrato de levedura	0,50 g L ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	2,00 g L ⁻¹
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,00 g L ⁻¹
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,00 g L ⁻¹
	MnSO ₄	0,10 g L ⁻¹
MEIO 5 (FU <i>et al.</i> , 2009)	Xilose	20,00 g L ⁻¹
	Glicose	30,00 g L ⁻¹
	Extrato de levedura	10,00 g L ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	1,00 g L ⁻¹
	MgCl	1,00 g L ⁻¹
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00 g L ⁻¹

Fonte: Próprio autor. *Composição da solução de sais: 12,5 g L⁻¹ MgSO₄ x 7H₂O, 1,25 g L⁻¹ CaCl₂ x 2H₂O, 12,5 g L⁻¹ de ácido cítrico, 0,9 g L⁻¹ de FeSO₄x7H₂O, 0,19 g L⁻¹ de MnSO₄, 0,30 g L⁻¹ de ZnSO₄x7H₂O, 0,025 g L⁻¹ de CuSO₄x5H₂O, 0,025 g L⁻¹ de CoCl₂x6H₂O, 0,035 g L⁻¹ de NaMoO₄x2H₂O, 0,050 g L⁻¹ de H₃BO₃, 0,009 g L⁻¹ de KI e 0,0125 g L⁻¹ de Al₂(SO₄)₃

Figura 12 - Representação esquemática das etapas de condução dos processos fermentativos utilizando diferentes meios de cultivo para produção de etanol empregando linhagens fermentadoras de D-xilose.



Fonte: Próprio autor.

4.4.1 Monitoramento do bioprocesso

O ensaio fermentativo foi monitorado a cada quatro horas com a retirada de uma alíquota de 500µL de meio. A partir desta alíquota, submetida à centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi recuperado e reservado para a dosagem dos açúcares redutores (AR) e glicose. O *pellet* remanescente da centrifugação foi suspenso em água destilada estéril para quantificação da biomassa por leitura de D.O $_{600\text{ nm}}$.

4.4.1.1 Açúcares Redutores (AR)

A dosagem de açúcares redutores (AR) foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). A quantificação foi realizada em microtubo contendo 100 µL da amostra (sobrenadante) e 100 µL do reagente DNS, seguidos de incubação a 100°C por 5 min e adição de 1,0 mL de água. Uma curva analítica foi preparada utilizando D-glicose como referência nas concentrações de 0,0 a 1,0 g L⁻¹, preparada de acordo com o procedimento empregado para a amostra. Após homogeneização procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

4.4.1.2 Determinação da concentração de glicose

O teor de glicose foi determinado seguindo a metodologia enzimática descrita por Lloyd e Whelan (1969). A quantificação foi realizada pelo kit enzimático colorimétrico GLICOSE PP (Trinder da empresa ANALISA) a partir de 10 μL da amostra e 1000 μL do reagente analítico. A mistura foi submetida à incubação a 37°C durante 10 minutos, com posterior leitura da absorbância das amostras por espectrofotometria a 505nm. Os cálculos de quantificação da glicose foram baseados nos valores de absorbância da mistura de 10 μL da solução analítica padrão com 1000 μL do reagente analítico nas mesmas condições empregadas na amostra.

4.4.1.3 Dosagem de etanol

A quantificação do etanol produzido foi realizada após a estabilização do consumo dos açúcares. A dosagem de etanol foi realizada pelo método colorimétrico do dicromato de potássio a 0,1M preparado em solução de ácido sulfúrico a 5M (ISARANKURA-NA-AYUDHYA *et al.*, 2007). A amostra foi previamente submetida à destilação em microdestilador de álcool TEC132/TECNAL e em seguida, em um microtubo tipo *Eppendorf* foram adicionados 150 μL do destilado e 1,5 mL do reagente dicromato de potássio em ácido sulfúrico. A reação permaneceu em repouso por 15 minutos e a intensidade da cor formada foi determinada por espectrofotometria a 590nm. Os cálculos das concentrações foram baseados na construção da curva analítica com pontos de 0,0 a 37,5 g L^{-1} de etanol.

4.4.2 Variáveis respostas

As variáveis de resposta do bioprocessamento, como fatores de rendimento em produção de etanol ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica (Q_P) e taxa de consumo (q_S), foram calculadas com base no consumo de substrato, tempo de fermentação, formação do produto e crescimento da biomassa.

4.4.2.1 Rendimento de produção de etanol ($Y_{P/S}$)

O fator de rendimento em etanol foi calculado pela relação entre gramas de etanol produzido e gramas de açúcares totais consumidos. Os resultados serão expressos em

$g_{\text{produto}}/g_{\text{substrato}}$, pela Equação 1.

$$Y_{P/S} = \frac{\text{etanol produzido}}{\text{açúcares consumidos}} \quad \text{Equação (1)}$$

4.4.2.2 Produtividade volumétrica (Q_p)

A produtividade volumétrica foi calculada pela razão entre a concentração de etanol produzido e o tempo de fermentação (EQ. 2).

$$Q_p = \frac{\text{etanol produzido (g L}^{-1}\text{)}}{\text{tempo (h)}} \quad \text{Equação (2)}$$

4.4.2.3 Taxa máxima de consumo de substrato (q_s)

A taxa máxima de consumo foi obtida através do cálculo da tangente na máxima inclinação da curva de consumo de glicose (EQ. 3) e xilose (EQ.4).

$$q_{s,\text{glicose}} = \frac{\Delta\text{glicose}}{\Delta\text{tempo}} \quad \text{Equação (3)}$$

$$q_{s,\text{xilose}} = \frac{\Delta\text{xilose}}{\Delta\text{tempo}} \quad \text{Equação (4)}$$

4.4.3 Análise estatística

Os ensaios fermentativos foram conduzidos com três repetições e as análises do monitoramento do processo foram realizadas em triplicatas. Os dados obtidos foram analisados através da análise de variância e teste de comparação de médias de Tukey a 95% de confiança, utilizando o *software* livre R. Como testes adicionais, realizou-se a análise de *clurstes* também no *software* R empregando a metodologia euclidiana para o cálculo das distâncias e a metodologia de ligação Ward para a construção dos dendrogramas, utilizando as bibliotecas *vegan* e *cluster*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação molecular e morfológica

A pesquisa do grau de homologia utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) juntamente com as sequências do banco *National Center for Biotechnology* (NCBI), Tabela 5, indicaram 100% de homologia das linhagens 2G e 8G com com a espécie *Rhodotorula mucilaginosa* quando analisada a região D1/D2 do 26S rDNA amplificada. Os resultados da análise na região ITS1/ITS2 apresentou 100% de identidade da linhagem 2G com a espécie *Rhodotorula mucilaginosa*, entretanto, 88% de homologia com essa espécie para linhagem 8G. A levedura 4G apresentou 97% de homologia com a espécie *Candida orthopsilosis* quando utilizada a região ITS1/ITS2 e 100% de homologia à mesma espécie quando utilizada, para a comparação, a região D1/D2.

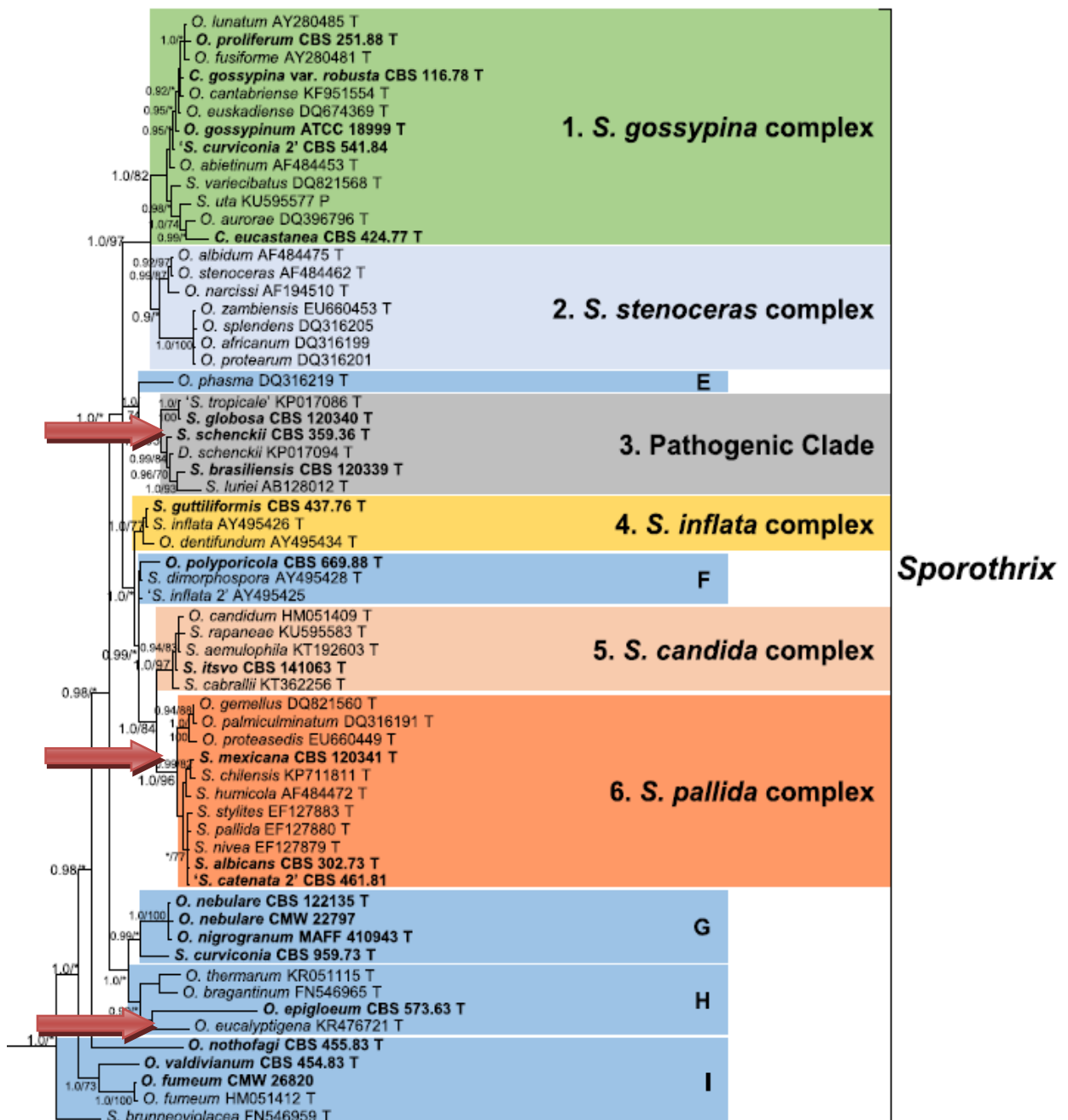
A pesquisa de similaridade para a linhagem 5G indicou 99% de identidade à espécie *Sporothrix schenckii* e 99% de homologia à espécie *Ophiostoma eucalyptigena*, quando utilizada a região D1/D2 como parâmetro de comparação. Os resultados para esta linhagem quando analisada a região ITS1/ITS2 indicaram 99% de homologia com a espécie *Sporothrix mexicana*. O autor Beer, Duong e Wingfield (2016) descreveram a relação filogenética entre os gêneros *Ophiostoma* e *Sporothrix*, na qual ressaltou que o *S. schenckii* assexuado estava filogeneticamente relacionado ao gênero sexual (telemorfo) *Ophiostoma*. Estes autores relatam ainda, que todas as espécies referidas para a linhagem 5G são pertencentes ao gênero *Sporothrix*, Figura 13.

Kurtzman *et al.* (2015) relataram que os resultados divergentes entre as regiões D1/D2 e ITS, podem, possivelmente, estar relacionados aos resultados de hibridizações interespecíficas, diferentes taxas de substituição ou outras alterações genéticas. Em função dos resultados divergentes, não foi possível identificar a levedura 5G em nível de espécie, concluindo apenas se tratar de um representante do gênero *Sporothrix*.

A linhagem R10 apresentou 99% de homologia para espécie *Galactomyces geotrichum* quando o parâmetro de comparação utilizado foi a região ITS do 5.8S rDNA amplificada. Os resultados de homologia para a linhagem R150 indicaram 99% de similaridade com a espécie *Geotrichum candidum* utilizando a região ITS amplificada como parâmetro de comparação, entretanto, quando foi comparada a sequência parcial da região D1/D2 do 26S rDNA amplificada, a linhagem apresentou 99% de homologia com a espécie *Galactomyces geotrichum*. Segundo Kurtzman, Fell e Boekhout (2011), a espécie *Galactomyces geotrichum*

é considerada como o teleomorfo (fase sexual) do *Geotrichum candidum*, deste modo, ambas nomenclaturas referem-se ao mesmo fungo, diferenciando apenas a fase assexual ou sexual.

Figura 13 - Filogenia Bayesiana derivada de análises do conjunto de dados da região ITS para o gênero *Spotothrix*.



Fonte: BEER *et al.*, 2016.

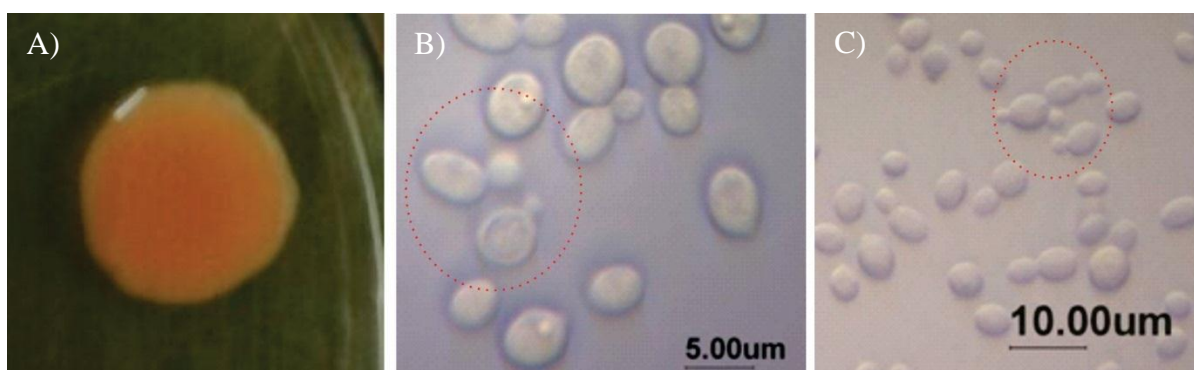
Tabela 5 - Identificação e origem da coleta das linhagens de leveduras fermentadoras de D-xilose utilizadas nos ensaios fermentativos para produção de etanol.

Código	Origem	Pesquisa de homologia Região ITS	Pesquisa de homologia Região D1/D2
2G	Bagaço de cana de açúcar	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (100%)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (100%)
4G	Arroz doce	<i>Candida orthopsilosis</i> (97%)	<i>Candida orthopsilosis</i> (100%)
5G	Bagaço de cana de açúcar	<i>Sporothrix schenckii</i> (99%) <i>Ophiostoma ercalyptigena</i> (99%)	<i>Sporothrix mexicana</i> (99%)
8G	Bagaço de cana de açúcar	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (88%)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (100%)
R10	Inhame	-	<i>Galactomyces geotrichum</i> (99%)
R150	Tomate	<i>Galactomyces candidum</i> (99%)	<i>Galactomyces geotrichum</i> (99%)

Fonte: Próprio autor.

