



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Química – IQ
Programa de Pós-graduação em Tecnologias Química e Biológica – PPGTQB.

Prospecção de leveduras para produção de xilitol a partir de hidrolisados de biomassa de cana

Clara Vida G. Corrêa Carneiro

Brasília, 2018

“Prospecção de leveduras para produção de xilitol a partir de hidrolisados de
biomassa de cana”

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica, pela Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Tecnologias Química e Biológica.

Orientador: Dr. João Ricardo M. de Almeida
Aluna: Clara Vida G. Corrêa Carneiro

Brasília, 2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Clara Vida Galvão Correa Carneiro**, matrícula nº **16/0098408**, intitulada “*Prospecção de leveduras para produção de xilitol a partir de hidrolisados de biomassa de cana*”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 25 de junho de 2018.

Prof. Dr. João Ricardo Moreira de Almeida
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof.^a Dr.^a Lidia Maria Pepe de Moraes
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof.^a Dr.^a Léia Cecília de Lima Fávaro
Membro Titular (UNIP)

Prof.^a Dr.^a Jessica Carvalho Bergmann
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 25 de junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a minha família, por cada um sempre se fazer presente à sua maneira. Minha mãe, Ana Póvoas, minha melhor amiga, meu exemplo feminino de força, que me ajudou a superar vários obstáculos nesses dois últimos anos, foi meu ombro amigo, minha cuidadora, eu tenho tudo a agradecer. Meu pai, Luiz Fernando, também meu melhor amigo, que sempre botou fé em mim, não me deixou sair do trilho, meu maior exemplo de resiliência. Meu irmãozinho Emanuel Carneiro, meu protegido, sempre bom de ter por perto, meu exemplo de criatividade e talento. Vocês são o meu lar, a minha felicidade, obrigada.

Minha avó Rozélia Póvoas, mulher forte, minha companheira, me ensinou muito e continua ensinando, muito grata por acreditar em mim. Minha avó Lizete, que é do tamanho de um botão, e tem um coração enorme, obrigada por tudo. Meu avô Carneiro, que desde quando eu era pequena, me dava a benção dizendo: “minha neta, eu desejo que você seja uma futura Doutora”, e desde então, fez e faz tudo o que está ao seu alcance para que isso se torne realidade, eu não tenho palavras para te agradecer.

Aos meus Tios Francisco e Maria, que acreditaram em mim e me acolheram, e tornaram possível a minha ida ao Japão, em uma oportunidade de apresentar este trabalho. Meus tios Gilberto e Raquel, que me são muito queridos, obrigada por torcerem sempre por mim.

Quero agradecer ao meu querido orientador Dr. João Ricardo M. de Almeida, por todos os ensinamentos e oportunidades, por ter me ajudado a trilhar esse caminho. Cheguei ao grupo como aluna de iniciação científica, da qual ele sacaneava por não saber usar o Excel, e hoje, posso dizer, que já faço belas planilhas. Muito obrigada pelos anos de aprendizados.

Quero fazer um agradecimento especial para a Prof.^a Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes, que me ajudou a tomar uma das decisões mais difíceis nesses dois anos, sem ela, eu não teria concluído esse projeto, muito grata pelos conselhos.

Também agradeço a todos os meus amigos e colegas de laboratório, muito grata pelas risadas e ensinamentos. Quero agradecer especialmente a Talita, minha parceira de fermentação, muito obrigada pelas risadas intermináveis, pela sua amizade e companhia. A Barbara, que sempre tem muito a me ensinar, excelente parceria em Congressos. A Debora, que se virou nos 30 para me ajudar com as correções, muito obrigada Victor, valeu pelos pontos de fermentação na madrugada. Fernanda, que sem ela, eu não teria nem feito a matrícula no programa, muito

obrigada. Também sou muito grata a Jessica, que me ajudou muito nesses últimos anos, além de sempre me alegrar com seus papos sensacionais.

Agradeço ao Julio, por ter estado ao meu lado em tantas ocasiões diferentes e por ter sido um dos meus maiores incentivadores, em todos os sentidos, pessoal e profissional. E agradeço ao Jackson Semerene, por ter me socorrido tantas vezes, me acolheu em sua casa, ajudou a curar minhas insônias e ainda tornou possível a minha ida ao derradeiro Congresso internacional apresentar este trabalho.