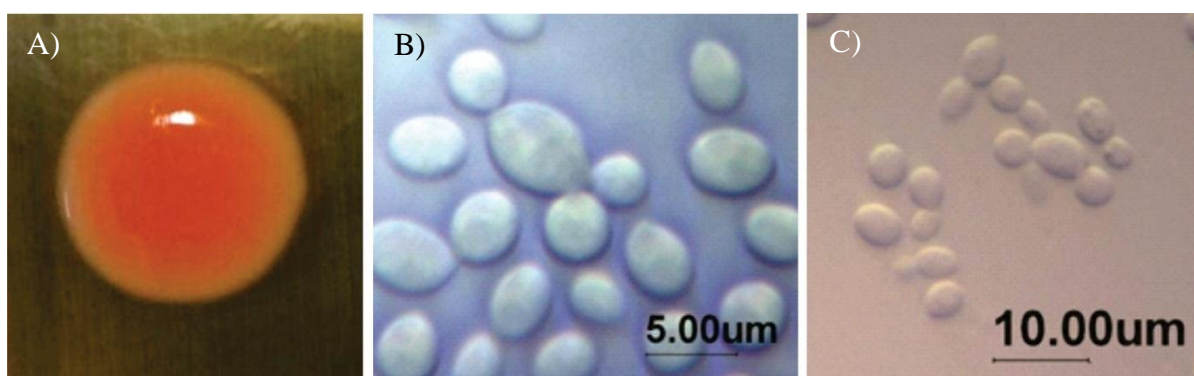
Segundo Saha e Seal (2015), *Rhodotorula sp.* é uma espécie de leveduras endófitas em muitas plantas, como, tais como, maçã, tomate, madeira de algodão selvagem e arroz. Rosa e Péter (2006) relataram que *Rhodotorula sp.* foi uma das duas espécies dominantes encontradas em condições de alta salinidade em lagoas de evaporação de águas residuais químicas. Estudos indicam que a espécie *R. mucilaginosa* é capaz realizar a biodegradação de pesticidas orgânicos de alta toxicidade (PACIA *et al.*, 2016), o que ressalta a capacidade deste micro-organismos se desenvolver mesmo em condições adversas. A análise morfológica macroscópica das leveduras crescidas no meio YEPM a 28°C por 48 horas demonstraram que as colônias apresentaram forma circular, sem pigmento difuso, Figuras 14A e 15A. As linhagens 2G e 8G apresentaram aspecto cremoso, perfil achatado e superfícies e bordas lisas. As colônias de *R. mucilaginosa* apresentaram pigmentação alaranjada como descrito na literatura (KONEMAM, WINN, 2008), entretanto, a coloração da colônia 8G se mostrava mais intensa que a apresentada na colônia da linhagem 2G. Microscopicamente (FIG. 14B, 14C, 15B, 15C) as espécies de *Rhodotorula sp* (2G e 8G), apresentaram células ovais em grumos frouxos e irregulares com reprodução por brotamento, corroborando com as descrições de Konemam e Winn (2008).

Figura 14 - Aspecto morfológico macroscópico e microscópico da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* (2G) cultivada no meio YEPM a 30 °C.



Fonte: Próprio Autor. A) Aspecto macroscópico da colônia mostrando coloração alaranjada; B) Aspecto microscópico, células leveduriformes, ovais, em brotamento unipolar, com 24 horas de cultivo, aumento de 100x, barra de escala = 5µm; C) Aspecto microscópico mostrando células de leveduras, ovais, com brotamento uni e bipolar com 24 horas de cultivo, aumento de 40x, barra de escala = 10µm.

Figura 15 - Aspecto morfológico macroscópico e microscópico da espécie *Rhodotorula mucilaginosa* (8G) cultivada no meio YEPM a 30 °C.

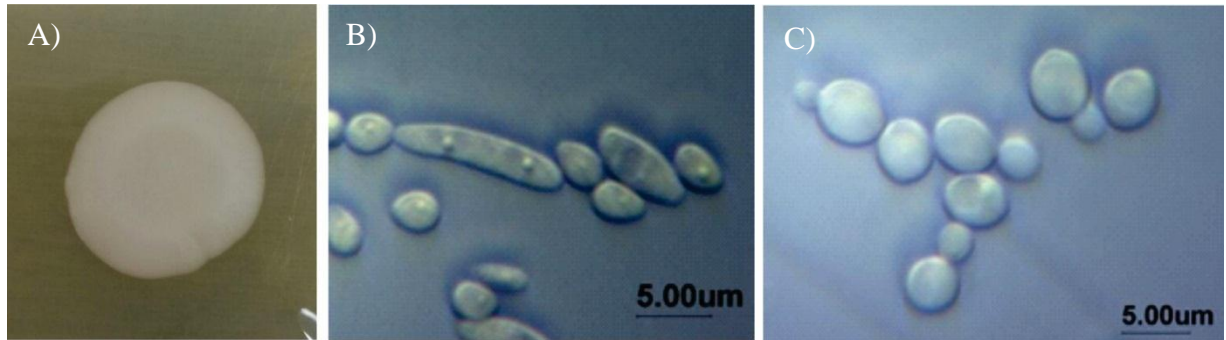


Fonte: Próprio Autor. A) Aspecto macroscópico da colônia mostrando coloração alaranjada escura; B) Aspecto microscópico, células leveduriformes, ovais e em brotamento unipolar e multipolar, com 24 horas de cultivo, aumento de 100x, barra de escala = 5µm; C) Aspecto microscópico mostrando células de leveduras, ovais, com brotamento unipolar, com 24 horas de cultivo, aumento de 40x, barra de escala = 10µm.

A linhagem 4G, identificada como *C. orthopsilosis*, apresentou aspecto cremoso, coloração creme, superfície e bordas lisas, e perfil achatado, Figura 16A, a descrição obtida corrobora com a descrita por Kurtzman, Fell e Boekhout (2011). A microscopia da linhagem 4G, Figura 16B e 16C revelou a presença de ascósporo e blastoconídios, e reprodução por brotamento multilateral, conforme descrito na literatura (LACHANCE *et al.*, 2011). De acordo com os dados fenotípicos e moleculares a *C. parapsilosis* foi dividida em 3 grupos, I-III, os quais recentemente, com base em estudos moleculares, foi segregado em 3 espécies diferentes, denominando os grupos II e III em *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, respectivamente;

enquanto o grupo I permanece inalterado (ROBL *et al.*, 2014; PRYSZCZ *et al.*, 2014, TAVANI *et al.*, 2005).

Figura 16 - Aspecto morfológico macroscópico e microscópico da espécie *Candida orthopsilosis* (4G).

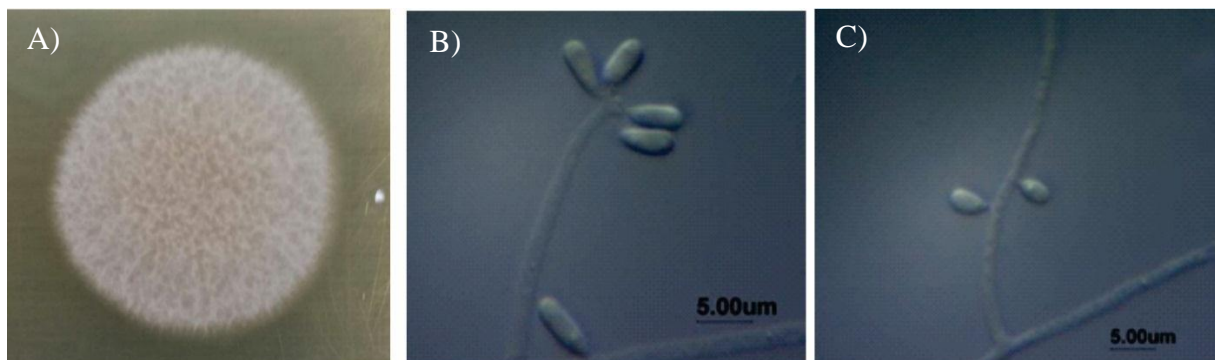


Fonte: Próprio Autor. A) Aspecto macroscópico da linhagem cultivada no meio YEPM por 48 horas, mostrando aspecto cremoso, coloração creme, superfície e bordas lisas, e perfil achatado; B) Células leveduriformes, oblongas a ovaladas em brotamento unipolar, com 24 horas de cultivo em meio ágar acetato, C) Células leveduriformes, ovaladas em brotamento unipolar, com 24 horas de cultivo em meio YEPM. Imagens com aumento de 100x e barra de escala = 5μm.

A colônia codificada como 5G apresentou forma circular, coloração branca, aspecto filamentosos e perfil convexo pregueado, Figura 17A. Esta morfologia é expressa em numerosos membros ambientais da ordem *Ophiostomatales*. A linhagem 5G, pertencente ao gênero *Sporothrix*, apresentou hifas septadas, ramificadas e hialinas, com a presença de conídios lisos, hialinos e ovais, Figura 17B e 17C. Esses conídios se apresentam em grumos semelhantes a margarida a partir da extremidade do conidióforo, corroborando com as características descritas na literatura (KONEMA, WINN, 2008).

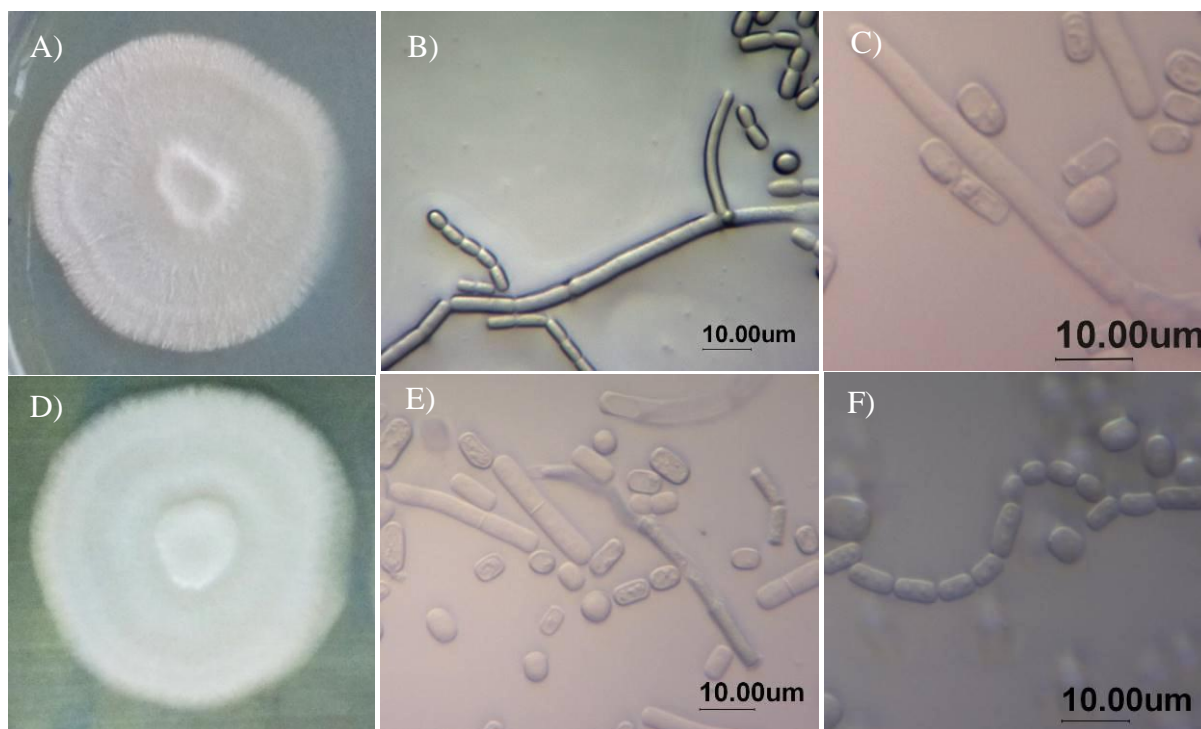
As linhagens *G. geotrichum*, R10 e R150, apresentaram forma circular, superfície com estria concêntrica, borda e aspecto filamentosos e crescimento radial, Figuras 18A e 18D. Apresentaram formação de hifas verdadeiras hialinas com ramificações dicotômicas, que apresentam desarticulação em artroconídeos cilíndricos, Figuras 18B, 18C, 18E e 18F. Foram observados ainda, ascósporos, clamidósporos, e tubo germinativo. Todas as características observadas estão de acordo com as descritas na literatura (HOOG, SMITH, 2011).

Figura 17 - Aspecto morfológico macroscópico e microscópico da linhagem *Sporothrix sp.* (5G), cultivada a 30°C no meio YEPM.



Fonte: Próprio Autor. A) Aspecto macroscópico da linhagem *Sporothrix sp.* cultivada no meio YEPM por 48 horas, mostrando a forma circular, coloração branca, aspecto filamentososo e perfil convexo pregueado, B e C) Microrganismos dimórficos com hifas verdadeiras septadas, ramificadas e hialinas, com a presença de conídios lisos, hialinos e ovais dispostos no ápice do conidióforo lembrando pétalas de margarida ou ainda, inserido diretamente na hifa, com 24 horas de cultivo em meio YEPM a 30°C, aumento de 100x, barra de escala = 5μm;

Figura 18 - Aspecto morfológico macroscópico e microscópico das linhagens *Galactomyces geotrichum* (R10) e (R150), cultivadas a 30°C no meio YEPM.



Fonte: Próprio Autor. A) Aspecto macroscópico da linhagem *Galactomyces geotrichum* (R10) cultivada no meio YEPM por 48 horas, mostrando a forma circular, coloração branca, aspecto filamentososo e estrias concêntricas, B, C, E e F) Microrganismos com hifas verdadeiras septadas com desarticulação em artroconídeos cilíndricos, com 24 horas de cultivo em meio YEPM a 30°C, aumento de 100x, barra de escala = 5μm; D) Aspecto macroscópico da linhagem *Galactomyces geotrichum* (R150) cultivada no meio YEPM por 48 horas, mostrando a forma circular, coloração branca, aspecto filamentososo e estrias concêntricas.

A avaliação do crescimento das linhagens em função do tempo de cultivo encontra-se na Tabela 6. Todas as colônias apresentaram crescimento mínimo de 6 mm com 24 horas de cultivo, no meio YEPM, entretanto, o crescimento no meio com restrições nutricionais, ágar acetato, se limitou ao tamanho mínimo de 4,5 mm com 24 horas de cultivo. As linhagens R10 e R150 apresentaram a maior taxa de crescimento, dobrando o tamanho da colônia em 48 horas de cultivo, entretanto, a linhagem 4G apresentou o menor crescimento neste período. As leveduras R10 e R150 aumentaram cerca de oito vezes o tamanho da colônia em 336 horas de cultivo, ao passo que, para o mesmo tempo, a linhagem 4G aumentou aproximadamente duas vezes o tamanho da colônia. Em se tratando do cultivo no meio ágar-acetato, foi observado o maior tamanho da colônia para as linhagens R10 e R150 com 17,5 e 22 mm, respectivamente, após 336 horas de incubação.

Tabela 6 - Tamanho das colônias das linhagens *Rhodotorula mucilaginosa* (2G), *Candida orthopsilosis* (4G), *Sporothrix sp.* (5G), *R. mucilaginosa* (8G) e *Galactomyces geotrichum* (R10), *G. geotrichum* (R150), em função do tempo de cultivo nos meios YEPM e Ágar-Acetato a 28°C.

Meio	Tempo (horas)	Diâmetro (mm)					
		2G	4G	5G	8G	R10	R150
YEPM	24	6,5	7,0	6,0	7,0	11,0	11,0
	48	8,5	8,0	8,0	9,0	20,5	20,0
	72	9,5	10,0	11,5	10,0	31,0	31,0
	168	15,5	13,5	26,0	16,0	71,5	71,0
	336	16,0	14,0	32,0	17,0	90,0	90,0
Ágar-acetato	24	5,0	4,5	5,0	5,0	5,5	5,0
	48	5,0	4,5	5,5	5,0	7,5	10,0
	72	5,0	4,5	6,5	5,0	7,5	13,0
	168	5,0	4,5	7,0	5,0	17,5	22,0
	336	5,0	4,5	7,0	5,0	17,5	22,0

Fonte: Próprio Autor.

5.1.1 Análises Bioquímicas e Fisiológicas

O resultado do *Diazonium Blue B Color Reaction* (DBB) foi positivo para as linhagens 2G e 8G, indicando se tratar de leveduras basidiomycetos, conforme relatado na

literatura (IRAZUSTA *et al.*, 2013; KURTZMAN, FELL.; BOEKHOUT, 2011). Os resultados dos testes de urease, Tabela 7, foram positivos para as linhagens *Rhodotorula mucilaginosa* (2G e 8G), indicando a presença da enzima ureia amidohidrolases (urease) que tem a capacidade de metabolizar a ureia em moléculas de amônia e gás carbônico (MILNE *et al.*, 2015). Konemam e Winn (2008) relataram que a maioria das linhagens desta espécie são uréase-positivas, expressando seus resultados em até 30 minutos de observação, o que ratifica os resultados encontrados. Após quatro horas de reação, foi observado que as linhagens *Candida orthopsilosis* (4G) e *Sporothrix sp.* (5G) apresentaram resultados negativos para a produção de urease, conforme descrito na literatura (KURTZMAN, FELL, BOEKHOUT, 2011). Entretanto, após 18 (dezoito) horas de reação, observou-se a mudança da coloração do meio inoculado com a linhagem 5G, gênero *Sporothrix*, e consequente expressão da enzima analisada. Em se tratando da hidrólise do amido, todas as espécies avaliadas apresentaram resultados negativos para o teste, evidenciando que estas leveduras não produzem a enzima amilase.

Tabela 7 - Resultados dos testes bioquímicos de urease, hidrólise de amido e DBB realizados para as linhagens de leveduras selecionadas como fermentadoras de D-xilose.

	Linhagem					
	2G	4G	5G	8G	R10	R150
Presença de Urease	+	-	-	+	-	-
Hidrólise de Amido	-	-	-	-	-	-
Reação ao DBB	+	-	-	+	-	-

Fonte: Próprio autor. *Rhodotorula mucilaginosa* (2G), *Candida orthopsilosis* (4G), *Sporothrix sp.* (5G), *R. mucilaginosa* (8G) e *Galactomyces geotrichum* (R10), *G. geotrichum* (R150). Reação dos testes: positivo (+) e negativo (-).

A avaliação da capacidade de crescimento das leveduras testadas em diferentes temperaturas, por meio do teste de microgota em meio YEPM, demonstrou que dentre as condições avaliadas, as temperaturas de 28 °C e 30 °C proporcionaram uma maior taxa de crescimento para as leveduras, Tabela 8. No mesmo meio, todavia em temperaturas superiores a 30°C, somente as leveduras *Candida orthopsilosis* (4G) e *Sporothrix sp.* (5G) apresentaram crescimento. Dentre as leveduras estudadas, *G. geotricum* (R10), *G. geotricum* (R150) e *Sporothrix sp* (5G), quando cultivadas no meio com restrição de substratos, ágar acetato, foram capazes de se desenvolver na temperatura de 28°C.

Tabela 8 - Resultado do teste de crescimento em diferentes meios e temperatura realizado para as linhagens *Rhodotorula mucilaginosa* (2G), *Candida orthopsilosis* (4G), *Sporothrix sp.* (5G), *R. mucilaginosa* (8G), *Galactomyces geotrichum* (R10) e *G. geotrichum* (R150)

Meio	Temperatura	Linhagens					
		<i>R. mucilaginosa</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>S. schenckii</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>G. geotrichum</i>	<i>G. geotrichum</i>
		2G	4G	5G	8G	R10	R150
YEPM	28 °C	+	+	+	+	+	+
	30 °C	+	+	+	+	+	+
	35 °C	-	+	+	-	-	-
	37 °C	-	+	+	-	-	-
	40 °C	-	+	-	-	-	-
Ágar-Acetato	28 °C	-	-	+	-	+	+
	30 °C	-	-	+	-	+	+
	35 °C	-	-	-	-	-	-
	37 °C	-	-	-	-	-	-
	40 °C	-	-	-	-	-	-

Fonte: Próprio autor. Crescimento: positivo (+) e negativo (-).

Os resultados dos ensaios de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, Tabela 9, demonstram que as seis linhagens de leveduras avaliadas apresentam a capacidade de assimilar as pentoses, D-xilose e L-arabinose. Apenas a linhagem 5G foi capaz de assimilar a inulina, que é um biopolímero constituído por resíduos de frutose ligados por ligações β -2,1, que podem ser hidrolisados em fructo-oligossacarídeo ou em frutose (GAO *et al.*, 2016). Esta mesma linhagem também foi capaz de assimilar o polioliol meso-erythrytol como fonte de carbono. Todas as demais fontes de carbono utilizadas no teste foram assimiladas por todas as pelas linhagens de leveduras avaliadas. Em se tratando das fontes de nitrogênio, nitrato, nitrito, L-lisina, cadaverina e creatinina, todas foram assimiladas pelas linhagens testadas.

Tabela 9 - Resultados dos testes de assimilação de carboidratos e nitrogênio para as linhagens *Galactomyces geotrichum* (R10), *G. geotrichum* (R150), *Rhodotorula mucilaginosa* (2G), *Candida orthopsilosis* (4G), *Sporothrix sp.* (5G) e *R. mucilaginosa* (8G).

Fontes	Linhagens					
	2G	4G	5G	8G	R10	R150
Nitrato	+	+	+	+	+	+
Nitrito	+	+	+	+	+	+
L-lisina	+	+	+	+	+	+
Cadaverina	+	+	+	+	+	+
Creatinina	+	+	+	+	+	+
D-glucosamina	+	+	+	+	+	+
D-triptofano	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+
Frutose	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+	+
D-xilose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+
Meso-erythrytol	-	-	+	-	-	-
Trealose	-	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	+	-	-	-
Glicerol	+	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+	+

Fonte: Próprio autor. Crescimento: positivo (+) e negativo (-).

Os resultados de fermentação, quando positivos, tiveram início em 24 ou 48 horas de incubação, a temperatura de 28°C, Tabela 10. As linhagens que fermentaram apresentaram resultado positivo para produção de gás como também proporcionaram a mudança da coloração do meio de fermentação de verde para amarelo indicando produção de ácido. Os meios que apresentaram coloração azulada indicaram resultados negativo para a produção de ácidos (VERMELHO *et al.*, 2006, KURTZMAN, FELL, BOEKHOUT, 2011, YARROW, 1998). Todas as linhagens foram capazes de fermentar a glicose e a xilose, contudo, nenhuma espécie foi capaz de fermentar a sacarose e a maltose. A linhagem de *Sporothrix sp.* foi a única linhagem avaliada capaz de fermentar as fontes de carbono melibiose e rafinose.

Tabela 10 - Resultados dos testes de fermentação de carboidratos realizados para as linhagens *Galactomyces geotrichum* (R10), *G. geotrichum* (R150), *Rhodotorula mucilaginosa* (2G), *Candida orthopsilosis* (4G), *Sporothrix sp.* (5G) e *R. mucilaginosa* (8G).

Fermentação	Linhagens					
	2G	4G	5G	8G	R10	R150
Glicose	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a
Sacarose	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-
Galactose	-	-	-	+ ^b	-	-
Frutose	-	-	-	+ ^b	+ ^b	+ ^b
D-xilose	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a
Melibiose	-	-	+ ^b	-	-	-
Rafinose	-	-	+ ^b	-	-	-

Fonte: próprio autor. Crescimento: positivo (+) e negativo (-). a: fermentação com 24 h de incubação e b: fermentação com 48 h de incubação.

5.2 Ensaio fermentativos

As seis linhagens de levedura analisadas se mostraram capazes de produzir etanol em todos os meios de fermentação testados, independente da fonte de carbono empregada, se xilose e/ou glicose. Em se tratando do consumo de açúcares redutores os melhores resultados foram observados para a espécie *C. orthopsilosis* (4G), em todos os meios de fermentação utilizados. Todavia, em se tratando do consumo de xilose, além desta linhagem, foi observado que *G. geotrichum* (R10) e a *Sporothrix sp.* (5G), apresentaram consumo de 97 a 100% em até 94 horas de fermentação, evidenciando uma expressiva assimilação da xilose. Todas as espécies

estudadas, quando inoculadas nos meios de fermentação 3 e 4 (Tabela 11), apresentaram os menores valores de consumo de xilose. Os referidos meios apresentavam em sua constituição proporção de xilose e glicose de 1:2 e 1:1, respectivamente. Além disso, o meio 4 apresentava em sua constituição a menor concentração de extrato de levedura quando comparada com a formulação dos demais meios fermentativos.

As linhagens analisadas, com exceção da *R. mucilaginosa* 2G, apresentaram o maior acúmulo de etanol quando cultivadas no meio 2, utilizando a proporção de 2:3 de glicose e xilose como fonte de carbono. Foi observado que a linhagem *C. orthopsilosis* 4G, quando cultivada no referido meio, apresentou maior habilidade de conversão dos açúcares com valor de 8,95 g L⁻¹ de etanol e Y_{P/S} de 0,19. A análise dos parâmetros cinéticos, Tabela 11, demonstrou que a linhagem 2G apresentou o seu melhor desempenho quando cultivada no meio 4, com produção de etanol de 3,33 g L⁻¹ e Y_{P/S} de 0,38, entretanto, apenas 40% da xilose havia sido consumida, enquanto que, a linhagem 4G consumiu 99% da xilose presente no meio 2.

As linhagens de *G. geotrichum* R10 e R150, também apresentaram rendimentos próximos (Y_{P/S} de 0,17), ao máximo obtido no meio 2. Contudo, a linhagem R150 consumiu apenas 55% das 20 g L⁻¹ de xilose presente no meio fermentativo. Cabe ressaltar que a linhagem R10, quando cultivada no meio que continha apenas xilose como fonte de carboidrato (meio 1), apresentou rendimento 76% inferior ao observado no meio 2. Tal fato evidencia a importância da glicose na obtenção do etanol a partir de D-xilose.

R. mucilaginosa 2G e 8G apresentaram os menores resultados de rendimento de etanol quando comparadas com as demais leveduras no mesmo meio de fermentação. Segundo Zhao (2009) a *R. mucilaginosa* tem sido empregada para acumular óleos a partir de glicose, xilose, arabinose, manose e glicerol, fato que possivelmente justifica o desvio do consumo do substrato para a produção de outros metabólitos.

Quanto a produtividade de etanol, o melhor resultado foi observado para a linhagem *C. orthopsilosis* 4G (0,09 g L⁻¹h⁻¹) quando cultivada no meio 2. A referida linhagem apresentou a produtividade de 0,06 g L⁻¹h⁻¹ quando cultivada nos meios 3 e 5. A linhagem *Sporothrix sp.* (5G) também apresentou a produtividade de 0,09 g L⁻¹ h⁻¹ quando cultivada no meio 2. Os demais ensaios apresentaram resultados de produtividade inferiores aos supracitados.

Tabela 11 - Parâmetros do monitoramento empregados nos processos fermentativos para as linhagens *Galactomyces geotrichum* (R10), *G. geotrichum* (R150), *Rhodotorula mucilaginosa* (2G), *Candida orthopsilosis* (4G), *Sporothrix sp.* (5G) e *R. mucilaginosa* (8G) cultivadas em diferentes meios de fermentação.

Linhagens	Meio	Açúcares (g L ⁻¹)		Consumo (%)		Tempo (h)	Etanol (g L ⁻¹)	Qp (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{P/S}
		Inicial	Consumo total	Glicose	Xilose				
R10	1	18,44±0,75	17,39±1,02	NA ¹	97,23	94	0,61±0,04 ^d	0,01±0,00 ^d	0,04±0,00 ^d
	2	43,99±2,53	37,68±0,25	99,88	96,86	121	6,54±0,03 ^a	0,05±0,00 ^a	0,17±0,00 ^b
	3	39,98±0,69	28,58±0,55	98,69	54,62	122	0,70±0,08 ^d	0,01±0,00 ^d	0,03±0,00 ^e
	4	18,17±0,21	3,75±0,18	91,64	0,00	121	1,00±0,04 ^c	0,01±0,00 ^c	0,27±0,00 ^a
	5	44,20±0,70	42,70±0,48	100,00	88,35	141	4,48±0,01 ^b	0,03±0,00 ^b	0,11±0,00 ^c
R150	1	17,98±1,40	17,50±1,05	NA ¹	97,33	94	0,71±0,05 ^c	0,01±0,00 ^b	0,04±0,00 ^d
	2	44,36±0,32	33,48±1,28	99,96	54,67	121	5,78±0,20 ^a	0,05±0,00 ^a	0,17±0,00 ^a
	3	40,58±0,07	29,65±2,39	92,75	57,99	122	0,90±0,09 ^c	0,01±0,00 ^b	0,03±0,00 ^e
	4	17,46±0,66	9,40±2,68	96,23	0,00	117	0,91±0,47 ^c	0,01±0,00 ^b	0,10±0,00 ^b
	5	45,88±2,54	35,43±3,41	99,60	30,21	145	2,07±0,28 ^b	0,01±0,00 ^b	0,06±0,00 ^c
2G	1	18,55±1,10	11,08±1,25	NA ¹	55,04	97	0,23±0,11 ^c	0,002±0,00 ^c	0,02±0,01 ^c
	2	46,00±0,56	31,45±1,69	96,25	18,72	97	3,48±0,20 ^b	0,04±0,00 ^b	0,07±0,02 ^{bc}
	3	42,58±2,01	14,93±0,75	96,09	29,46	89	0,33±0,09 ^c	0,00±0,00 ^c	0,02±0,01 ^c
	4	18,54±1,19	9,02±1,11	98,72	39,38	89	3,33±0,09 ^b	0,04±0,00 ^{ab}	0,38±0,05 ^a
	5	45,26±2,84	32,35±7,75	99,08	48,05	100	4,25±0,29 ^a	0,04±0,00 ^a	0,14±0,03 ^b

continuação

Linhagens	Meio	Açúcares (g L ⁻¹)		Consumo (%)		Tempo (h)	Etanol (g L ⁻¹)	Qp (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{P/S}
		Inicial	Consumo total	Glicose	Xilose				
4G	1	18,71±0,52	20,60±1,05	NA ¹	100,00	76	0,81±0,04 ^e	0,01±0,00 ^e	0,04±0,00 ^e
	2	46,00±0,66	46,36±1,98	98,53	98,87	97	8,95±0,36 ^a	0,09±0,00 ^a	0,19±0,00 ^b
	3	39,47±1,12	40,32±4,00	97,34	99,68	78	3,64±0,44 ^c	0,06±0,01 ^c	0,09±0,00 ^d
	4	17,30±0,71	10,09±0,87	97,96	66,30	89	2,03±0,18 ^d	0,02±0,00 ^d	0,20±0,00 ^a
	5	45,46±1,31	44,94±0,10	99,98	94,44	100	6,09±0,11 ^b	0,06±0,00 ^b	0,14±0,00 ^c
5G	1	18,90±1,03	20,59±0,83	NA ¹	100,00	89	0,70±0,03 ^c	0,01±0,00 ^c	0,03±0,00 ^d
	2	46,40±1,59	39,67±0,22	98,40	28,28	97	5,30±0,02 ^a	0,06±0,00 ^a	0,13±0,00 ^a
	3	40,03±1,68	22,83±0,67	98,70	27,91	100	0,25±0,01 ^e	0,003±0,00 ^d	0,01±0,00 ^e
	4	16,96±0,22	8,89±0,14	96,56	61,08	78	0,61±0,01 ^d	0,01±0,00 ^c	0,07±0,00 ^c
	5	48,85±0,88	32,48±0,32	96,48	25,53	100	3,52±0,04 ^b	0,04±0,00 ^b	0,11±0,00 ^b
8G	1	18,90±1,86	17,80±2,13	NA ¹	79,22	89	0,07±0,02 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^e
	2	47,70±2,34	36,53±0,41	99,12	23,63	97	3,67±0,10 ^a	0,04±0,00 ^a	0,10±0,00 ^b
	3	40,65±0,77	14,91±2,12	98,04	26,79	100	0,32±0,05 ^c	0,00±0,00 ^{cd}	0,02±0,00 ^d
	4	15,99±0,69	8,12±2,21	96,38	58,45	89	0,35±0,10 ^c	0,00±0,00 ^c	0,04±0,00 ^c
	5	45,48±2,50	19,48±0,46	90,19	18,99	100	3,22±0,06 ^b	0,03±0,00 ^b	0,17±0,00 ^a

Fonte: Próprio autor. ¹NA= não se aplica a relação, pois o meio continha apenas xilose como carboidrato. Letras diferentes na mesma coluna indicam haver diferença significativa entre os resultados para cada levedura segundo o teste de Tukey a 95% de confiança. Qp = produtividade volumétrica; Y_{P/S} = rendimento de produto em relação ao substrato. Meio 1: 20 g L⁻¹ de xilose, 1,25 g L⁻¹ de ureia, 1,1 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹ de extrato de levedura e 40 ml L⁻¹ de uma solução de sais. Meio 2: 20 g L⁻¹ de xilose, 30 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 0,47 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 12,8 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,51 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,47 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Meio 3: 30 g L⁻¹ de xilose, 15 g L⁻¹ de glicose, 3,0 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2,3 g L⁻¹ de ureia, 1,0 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Meio 4: 10 g L⁻¹ de xilose, 10 g L⁻¹ de glicose, 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,1 g L⁻¹ de MnSO₄. Meio 5: 20 g L⁻¹ de xilose, 30 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 1,0 g L⁻¹ de MgCl, 1,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄.

O melhor resultado de rendimento obtido neste estudo, Y_p/s 0,19 g g⁻¹, correspondeu a 44% do valor obtido por Belido *et al.* (2013), Tabela 12, utilizando o mesmo meio (meio 2), todavia, empregando como agente fermentativo a levedura *Pichia stipitis*, em condições otimizadas de aeração. Além deste autor, Oliveira e Silva *et al.*, que obtiveram rendimento fermentativo de Y_p/s 0,47 g g⁻¹ e Y_p/s 0,40 g g⁻¹, respectivamente, também utilizaram em seus processos a espécie *Pichia stipitis*, reportada na literatura como uma das melhores fermentadoras de pentose (AGBOGBO *et al.*, 2006; MATEO *et al.*, 2015; GUPTA, VERMA, 2015).

Tabela 12 - Valores de rendimento (Y_p/s) do processo fermentativo em etanol, obtidos em diferentes estudos e respectivos micro-organismos e autores.

Meio	Autor /Ano	$Y_{p/s}$	Micro-organismo	Condições
1	Oliveira (2010)	0,47	<i>Pichia stipitis</i>	Temperatura de 30°C, agitação de 250 rpm, aeração de 0,018 L min ⁻¹ e concentração celular inicial de 5 g L ⁻¹
2	Bellido <i>et al.</i> (2013)	0,43	<i>Pichia stipitis</i>	Temperatura de 30°C e agitação de 175 rpm, aeração de 0,03 L min ⁻¹ e concentração celular inicial de 0,5 g L ⁻¹
3	Silva <i>et al.</i> (2012)	0,40	<i>Pichia stipitis</i>	Temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, aeração de k_{al} 12 h ⁻¹ e concentração celular inicial de 1 g L ⁻¹
4	Wilkins <i>et al.</i> (2008)	0,15	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Temperatura de 40°C e agitação de 130 rpm e concentração celular inicial de 4,5 g L ⁻¹
5	FU <i>et al.</i> (2009)	0,49	<i>Zymomonas mobilis</i> e <i>Pichia stipitis</i>	Temperatura de 30°C, agitação de 150 rpm, aeração de 0,08 L min ⁻¹

Fonte: Próprio Autor

Fu *et al.* (2009) em seu estudo para produção de etanol utilizando o meio 5, obteve o melhor rendimento de etanol, Y_p/s 0,49 g g⁻¹, quando utilizou a co-cultura da levedura *Pichia stipitis* associada a espécie de bactéria *Zymomonas mobilis*, conhecida pelas suas características de elevada produtividade e tolerância ao etanol em relação a *S. cerevisiae*. Wilkins *et al.* (2008) obteve, em seus estudos, rendimento de etanol de Y_p/s 0,15 g g⁻¹ empregando a espécie *Kluyveromyces marxianus* no meio 4, resultado esse, inferior ao melhor valor de rendimento apresentado pela linhagem de *Candida orthopsilosis*. A espécie *Kluyveromyces marxianus* é reportada na literatura como uma levedura com potencial para a produção do etanol lignocelulósico (SIGNORI *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2017), sendo considerada uma alternativa para o uso da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (DASGUPTA *et al.*, 2017).

Nos estudos realizados por Valinhas (2016) com as linhagens de *G. geotrichum* R10

e R150, foram obtidos rendimentos de etanol de $Y_{P/S}$ 0,35 g g⁻¹ e $Y_{P/S}$ 0,29 g g⁻¹, respectivamente, quando cultivadas no meio 1 (contendo xilose como fonte de carboidrato). As fermentações relatadas pelo autor foram conduzidas a 28°C, sob agitação de 150 rpm e inóculo de 1 D.O_{600nm} na proporção de 20% inóculo/meio. Deste modo, é possível inferir que após uma otimização dos processos será possível obter melhores rendimentos de etanol, uma vez que as condições nas quais os experimentos foram conduzidos foram distintas das utilizadas por Valinhas (2016). As condições de temperatura, quantidade de inóculo e oxigenação influenciam diretamente nos resultados fermentativos. Os resultados de etanol obtidos nos meios avaliados sugerem que grande parte dos açúcares consumidos foram utilizadas para manutenção do crescimento, ou ainda, desviados para a formação de outros metabólitos.

Os autores Jeffries (2006); Hahn-Hagerdal *et al.* (1994), Preez (1994) mencionam que a via metabólica das pentoses-fosfato proporciona a conversão da xilose à etanol, por intermédio das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH). Relatam ainda, que tal especificidade, quanto aos cofatores, pode acarretar o desequilíbrio redox, diminuindo a produção de etanol. Além destes autores, Wohlbach *et al.* (2011) e Bellido *et al.* (2013) reportam sobre a influência das taxas de oxigenação no sistema fermentativo, pois, estas podem afetar de forma relevante a produção de etanol. Neste processo, quando o sistema é conduzido em anaerobiose o desequilíbrio redox proporciona o acúmulo de xilitol, ao passo que em aerobiose ocorre o aumento da massa celular, todavia, em condições de limitação de oxigênio ocorre a produção de etanol. Outra condição relevante para esse tipo de fermentação relatada por Hou e Yao (2012) e Signori *et al.*, (2012), trata da importância da adição da glicose ao meio fermentativo por equilibrar as reações de oxido-redução. Sendo assim, a cofermentação destes açúcares, glicose e xilose, é um processo desejável na produção de etanol lignocelulósico, uma vez que, contribui para maior aproveitamento desses substratos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos. Todavia, algumas linhagens selvagens de leveduras podem sofrer redução da taxa de fermentação da xilose devido à repressão catabólica ocasionada pela expressiva presença da glicose, o que propicia uma queda na produtividade de etanol (ZANG *et al.*, 2016). Tal repressão tem ação sobre as atividades enzimáticas envolvidas no metabolismo da xilose ou na inativação dos sistemas de transporte das pentoses (AGBOGBOG *et al.*, 2006). Neste sentido Ishola, Brandberg e Taherzadeh (2015) reportam que a utilização preferencial da glicose sobre a xilose não é um fenômeno incomum, uma vez que o consumo da xilose normalmente é observado após a depleção da glicose no meio. Este fato, também foi observado para as linhagens estudadas conforme apresentado nas Figuras 19 a 23. Cao *et al.* (2014), em seus estudos de otimização do consumo de xilose, ponderaram que o uso eficiente da xilose está

relacionado com o rápido consumo da glicose, bem como, a correção do desequilíbrio redox.

As linhagens avaliadas, quando cultivadas no meio 3, apresentaram os menores resultados de rendimento de etanol, mesmo contendo além da pentose, hexose como fonte de carboidrato. Tal fato evidenciou que a diferente proporção entre os açúcares afeta a produção de etanol e que quantidades inferiores de glicose não são capazes de corrigir o desequilíbrio redox. A linhagem *Candida orthopsilosis* (4G) consumiu todo o açúcar presente no meio de fermentação 3, fato este que não foi observado para as demais linhagens (FIG. 21).

Dentre as linhagens avaliadas, a *C. orthopsilosis* (4G) apresentou maior regularidade quanto ao consumo dos açúcares em todos os meios de cultivo, consumindo acima de 90 % dos carboidratos oferecidos, exceto para o meio 4. Quanto às taxas de conversão dos açúcares presentes no meio de fermentação a etanol, estudos reportam que, as hexoses podem ser fermentadas em poucas horas, contudo, a xilose pode ultrapassar às 120 horas (CAO *et al.*, 2014; ABGOGBOG *et al.*, 2006, PEREIRA *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2011; NIEKSEN *et al.*, 2013, ISHOLA, BRANDBERG e TAHERZADEH, 2015). Tal fato foi observado nas cinéticas fermentativas das leveduras quando cultivadas nos diferentes meios, Figuras 19 a 23. O consumo sequencial dos açúcares levou a um crescimento diáuxico, sendo mais evidente para a linhagem 4G quando cultivada no meio 2, Figura 20 B, onde o término do consumo de glicose e xilose ocorreu após 20 e 80 horas de fermentação, respectivamente.

Figura 19 -. Cinética fermentativa do consumo de açúcares redutores (AR), glicose e xilose, e crescimento celular das linhagens. A) *Rhodothorula mucilaginosa* (2G); B) *Candida orthopsilosis* (4G); C) *Sporothrix sp.* (5G); D) *R. mucilaginosa* (8G); E) *Galactomyces geotrichum* (R10) e F) *G. geotrichum* (R150) cultivadas no Meio 1 (20 g L⁻¹ de xilose, 1,25 g L⁻¹ de ureia, 1,1 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹ de extrato de levedura e 40 ml L⁻¹ de uma solução de sais).

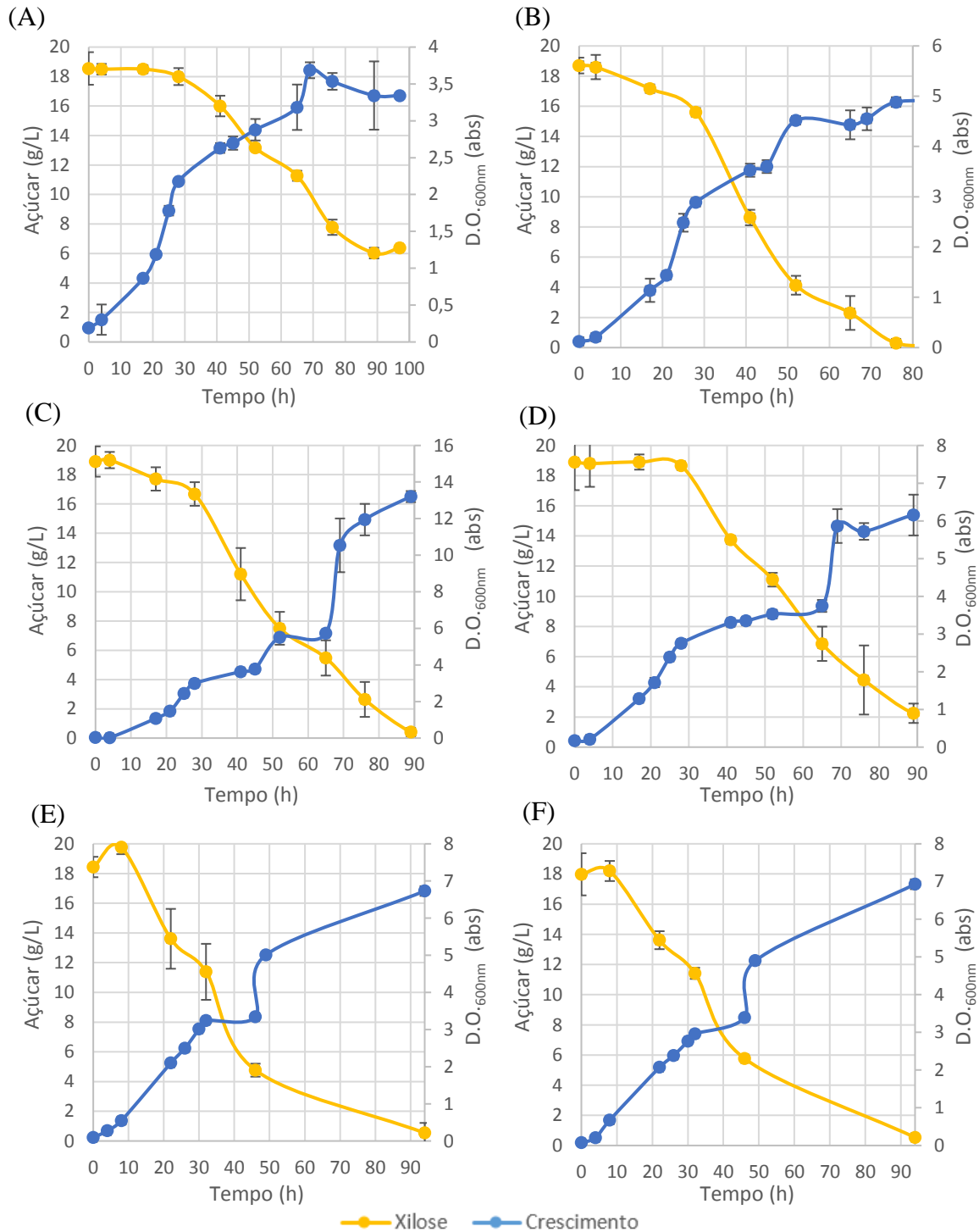
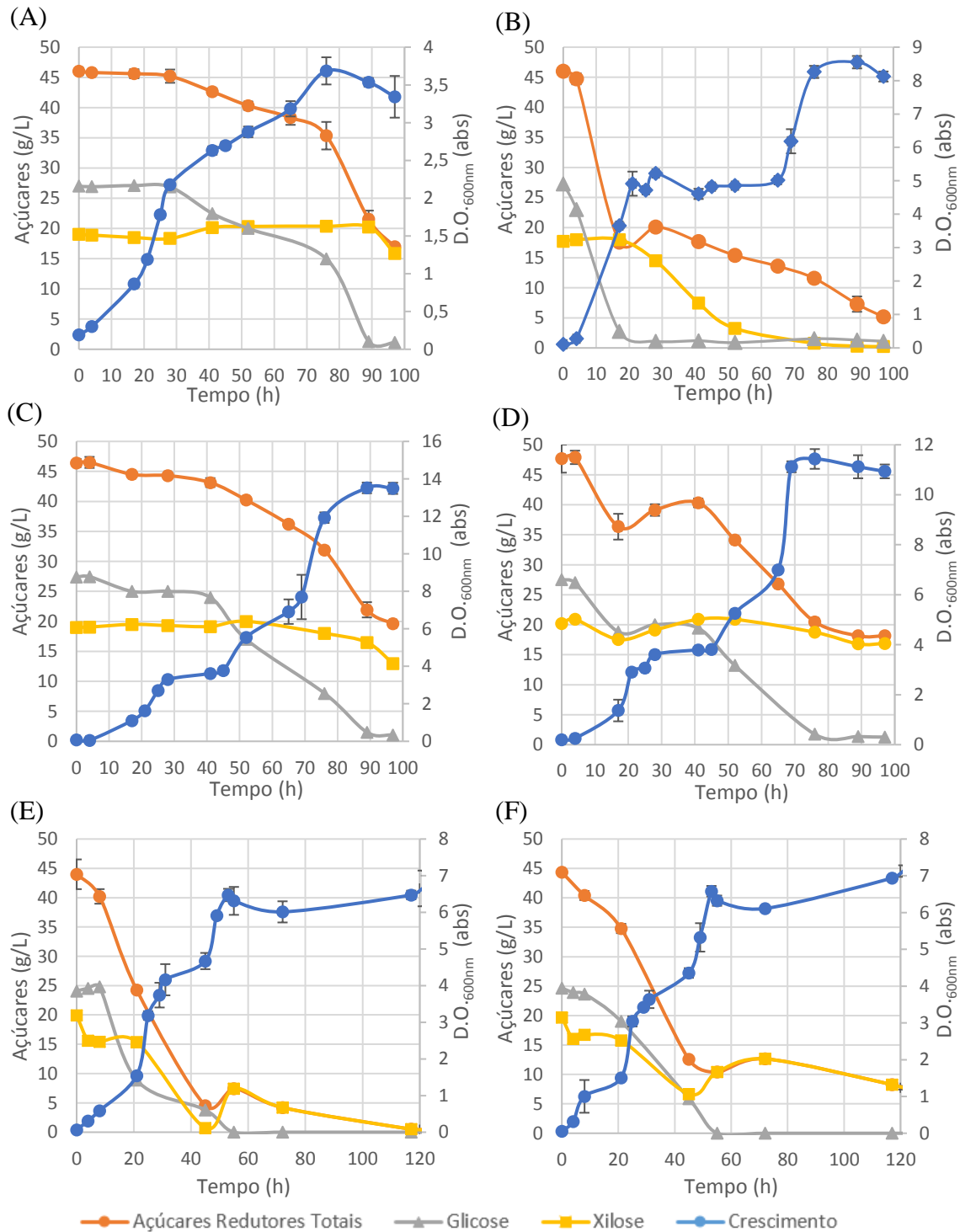
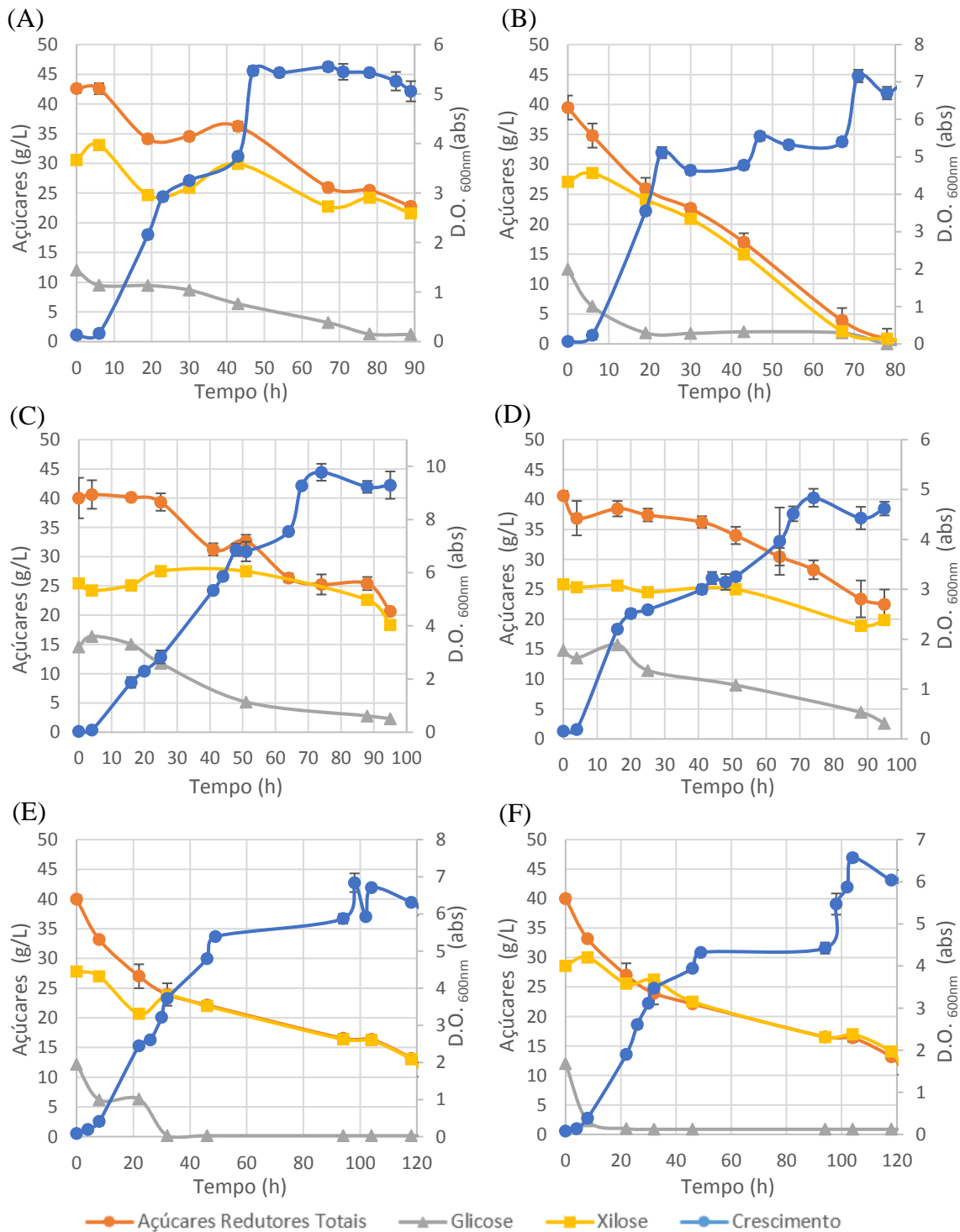


Figura 20 - Cinética fermentativa do consumo de açúcares redutores (AR), glicose e xilose e crescimento celular das linhagens. A) *Rhodothorula mucilaginosa* (2G); B) *Candida orthopsilosis* (4G); C) *Sporothrix sp.* (5G); D) *R. mucilaginosa* (8G); E) *Galactomyces geotrichum* (R10) e F) *G. geotrichum* (R150) cultivadas no Meio 2 (20 g L⁻¹ de xilose, 30 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 0,47 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 12,8 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,51 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,47 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O).



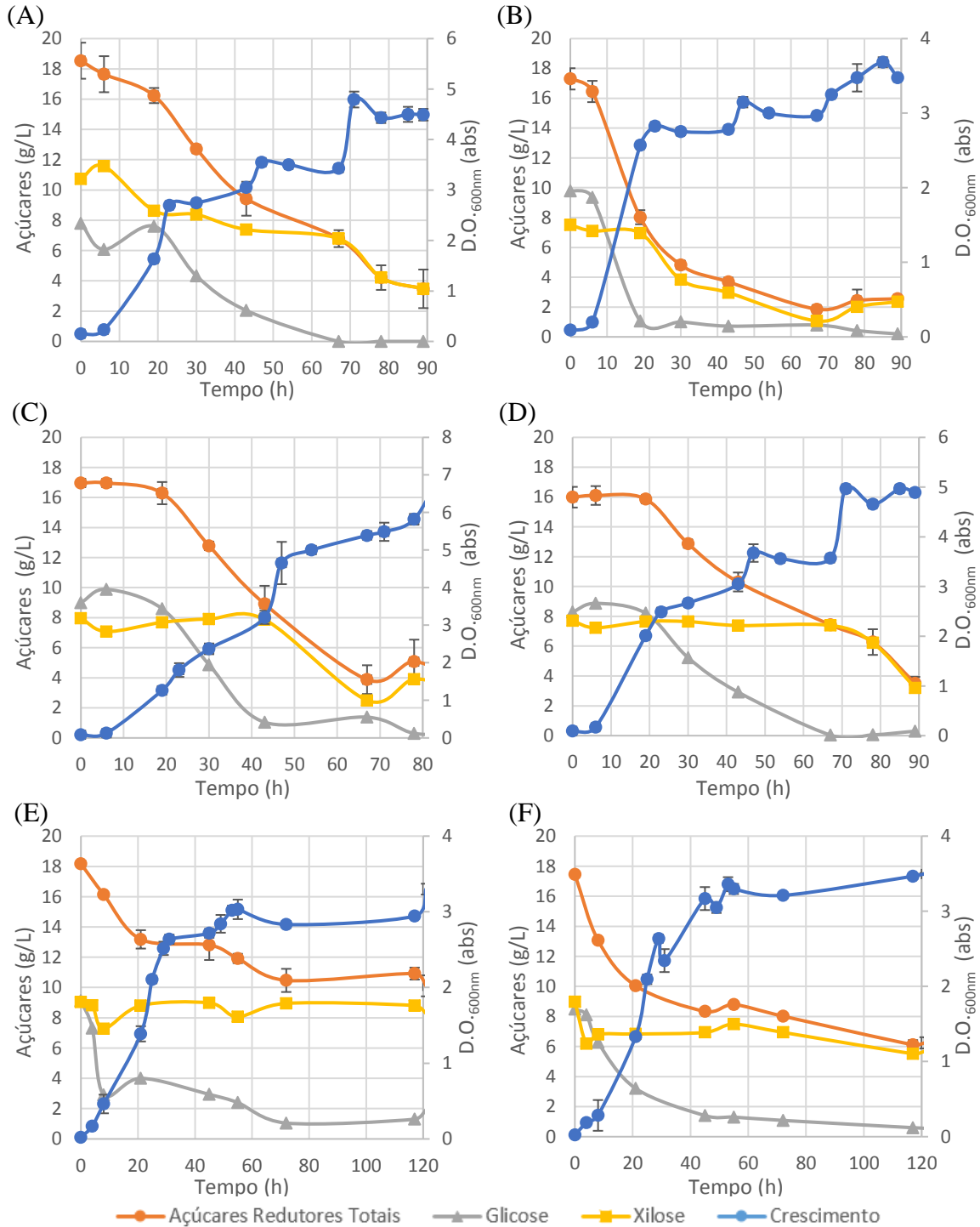
Fonte: Próprio Autor

Figura 21 - Cinética fermentativa do consumo de açúcares redutores (AR), glicose e xilose, e crescimento celular das linhagens. A) *Rhodothorula mucilaginosa* (2G); B) *Candida orthopsilosis* (4G); C) *Sporothrix sp.* (5G); D) *R. mucilaginosa* (8G); E) *Galactomyces geotrichum* (R10) e F) *G. geotrichum* (R150) cultivadas no Meio 3 (30 g L⁻¹ de xilose, 15 g L⁻¹ de glicose, 3,0 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2,3 g L⁻¹ de ureia, 1,0 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O).



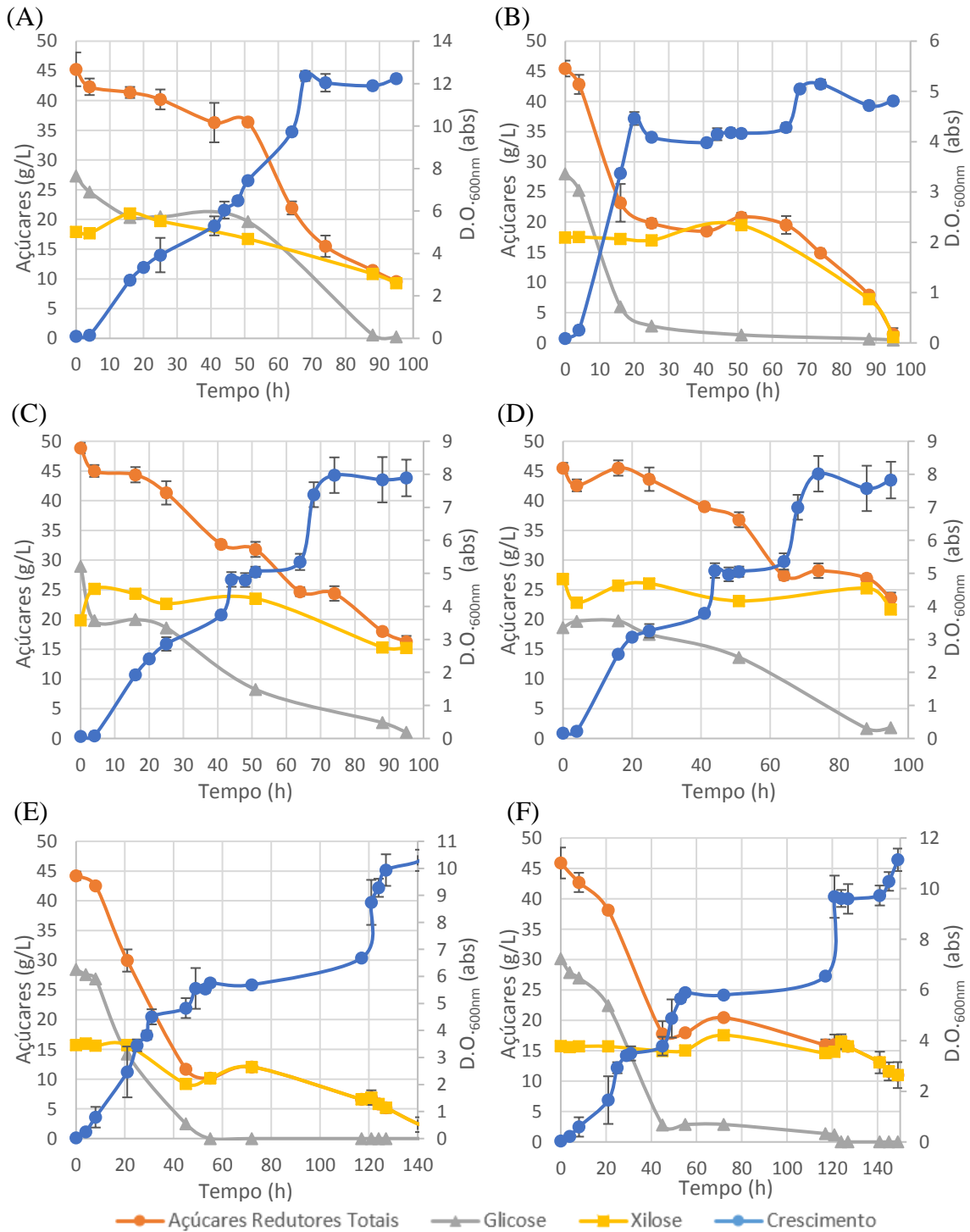
Fonte: Próprio Autor

Figura 22 - Cinética fermentativa do consumo de açúcares redutores (AR), glicose e xilose, e crescimento celular das linhagens. A) *Rhodothorula mucilaginosa* (2G); B) *Candida orthopsilosis* (4G); C) *Sporothrix sp.* (5G); D) *R. mucilaginosa* (8G); E) *Galactomyces geotrichum* (R10) e F) *G. geotrichum* (R150) cultivadas no Meio 4 (10 g L⁻¹ de xilose, 10 g L⁻¹ de glicose, 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,1 g L⁻¹ de MnSO₄).



Fonte: Próprio Autor

Figura 23 - Cinética fermentativa do consumo de açúcares redutores (AR), glicose e xilose e crescimento celular das linhagens. A) *Rhodothorula mucilaginosa* (2G); B) *Candida orthopsilosis* (4G); C) *Sporothrix sp.* (5G); D) *R. mucilaginosa* (8G); E) *Galactomyces geotrichum* (R10) e F) *G. geotrichum* (R150) cultivadas no Meio 5: 20 g L⁻¹ de xilose, 30 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 1,0 g L⁻¹ de MgCl, 1,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄.



Fonte: Próprio Autor

A partir dos resultados das relações entre as taxas máximas de consumo de glicose e xilose, Tabela 13, foi possível observar que as taxas de glicose foram superiores as de xilose, esses resultados estão de acordo com comportamentos fermentativos descritos na literatura para a produção de etanol (TANIMURA *et al.*, 2012; GROOTJEN VANDERLANS e LUYBEN, 1990). A linhagem *Sporothrix sp.* (5G), quando cultivada no meio 2, apresentou a maior relação entre as taxas de consumo ($q_{\text{máx,xilose}}/q_{\text{máx,glicose}}$) com valor de 84,08%. Tal fato evidencia que a linhagem (5G) possui habilidades similares de consumo de glicose e xilose. Ao analisar a linhagem que apresentou o valor mais expressivo de produção de etanol, linhagem *C. orthopsilosis* (4G), foi observado que a razão entre as taxas de consumo, $q_{\text{máx,xilose}}/q_{\text{máx,glicose}}$, foi apenas de 11%, constatando a dificuldade em metabolizar a xilose.

Tabela 13 - Relação entre as taxas máximas de consumo de xilose e glicose em porcentagem ($q_{\text{máx,xilose}}/q_{\text{máx,glicose}}$) para as linhagens *Rhodothorula mucilaginosa* (2G); *Candida orthopsilosis* (4G); *Sporothrix sp.* (5G); *R. mucilaginosa* (8G); *Galactomyces geotrichum* (R10) e *G. geotrichum* (R150) cultivadas em diferentes meios de fermentação.

Meios de fermentação	Linhagens					
	R10	R150	2G	4G	5G	8G
	(%)					
Meio 1	NA ¹	NA ¹	NA ¹	NA ¹	NA ¹	NA ¹
Meio 2	78,53	8,20	32,16	11,00	84,08	56,85
Meio 3	34,30	12,33	36,81	80,03	76,00	8,16
Meio 4	NA ²	NA ²	75,97	44,75	31,35	92,25
Meio 5	79,90	44,19	41,18	55,90	9,61	56,11

Fonte: Próprio Autor ¹NA= não se aplica a relação, pois o meio continha apenas xilose como carboidrato. ²NA= não se aplica, pois não houve consumo de xilose durante a fermentação. **Meio 1** (20 g L⁻¹ de xilose, 1,25 g L⁻¹ de ureia, 1,1 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹ de extrato de levedura e 40 ml L⁻¹ de uma solução de sais); **Meio 2** (20 g L⁻¹ de xilose, 30 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 0,47 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 12,8 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,51 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,47 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O); **Meio 3** (30 g L⁻¹ de xilose, 15 g L⁻¹ de glicose, 3,0 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2,3 g L⁻¹ de ureia, 1,0 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O); **Meio 4** (10 g L⁻¹ de xilose, 10 g L⁻¹ de glicose, 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,1 g L⁻¹ de MnSO₄); **Meio 5** (20 g L⁻¹ de xilose, 30 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 1,0 g L⁻¹ de MgCl, 1,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄).

Ao observar os dados obtidos para os fatores de rendimento nos diferentes meios testados foi possível notar que os melhores resultados foram alcançados naqueles meios em que havia maior concentração de extrato de levedura (meio 2 e meio 5), além de xilose e glicose. O extrato de levedura é uma fonte nutricional constituída de uma mistura de aminoácidos, vitaminas e magnésio (SILVA *et al.*, 2012), tais nutrientes são primordiais em todas as fermentações, pois são utilizados nos processos de replicação e manutenção celular, bem como, no metabolismo e produção de enzimas (LEI *et al.*, 2016, SMITH, HOLTZAPPLE, 2011).

Wang *et al.* (2012) relataram que a disponibilidade de aminoácidos livres, como os presentes no extrato de levedura, resulta no menor desgaste das leveduras para a síntese destes compostos, sendo assim, contribui de forma mais eficaz na promoção do crescimento ou ainda, propiciando maiores taxas de fermentação. Este autor menciona ainda, que, os compostos nitrogenados aumentam a velocidade de consumo do substrato e da produção de etanol, sem alterar os fatores de rendimento. Deste modo, os dados obtidos podem estar atrelados a este relato.

Carilho *et al.* (2012) expuseram que o uso adequado da utilização da fonte de nitrogênio é um fator importante na produção de etanol, pois, pode reprimir a formação de produtos secundários e ainda, aumentar o rendimento de etanol uma vez que o fluxo do metabolismo se diferencia de acordo com a fonte nutricional empregada. Wang *et al.* (2012) corroboram com tal informação e reportaram que a ureia é uma das fontes de nitrogênio mais eficientes, tanto para o crescimento celular, quanto para a produção de etanol. Entretanto, Schure Van Riel e Verrips (2000) constataram que as taxas de crescimento são relativamente maiores na presença de ureia no meio de fermentação. Apesar dos resultados do presente estudo apontarem maiores rendimento de biomassa para os meios formulados com íons amônio (meios 2, 4 e 5), não é possível ressaltar qual desses compostos nitrogenados, amônia ou ureia, proporcionou o melhor resultado, pois outras fontes de nutrientes mais complexas, tais como, extrato de levedura e peptona, podem, também, ter interferido nos resultados obtidos. É possível inferir que os baixos rendimentos observados para as linhagens 4G, R10 e R150 na presença de ureia podem estar relacionados com a incapacidade destas leveduras em expressarem a enzima urease.

Segundo Ko *et al.* (2016), pesquisas com a suplementação de íons metálicos estimula o crescimento celular, entretanto a concentração de cada elemento deve ser avaliada afim de não oferecerem toxicidade às células. Íons metálicos, tais como Mn^{2+} , Mg^{2+} ou Co^{2+} , atuam nos processos fermentativos por meio das atividades catalíticas das enzimas, como, por exemplo, sob as enzimas xilose-isomerases que necessitam de tais íons para apresentar a máxima conversão de xilose a xilulose. Estudos evidenciam ainda, que o íon magnésio atua na proteção das células das leveduras durante o processo fermentativo, com a redução da permeabilidade da membrana plasmática sob condições de estresse (SILVA *et al.*, 2012; ISMAIL *et al.*, 2014; BIRCH *et al.*, 2000). Outra questão relevante, trata-se da importância da biossíntese e transporte dos aminoácidos que apresentam papel importante na tolerância ao etanol e na viabilidade celular (ZAO, BAI, 2009). Aminoácido como o triptofano contribui na tolerância ao etanol, bem como, na resposta ao estresse osmótico, enquanto que a prolina, atua na proteção do estresse oxidativo e do congelamento e, tolerância ao etanol (CARRILLO *et al.*,

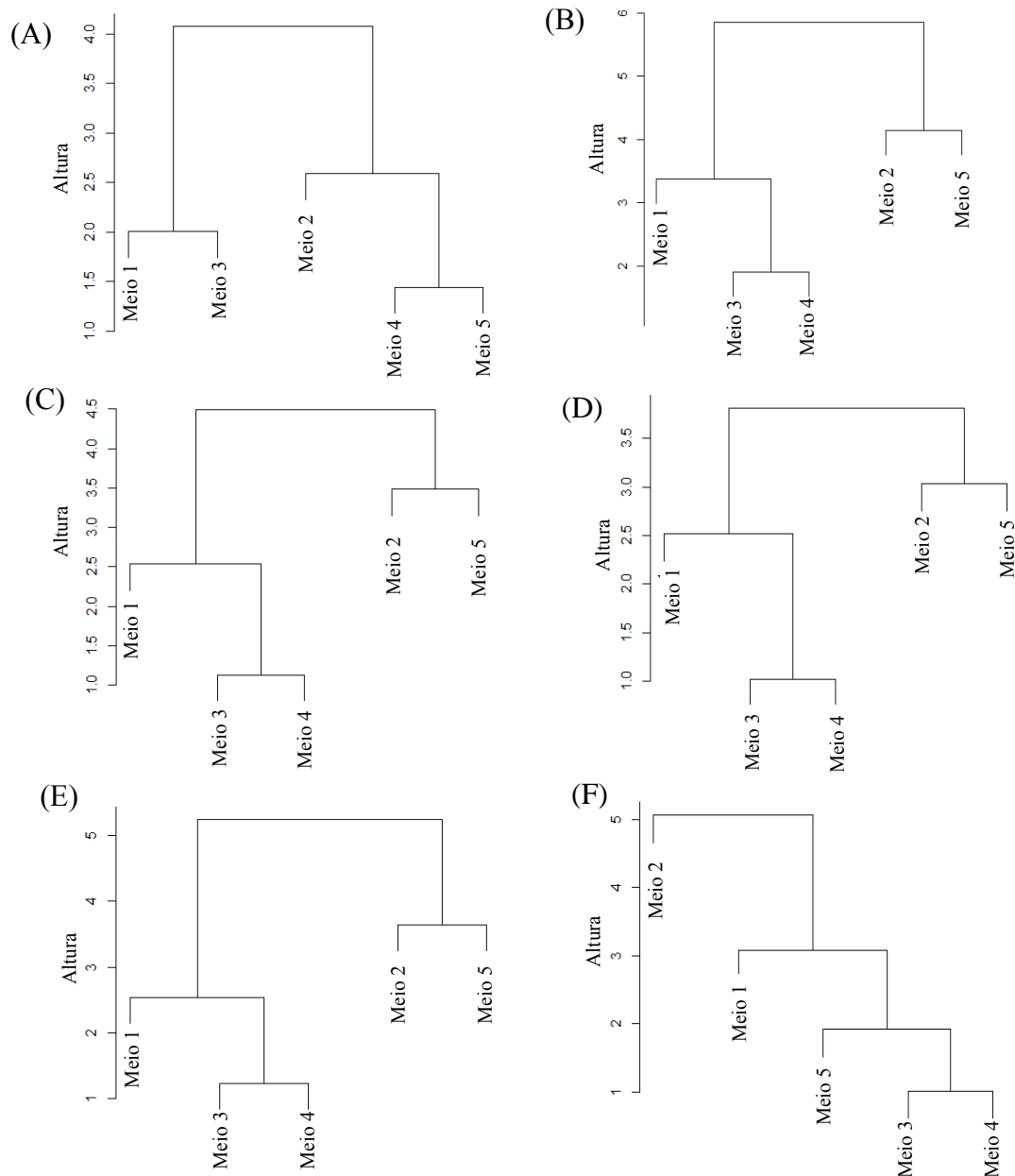
2012). Quanto a presença da ureia, Yue *et al.* (2012), sugerem sua atuação como filtro molecular que oferece às enzimas proteção contra o desdobramento que ocorre durante a produção do etanol.

A realização da análise de *clusters* de cada levedura, Figura 24, indicou que para todas as linhagens avaliadas, com exceção da R150 e 2G, os resultados obtidos nos meios 2 e 5 apresentaram maior similaridade. Os referidos meios possuíam concentrações iguais de xilose, glicose e extrato de levedura, o que indica que estes fatores causaram um maior impacto sobre os processos fermentativos quando comparado aos demais constituintes dos meios.

Ao realizar a análise discriminante das componentes principais, Figura 25, os resultados foram reunidos em três grupos principais, com 72,53% de variabilidade representada pelas duas componentes principais.

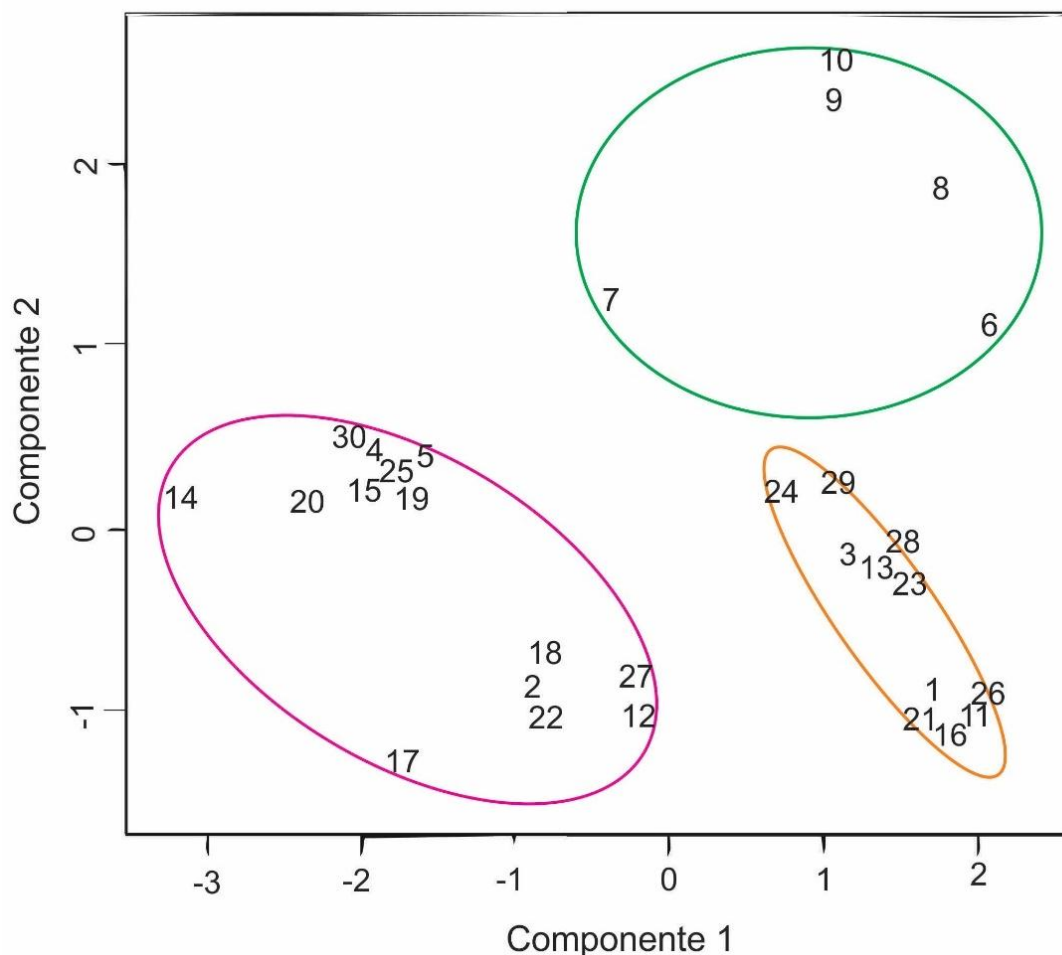
A análise global dos ensaios fermentativos, Figura 26, deu origem a 3 *clusters* representativos do sistema, no qual organizou-se em um único grupo grande parte dos testes realizados nos meios 2 e 5, ratificando os resultados estatísticos supracitados. No primeiro grupo, ainda estão presentes os resultados da linhagem 4G quando cultivada nos meios 3 e 4, uma vez que os resultados de etanol nestes meios foram mais elevados do que os obtidos por outras leveduras no meio 2. O segundo grupo que apresentou características distintas das demais foi composto pelos resultados fermentativos da linhagem R150 nos cinco meios avaliados, enfatizando que, mesmo com a diversidade nutricional oferecida nos diferentes ensaios, a levedura apresentou comportamento semelhante em todos os processos fermentativos.

Figura 24 - Dendrograma de similaridade entre os ensaios fermentativos analisados para as linhagens A) *Rhodotorula mucilaginosa* 2G; B) *Candida orthopsilosis* 4G; C) *Sporothrix sp.* 5G; D) *R. mucilaginosa* 8G; E) *Galactomyces geotrichum* R10 e F) *G. geotrichum* R150.



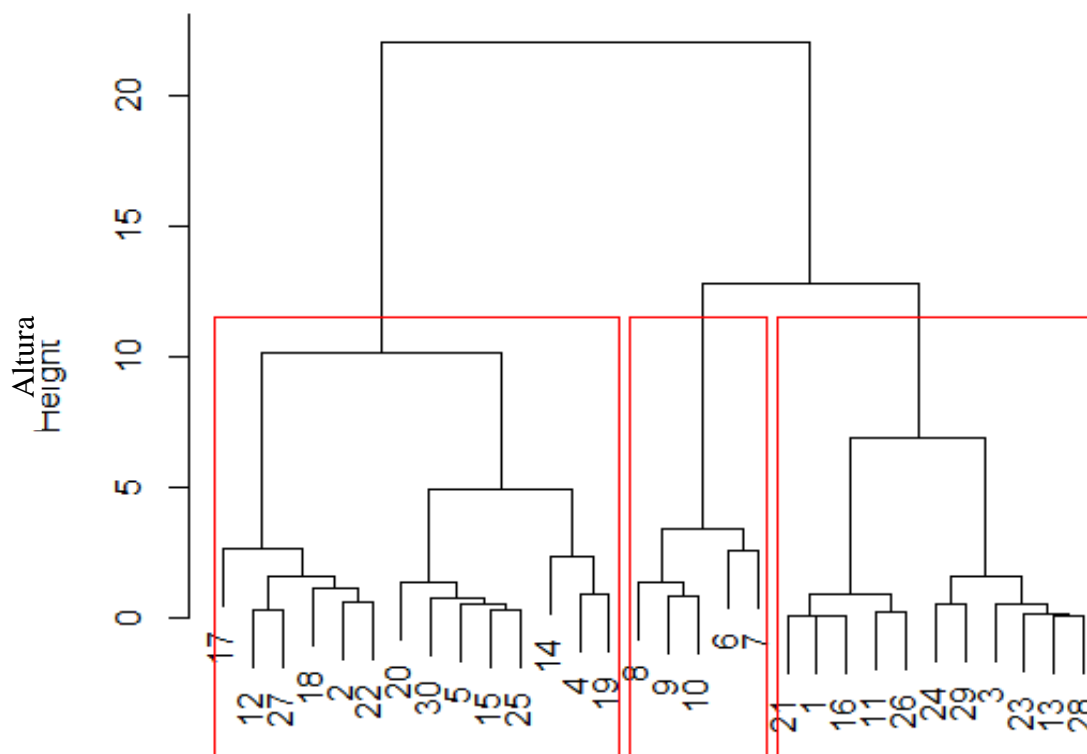
Fonte: Próprio Autor. Meio 1: 20 g L⁻¹ de xilose, 1,25 g L⁻¹ de ureia, 1,1 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹ de extrato de levedura e 40 ml L⁻¹ de uma solução de sais. Meio 2: 20 g L⁻¹ de xilose, 30 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 0,47 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 12,8 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,51 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,47 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Meio 3: 30 g L⁻¹ de xilose, 15 g L⁻¹ de glicose, 3,0 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2,3 g L⁻¹ de ureia, 1,0 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Meio 4: 10 g L⁻¹ de xilose, 10 g L⁻¹ de glicose, 0,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,1 g L⁻¹ de MnSO₄. Meio 5: 20 g L⁻¹ de xilose, 30 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 1,0 g L⁻¹ de MgCl, 1,0 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄.

Figura 25 - Análise de componentes principais (PCA) para os ensaios fermentativos realizados para as linhagens *Rhodothorula mucilaginosa* (2G), *Candida orthopsilosis* (4G), *Sporothrix sp.* (5G), *R. mucilaginosa* (8G), *Galactomyces geotrichum* (R10) e *G. geotrichum* (R150).



Fonte: Próprio Autor. **1:** Levedura R10 cultivada no meio 1; **2:** Levedura R10 cultivada no meio 2; **3:** Levedura R10 cultivada no meio 3; **4:** Levedura R10 cultivada no meio 4; **5:** Levedura R10 cultivada no meio 5; **6:** Levedura R150 cultivada no meio 1; **7:** Levedura R150 cultivada no meio 2; **8:** Levedura R150 cultivada no meio 3; **9:** Levedura R150 cultivada no meio 4; **10:** Levedura R150 cultivada no meio 5; **11:** Levedura 2G cultivada no meio 1; **12:** Levedura 2G cultivada no meio 2; **13:** Levedura 2G cultivada no meio 3; **14:** Levedura 2G cultivada no meio 4; **15:** Levedura 2G cultivada no meio 5; **16:** Levedura 4G cultivada no meio 1; **17:** Levedura 4G cultivada no meio 2; **18:** Levedura 4G cultivada no meio 3; **19:** Levedura 4G cultivada no meio 4; **20:** Levedura 4G cultivada no meio 5; **21:** Levedura 5G cultivada no meio 1; **22:** Levedura 5G cultivada no meio 2; **23:** Levedura 5G cultivada no meio 3; **24:** Levedura 5G cultivada no meio 4; **25:** Levedura 5G cultivada no meio 5; **26:** Levedura 8G cultivada no meio 1; **27:** Levedura 8G cultivada no meio 2; **28:** Levedura 8G cultivada no meio 3; **29:** Levedura 8G cultivada no meio 4; **30:** Levedura 8G cultivada no meio 5.

Figura 26 - Dendrograma de similaridade dos ensaios fermentativos analisados para as linhagens *Rhodothorula mucilaginosa* (2G), *Candida orthopsilosis* (4G), *Sporothrix sp.* (5G), *R. mucilaginosa* (8G), *Galactomyces geotrichum* (R10) e *G. geotrichum* (R150).



1: Levedura R10 cultivada no meio 1; **2:** Levedura R10 cultivada no meio 2; **3:** Levedura R10 cultivada no meio 3; **4:** Levedura R10 cultivada no meio 4; **5:** Levedura R10 cultivada no meio 5; **6:** Levedura R150 cultivada no meio 1; **7:** Levedura R150 cultivada no meio 2; **8:** Levedura R150 cultivada no meio 3; **9:** Levedura R150 cultivada no meio 4; **10:** Levedura R150 cultivada no meio 5; **11:** Levedura 2G cultivada no meio 1; **12:** Levedura 2G cultivada no meio 2; **13:** Levedura 2G cultivada no meio 3; **14:** Levedura 2G cultivada no meio 4; **15:** Levedura 2G cultivada no meio 5; **16:** Levedura 4G cultivada no meio 1; **17:** Levedura 4G cultivada no meio 2; **18:** Levedura 4G cultivada no meio 3; **19:** Levedura 4G cultivada no meio 4; **20:** Levedura 4G cultivada no meio 5; **21:** Levedura 5G cultivada no meio 1; **22:** Levedura 5G cultivada no meio 2; **23:** Levedura 5G cultivada no meio 3; **24:** Levedura 5G cultivada no meio 4; **25:** Levedura 5G cultivada no meio 5; **26:** Levedura 8G cultivada no meio 1; **27:** Levedura 8G cultivada no meio 2; **28:** Levedura 8G cultivada no meio 3; **29:** Levedura 8G cultivada no meio 4; **30:** Levedura 8G cultivada no meio 5.

A bioconversão da xilose à etanol sofre grande influência dos fatores nutricionais que podem variar de acordo com cada gênero, espécie e até mesmo entre linhagens (SILVA *et al.*, 2012). Neste estudo, todas as linhagens apresentaram capacidade de consumo da xilose, entretanto, os dados obtidos, nos levam a uma suposta inibição causada pela glicose levando a uma fermentação díáuxica, o que consequentemente interferiu no desempenho da produtividade do bioprocessamento. De acordo com Signori *et al.*, (2014); Ha *et al.*, (2010); Fu *et al.*, (2009), a cofermentação, se constitui em uma estratégia promissora para a produção de biocombustíveis lignocelulósicos, devido ao maior aproveitamento dos açúcares provenientes do processo de

hidrolise e ainda, pela necessidade em manter o equilíbrio redox. Neste sentido se faz necessário a busca por linhagens competentes na conversão de pentoses, bem como, sobre as melhores condições que viabilizem de forma mais eficiente a produção de etanol.

6 CONCLUSÃO

As seis linhagens de leveduras foram caracterizadas e identificadas em nível de espécie, sendo: duas *Rhodotorula mucilaginosa* (2G e 4G), duas *Galactomyces geotricum* (R10 e R150), uma *Candida orthopsilosis* (4G) e uma *Sporothrix sp.*, (5G). Todas as linhagens avaliadas foram capazes de produzir etanol a partir de D-xilose.

A maior produção de etanol foi de 8,9 g L⁻¹ com eficiência fermentativa de até 37%. Os valores máximos de rendimento $Y_{P/S}$ e Q_p foram de 0,20 g g⁻¹ e 0,09 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Os valores de rendimento e produtividade em etanol foram inferiores aos consultados na literatura, entretanto, tais espécies, até a data de confecção deste trabalho, não foram relacionadas na literatura quanto ao potencial de produção de etanol a partir da D-xilose. Além disso, as condições dos processos fermentativos não foram otimizadas, deixando perspectivas para os estudos futuros na vertente de otimização de processo visando a obtenção de resultados mais expressivos.

Os resultados evidenciaram a importância da suplementação dos meios com fontes de nitrogênio, como o extrato de levedura, no processo de metabolização dos açúcares e produção de etanol.

7 REFERÊNCIAS

- AGBOGBOG, F. K.; KELLY, G. C.; SMITH, M. T; WENGER, K. S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipites*. **Process Biochemistry**. n. 41, p. 2333-2336, 2006.
- AGBOR, V. B. *et al.* Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.
- ALFENORE, S.; JOUVE, C. M. Current status and future prospects of conversion of lignocellulosic resources to biofuels using yeasts and bacteria. **Process Biochemistry**. n. 51, p. 1747-1756, 2016.
- ALVES, J. M. B.; MACRI, R. DE C. V. Etanol de segunda geração: estudo de materiais lignocelulósicos e aplicações da lignina. **Ciência e Tecnologia**. v.5, n. 1. 2013.
- ASSUNÇÃO, E. F. **Leveduras como agentes protetores e indutores de resistência no manejo da mancha-de-alternatia em couve-manteiga**. 2015. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE, 2015.
- AZHAR, S. H. M; ABDULLA, R; JAMBO, S. A; MARBAWI, H; GANSAU, J. A; FAIK, A. A. M; RODRIGUES, K, F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**. n. 10, p. 52-61, 2017.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**. n. 52, p. 858-875, 2011.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast: characteristic and identification**. Cambridge: Cambridge University, ed.3, p. 1139, 2000.
- BARROS, E. M. DE; CARVALHO, V. M.; RODRIGUES, T.H.S.; ROCHA, M.V.P.; GONÇALVES, L.R.B. Comparison of strategies for the simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to enhance cellulosic ethanol production. **Chemical Engin. Journal**. n. 307, p.939-947, 2-17.
- BEER, Z.W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic Relationship. **Studies In Mycology**. n. 83, p. 165-191, 2016.
- BELLIDO, C.; BENITO, G. G.; COCA, M.; LUCAS, S.; CUBERO, M. T. G. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipites*. **Bioresource Technology**. n. 133, p. 51-58, 2013.
- KARL, D. **Yeast Cell**. Disponível em: < <https://www.pinterest.pt/pin/560768591072138765/>>. Acesso em: 23 de março de 2017.
- BIRCH, R. M., WALKER, G. M., Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb. Technol.** n. 26, p. 678-687, 2000.
- CANILHA, L. *et al.* Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré- hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, p. 48-53, 2010.
- CAO, L.; TANG, X.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; TIAN, X.; WANG, J.; XIONG, M.; XIAO, W. Two-stage transcriptional reprogramming in *Saccharomyces cerevisiae* for optimizing ethanol production from xylose. **Metabolic Engineering**. n. 24, p. 150-159, 2014.

CARRILLO, E. P.; SALDIVAR, S. O. S.; HERNANDEZ, C. C.; CALLEJAS, M. L. C. Addition of protease during starch liquefaction affects free amino nitrogen, fusel alcohols and ethanol production of fermented maize and whole and decorticated sorghum mashes. **Biochemical Engineering Journal**. n. 67, p. 1–9, 2012.

CHI, Z.; LIU, G. L.; LU, Y.; JIANG, H.; CHI, Z. M. Bio-products produced by marine yeasts and their potential applications. **Bioresource Technology**. n. 202, p. 244–252, 2016.

COLLARD, F. X.; BLIN, J. A review on pyrolysis of biomass constituents: Mechanisms and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicelluloses and lignin. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. n. 38, p. 594–608, 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de Cana-de-açúcar**: Safra 2015/16. Brasília, v.2, n. 4, p. 1-76, 2016.

DASGUPTA, D.; GHOSH, D.; BANDHU, S.; ADHIKARI D. K. Lignocellulosic sugar management for xylitol and ethanol fermentation with multiple cell recycling by *Kluyveromyces marxianus* IPE453. **Microbiological Research**. 2017 (In press).

DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Manual de biologia dos solos tropicais: Amostragem e caracterização da biodiversidade. In: FATIMA, M.S.; MOREIRA, E.; HUISING, J.; BIGNELL, D. E. **Isolamento e identificação de leveduras**. Uberlândia, p. 227-277, 2010.

EMBRAPA. **Cana-de-açúcar**. Disponível em: < http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html>. Acesso em 20 janeiro 2017.

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION-EIA. Disponível: < <https://www.eia.gov/>>. Acesso em: 20 de março de 2017.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA-EPE, **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis**: Ano 2015. Ministério de Minas e Energia, Brasil, 2016.

FERREIRA, A. D.; MUSSATTO, S. I.; CADETE, R. M.; ROSA, C. A.; SILVA, S. S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**. n. 28, p. 547–554, 2011.

FU, N.; PEIRIS, P.; MARKHAM, J.; BAVOR, J. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. **Enzyme and Microb. Technol.** n. 45, p. 210–217, 2009.

FUENTEFRIA, A. M. **Bioprospeção de leveduras killer com potencial para aplicação em biotipagem de microrganismos patogênicos humanos**. 2007. 144p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

GAO, J.; YUAN, W.; LI, Y.; BAI, F.; ZHONG, S.; JIANG, Y. Application of redox potential control to improve ethanol productivity from inulin by consolidated bioprocessing. **Process Biochemistry**. n. 51, p. 1544–1551, 2016.

GOSHIMA, T.; NEGI, K.; TSUJI, M.; INOUE, H.; YANO, S.; HOSHINO, T.; MATSUSHIKA, A. Ethanol fermentation from xylose by metabolically engineered strains of *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. n. 116, p. 551-554, 2013.

GRANBIO. **Bioflex I**. Disponível em: < <http://www.granbio.com.br/>>. Acesso em 12 de janeiro de 2017.

GUIMARÃES, M. **Diversidade e afiliação filogenética de leveduras associadas a plantas de sorgo sacarino [*Sorghum bicolor*(L.) MOENCH] cultivadas no cerrado.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de São João Del Rei. Sete Lagoas – MG, 2016.

GUPTA, A., VERMA, J. A. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** n. 41, p. 550–567, 2015.

GUTIÉRREZ-RIVERA, B.; ORTIZ-MUÑIZ, B.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J.; CÁRDENAS-CÁGAL, A.; GONZÁLEZ, J. M. D.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Bioethanol production from hydrolyzed sugarcane bagasse supplemented with molasses “B” in a mixed yeast culture. **Renewable Energy.** n. 74, p. 399-405, 2015.

GROOTJEN, D. R. J.; VANDERLANS, R.; LUYBEN, K. Effects of the aeration rate on the fermentation of glucose and xylose by *Pichia-stipitis* CBS-5773. **Enzyme Microb Technol.** n. 12, p. 20–23, 1990.

HA, S.; GALAZKA, J. M.; KIM, S. R.; CHOI, J.; YANG, X.; SEO, J.; GLASS, N. L.; CATE, J. H. D.; JIN, Y. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. **PNAS.** n. 108, p. 504-509, 2010.

HAGLER, A.N.; AHEARN, D.G. Rapid Diazonum Blue B test to detect Basidiomycetous yeasts. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 31, n. 2, p. 204-208, 1981.

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb. Technol.** n. 16, p. 933-943, 1994.

HASUNUMA, T.; SUNG, K.; SANDA, T.; YOSHIMURA, K.; MATSUDA, F.; KONDO, A. Efficient fermentation of xylose to ethanol at high formic acid concentrations by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol.** n. 90, p. 997–1004, 2011.

HOU, X.; YAO, S. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. **Appl Microbiol Biotechnol.** n. 93, p. 2591-2601, 2012.

HOOG, G. S.; SMITH, M. T. *Galactomyces Redheah & Malloch* (1977). In: KURTZMAN, C.P; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Eds). **The Yeasts: a taxonomic study.** Fifth Revised and Enlarged Edition. Amsterdam: Elsevier, 2011. Cap. 31.

HUANG, X.; CHENG, D.; CHEN, F.; ZHAN, X. Reaction pathways of hemicellulose and mechanism of biomass pyrolysis in hydrogen plasma: A density functional theory study. **Renewable Energy.** n. 96, p. 490-497, 2016.

HUBENOVA Y.; HUBENOVA, E.; SLAVCHEVA, E.; MITOV, M. The glyoxylate pathway contributes to enhanced extracellular electron transfer in yeastbased biofuel cell. **Bioelectrochemistry.** 2017. (In Press).

IRAZUSTA, V.; NIETO-PEÑALVER, C. G.; CABRAL, M. E.; AMOROSO, M. J.; FIGUEROA, L. I. C. Relationship among carotenoid production, copper bioremediation and oxidative stress in *Rhodotorula mucilaginosa* RCL-11. **Process Biochemistry.** n. 48, p. 803–809, 2013.

ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C., T. TANTIMONGCOLWAT, T. KONGPANPEE, P.

PRABKATE AND V. PRACHAYASITTIKUL. Appropriate technology for the bioconversion of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to liquid ethanol. **EXCLI J.**, 6: 167-176, 2007.

ISHOLA, M. M.; BRANDBERG, T.; TAHERZADEH, M. J. Simultaneous glucose and xylose utilization for improved ethanol production from lignocellulosic biomass through SSFF with encapsulated yeast. **Biomass and Bioenergy**. n. 77, p.192-199, 2015.

ISMAIL, K. S. K.; SAKAMOTO, T.; HASUNUMA, T.; ZHAO, X. Q.; KONDO, A. Zinc, magnesium, and calcium ion supplementation confers tolerance to acetic acid stress in industrial *Saccharomyces cerevisiae* utilizing xylose. **Biotechnol. Journal**. n. 9, p. 1519-1525, 2014.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**. n. 17, p. 320–326, 2006.

JO, S. E.; SEONG, Y.; LEE, H.; LEE, S. M.; KIM, S.; PARK, K.; PARK, Y. Microaerobic conversion of xylose to ethanol in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SX6^{MUT} expressing cofactor-balanced xylose metabolic enzymes and deficient in ALD6. **Journal of Biotechnology**. n. 227, p. 72–78, 2016.

KODAMA, S.; NAKANISHI, H.; THALAGALA, T. A. T. P.; ISONO, N.; HISAMATSU, M. A wild and tolerant yeast suitable for ethanol fermentation from lignocellulose. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. n. 11, p. 557-561, 2013.

KO, J. K.; UM, Y.; WOO, H. M.; KIM, K. H.; LEE, S. M. Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway. **Bioresource Technology**. n. 209, p. 290-296, 2016.

KO, J. K.; UM, Y.; LEE, S. M. Effect of manganese ions on ethanol fermentation by xylose isomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* under acetic acid stress. **Bioresource Technology**. n. 222, p. 422-430, 2016.

KONEMAN, E. W.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas colorido**. 6. ed. Editora Guanabara-Koogan, 2008.

KURTZMAN, C. P.; MATEO, R. Q.; KOLECKA, A.; THEELEN, B.; ROBERT, V.; BOEKHOUT, T. Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. **FEMS Yeast Research**. n. 15, p. 1-17, 2015.

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

KURTZMAN, C. P.; FELL, J.W. (Eds). **The yeasts: a taxonomic study**. Fourth Revised and Enlarged Edition. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LACHANCE, M.A.; BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G.; FELL, J.W.; KURTZMAN, C.P. *Candida* Berkhout (1923). In: KURTZMAN, C.P; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Eds). **The Yeasts: a taxonomic study**. Fifth Revised and Enlarged Edition. Amsterdam: Elsevier, 2011. Cap. 90.

LEI, H.; XU, H.; FENG, L.; YU, Z.; ZHAO, H.; ZHAO, M. Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. n. 122, p; 583-588, 2016.

- LLOYD, J. B.; WHELAN, W. J. An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. **Analytical Biochemistry**. n. 30, p. 467-470, 1969.
- MATEO, S. M.; PUENTES, J. G.; MOYA, A. J.; SÁNCHEZ, S. Ethanol and xylitol production by fermentation of acid hydrolysate from olive pruning with *Candida tropicalis* NBRC 0618. **Bioresource Technology**. n. 190, p. 1–6, 2015.
- MATOS, I. T. S. R.; CASSA-BARBOSA, L. A.; MEDEIROS GALVÃO, R. D. S.; NUNES-SILVA, C. G.; ASTOLFI FILHO, S. Isolation, taxonomic identification and investigation of the biotechnological potential of wild-type *Meyerozyma guilliermondii* associated with amazonian termites able to ferment D-xylose. **Biosci. J.** n. 30, p. 260-266, 2014.
- MATSUSHIKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K.; SAWAYAMA, S. Bioethanol Production from Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Expressing Xylose Reductase, NADP⁺-dependent Xylitol Dehydrogenase, and Xylulokinase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. n. 3, p. 296-299, 2008.
- MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.
- MILNE, N.; LUTTIK, M. A. H.; CUETO ROJAS, H. F.; WAHL, A.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; DARAN, J. M. Functional expression. of a heterologous nickel-dependent, ATP-independent urease in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engin.** n. 30, p. 130–140, 2015.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA-MME. Matriz Energética Nacional 2030. **Ministério de Minas Energia**; colaboração Empresa de Pesquisa Energética - Brasília: MME: EPE, 2007.
- MUPONDWA, E.; LI, X.; TABIL, L.; SOKHANSANJ, S; ADAPA, P. Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part I: Pretreatment Technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. n. 72, p. 178–190, 2017.
- MUPONDWA E; LI, X; TABIL, L; SOKHANSANJ, S; ADAPA, P. Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part II: Hydrolysis and fermentation technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 2016, In Press.
- NAÇÕES UNIDAS. Second Generation Biofuels Markets: State of play, trade and developing country perspectives. **United Nations Conference on Trade and Development**. Genebra, Suíça, 2016.
- NIEKSEN, J.; LARSSON, C.; MARIS, A. V.; PRONK, J. Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. **Current Opinion in Biotech.** n. 24, p. 398–404, 2013.
- NYKO, D.; GARCIA, J. L. F.; MILANEZ, A. Y.; DUNHAM, F. B. A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro, n. 32, p. 5-48, 2010.
- NOGUEIRA, L. A. H.; CAPAZ, R. S. Biofuels in Brazil: Evolution, achievements and perspectives on food security. **Global Food Security**.n. 2, p. 117–125, 2013.
- NOVY, V.; KRAHULEC, S.; LONGUS, K.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B. Co-fermentation of hexose and pentose sugars in a spent sulfite liquor matrix with genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**. n. 130, p. 439-448, 2013.
- OLIVEIRA, F.P. **Avaliação da aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico**

de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares. 2010. 143p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

PACIA, Z. M.; PUKALSKI, J.; TURNAU, K.; BARANSKA, M.; KACZOR, A. Lipids, hemoproteins and carotenoids in alive *Rhodotorula mucilaginosa* cells under pesticide decomposition e Raman imaging study. **Chemosphere.** n. 164, p. 1-6, 2016.

PEREIRA, F. C.; HICKERT, L. R.; SEHNEM, N. T.; CRUZ, P. B. S.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology.** n. 102, p. 4218-4225, 2011.

PEREIRA, F. C. Avaliação da capacidade de bioconversão de hexoses e pentoses em bioetanol por *Spathaspora arborariae*. 104f. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage.** 3 ed. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 2009.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resour Conserv Recycl.** n. 50, p. 1–39, 2007.

PREEZ, J. C. du. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb. Technol.** n. 16, p. 944-956, 1994.

PRYSZCZ, L. P.; NÉMETH, T.; GÁCSE, A.; GABALDÓN, T. Genome Comparison of *Candida orthopsilosis* Clinical Strains Reveals the Existence of Hybrids between Two Distinct Subspecies. **Genome Biol. Evol.** n. 6, p. 1069–1078, 2014.

PROMPT, A. H. **Análise da fermentação de glicose e xilose por leveduras *Spathaspora isoladas de madeira em decomposição.*** 84f. 2012. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2012.

RAO, R. S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. **Letters in Applied Microbiology.** n. 47, p. 19–24, 2008.

RAGHU, S.; SPENCER, J. L.; DAVIS, A. S.; WIEDENMANN, R. N. Ecological considerations in the sustainable development of terrestrial biofuel crops. **Current Opinion in Environmental Sustainability.** n. 3, p. 15–23, 2011.

RAIZEN. **Energia do Futuro.** Disponível em: < <http://www.raizen.com.br/>>. Acesso em 20 de janeiro de 2017.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION- RFA. **World Fuel Ethanol Production.** Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>>. Acesso em: 14 de julho de 2017.

ROBL, D.; THIMOTEO, S. S.; SOUZA, G. C. C. F.; BEUX, M. R.; DALZOTO, P.R.; PINHEIRO, R.L.; PIMENTEL, I C. Occurrence of *Candida orthopsilosis* in Brazilian tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Brazilian Journal of Microb.** n.45, v.1, p.105-109, 2014.

- RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**. n. 42, p. 265-270, 1950.
- ROSA, C. A.; PÉTER, G. **Biodiversity and Ecophysiology of yeasts**. Springer: 2006.
- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**. n. 454, p. 841–845, 2008.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.
- SAHA, C.; SEAL, A. Early changes in shoot transcriptome of rice in response to *Rhodotorula mucilaginosa* JGTA-S1. **Genomics Data**. n. 6, p 237–240, 2015.
- SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **Biotech**. n. 5, p. 337–53, 2015.
- SARKAR, N. *et al.* Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, Índia, p. 19-27, 2012.
- SANTOS, S. C.; SOUSA, A. S. DE; DIONÍSIO, S. R.; TRAMONTINA, R.; RULLER, R.; SQUINA, F. M.; ROSSELL, C. E. V.; COSTA, A. C. DA; IENCZAK, J. L. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. **Bioresource Technology**. n. 219, p. 319–329, 2016.
- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, n. 35, p. 1004-1010, 2012.
- SANTOS, S. C.; SOUSA, A. S.; DIONÍSIO, S. R.; TRAMONTINA, R.; RULLER, R.; SQUINA, F. M.; ROSSELL, C. E. V.; COSTA, A. C.; IENCZAK, J. L. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. **Bioresource Technology**. n. 2019, p. 319-329, 2016.
- SERRA, T.; ZILBERMAN, D. Biofuel-related price transmission literature: A review. **Energy Economics**. n. 37, p. 141–151, 2013.
- SHELLER, H.V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annu. Rev. Plant Biol.** n 61, p.263–89, 2010.
- SCHURE, E.G.; VAN RIEL, N.A.W.; VERRIPS, C.T. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.** n. 24, p. 67–83, 2000.
- SIGNORI, L.; PASSOULUNGI, S.; RUOHONEN, L.; PORRO, D.; BRANDUARDI, P. Effect of oxygenation and temperature on glucose-xylose fermentation in *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain. **Microbial Cell Factories**. n. 13, 51, 2014.
- SILVA, F. V. Panorama e perspectivas do etanol lignocelulósico. **Revista Liberato**. v. 13, n. 20, p. 01-16, 2012.
- SILVA, J. P. A.; MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipites*. **Renewable Energy**. n. 37, p. 259-265, 2012.

SILVA, D. D. V.; DUSSÁN, K. J.; HERNÁNDEZ, V.; SILVA, S. S. DA, CARDONA, C. A.; FELIPE, M. G. A. Effect of volumetric oxygen transfer coefficient (k_{LA}) on ethanol production performance by *Scheffersomyces stipitis* on hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysate. **Biochemical Engineering Journal**. n. 112, p. 249-257, 2016.

SMITH, D. A.; HOLTZAPPLE, M. T. Investigation of the optimal carbon-nitrogen ratio and carbohydrate–nutrient blend for mixed-acid batch fermentations. **Bioresource Technology**. n. 102, p. 5976–5987, 2011.

SOARES, C. E. V. F. **Caracterização de leveduras consumidoras de xilose por espectrometria de massa MALDI-TOF**. 84f. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) Universidade Católica de Brasília. Brasília, 2015.

SOUSA, T. M. **Estudo da hidrólise enzimática no tratamento de biomassa lignocelulósica usada como matéria-prima para a produção de biocombustível**. 42f. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2014.

SOUZA A. C. de. **Utilização de celulases de leveduras para produção de bioetanol de segunda geração**. 2011. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agícola), Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 2011.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLORES-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A.; BOM, E. P. S. Brazilian potencial for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **J. of Scientific & Industrial Research**. v. 67, p. 918-926. 2008.

SUGA, H.; MATSUDA, F; HASUNUMA, T.; ISHII, J.; KONDO, A. Implementation of a transhydrogenase-like shunt to counter redox imbalance during xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**. n. 97, p. 1669–1678, 2013.

TANIMURA, A.; NAKAMURA, T.; WATANABE, I.; OGAWA, J.; SHIMA J. Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. **SpringerPlus**. v. 1, n. 27, p. 1-7.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N.A.; MAIDEN, M. C.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **J Clin Microbiol**. n. 43, p. 284-292, 2005.

TÁVORA, F. L. História e Economia dos Biocombustíveis no Brasil. **Centro de Estudos da Consultoria do Senado**. n. 89, 2011.

VALINHAS, R. V. **Isolamento, seleção e identificação de leveduras selvagens com capacidade para conversão de xilose a etanol**. 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Biocombustíveis). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, 2016.

VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R.R.R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 925p. ISBN 9788527711654

VOLOSHIN, R. A.; RODIONOVA, M. V.; ZHARMUKHAMEDOV, S. K.; VEZIROGLU, T. N.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Review: Biofuel production from plant and algal biomass. **Int. J. of Hydrogen Energy**. n. 41, p. 17257-17273, 2016.

WANG, K.; MAO, Z.; ZHANG, C.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; TANG, L. Influence of nitrogen

sources on ethanol fermentation in an integrated ethanol–methane fermentation system. **Bioresource Technology**. n. 120, p. 206–211, 2012.

WANG, Y.; FAN, C.; HU, H.; LI, Y.; SUN, D.; WANG, Y.; PENG, L. Genetic modification of plant cell walls to enhance biomass yield and biofuel production in bioenergy crops. **Biotechnology Advances**. n. 34, p. 997–1017, 2016.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: _____. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. London: Academic press, p. 315–322, 1990.

WILKINS, M. R.; MUELLER, M.; EICHLING, S.; BANAT, I. M. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. **Process Biochemistry**. n. 43, p. 346–350, 2008.

WOHLBACH, D. J.; KUO, A.; SATO, T. K.; POTTS, K. M.; SALAMOV, A. A.; LABUTTI, K. M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGILINAN, J. L.; LINDQUIST, E. A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; JIN, M.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. E.; JEFFRIES, T. W.; ZINKEL, R.; BARRY, K. W.; GRIGORIEV, I. V.; GASCH, A. P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **PNAS**. n. 32, p. 13212–13217, 2011.

YARROW D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP & Fell JW (eds) **The Yeasts. A Taxonomic Study**. 4. ed. Elsevier, n. 418, p. 77–100, 1998.

YUCEL, G. H.; AKSU, Z. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. **Fuel**. n. 158, p.793–799, 2015.

YUE, G.; YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice. **Biomass and Bioenergy**. n. 39, p.48–52, 2012.

ZABED, H.; SAHU, J. N; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. n. 66, p. 751–774, 2016.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal of Biotechnology**. n. 144, p. 23–30, 2009.

ZHAO, C. H.; ZHANG, T.; LI, M.; CHI, Z. M. Single cell oil production from hydrolysates of inulin and extract of tubers of Jerusalem artichoke by *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Process Biochemistry**. n. 45, p. 1121–1126, 2010.

ZHANG, H.; YANG, Q.; GE, L.; ZHANG, G.; ZHANG, X.; ZHANG, X. Chitin enhances biocontrol of *Rhodotorula mucilaginosa* to postharvest decay of peaches. **Int. J. Biol. Macromol**. n. 88, p. 465–475, 2016.

ZHANG, J.; ZHANG, B.; WANG, B.; GAO, X.; SUN, L.; HONG, J. Rapid ethanol production at elevated temperatures by engineered thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* via the NADP(H)-preferring xylose reductase-xylitol dehydrogenase pathway. **Metabolic Engineering**. n. 31, p. 140–152, 2015.

ZHU, Y.; LEE, Y.; ELANDER, R. T. Optimization of dilute-acid pretreatment of corn stover using a high-solids percolation reactor. In: **Proceedings of the twenty-sixth symposium on biotechnology for fuels and chemicals**. Springer; 2005, p. 1045–54.