Agradeço às minhas primeiras amigas de Brasília, Raísa e Ana, que acompanharam todo o meu processo e nunca me deixaram desanimar, sou muito feliz por ter vocês na minha vida!

As irmãs que a Biologia me deu: Ju, Samara, Angélica e Catarina, e claro a agregada biológica Tassiane. Muito obrigada pelo apoio, companhia e compreensão, vocês são os meus amores.

Agradeço a banca por ter aceitado o convite de participar desse momento comigo.

Agradeço a Embrapa Agroenergia, por ter fornecido toda a estrutura necessária para realizar esse trabalho. A FAP-DF e CNPq pelo apoio financeiro.

E eu me vejo muito feliz nesse final, tendo tantas coisas a agradecer.

A todos os que fizeram parte dessa caminhada;

Meu sincero muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS	16
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Biomassa lignocelulósica e suas aplicações	18
1.2 Xilitol como um composto químico de interesse	22
1.2.1 Produção de xilitol por rota química	24
1.2.2 Produção de xilitol por rota biológica	26
2. OBJETIVOS:	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. JUSTIFICATIVA	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 MATERIAIS	34
4.1.1 Linhagens	34
4.1.2 Meios de cultura para leveduras:	35
4.1.3 Soluções	37
4.1.4 Protocolos	38
I) Extração de DNA total:	38
II) Reação de Polimerase em Cadeia – PCR:	38
4.1.4 Primers para amplificação da região D1/D2 do DNA ribossômico 26S de leveduras	39
4.1.5 Condições de amplificação da região D1/D2 do DNA ribossômico 26S de leveduras	39
4.1.6 Purificação dos produtos de PCR	40
4.1.7 Análise em gel de agarose	40
4.1.8 Armazenamento de linhagens	41
4.1.9 Análises dos metabólitos por HPLC	41
4.2 MÉTODOS	41
4.2.1 Prospecção de coleção microbiana para seleção de leveduras naturalmente capazes de consumir xilose	41
4.2.2 Avaliação da capacidade fermentativa de leveduras em microescala	43

4.2.3 Avaliação da capacidade fermentativa de leveduras em frasco, em condições de oxigênio limitado	44
4.2.4 Identificação taxonômica e comparação filogenética das linhagens selecionadas ...	45
4.2.5 Avaliação da capacidade fermentativa e produção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar	46
I) Avaliação da cinética fermentativa em frasco	46
II) Avaliação da cinética fermentativa em biorreator	47
5. RESULTADOS	49
5.1 Prospecção	49
5.2 Seleção das leveduras capazes de produzir xilitol	52
5.3 Avaliação da cinética fermentativa	56
5.4 Identificação taxonômica das leveduras	58
5.5 Avaliação da cinética fermentativa em hidrolisado	61
5.6 Avaliação da cinética fermentativa em biorreator	64
5.7 Avaliação da cinética fermentativa em frasco	70
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÃO	78
8. ANEXOS	80
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

RESUMO

Xilitol é um açúcar-álcool de cinco carbonos que tem despertado interesse biotecnológico, por suas diversas aplicações nas indústrias farmacêutica e alimentícia. Este composto é produzido industrialmente por rota química, através da hidrogenação catalítica de xilose purificada. Contudo, uma produção mais econômica e ambientalmente menos impactante é de interesse. Uma alternativa é a utilização de microrganismos que sejam capazes de converter a xilose presente em hidrolisados de biomassa lignocelulósica a xilitol. Para competir com a produção química, os microrganismos escolhidos devem ser capazes de manter altos índices de rendimento e produtividade, mesmo na presença dos inibidores provenientes da hidrólise da lignocelulose. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo selecionar leveduras selvagens capazes de produzir xilitol a partir de açúcares derivados do bagaço da cana de açúcar. Para isso, 960 linhagens de leveduras isoladas de amostras de solo e madeira em decomposição foram prospectadas e selecionadas pela capacidade de crescer em meio mínimo contendo xilose (40 g/L) como única fonte de carbono. As 42 leveduras que apresentaram melhor crescimento foram cultivadas em microplacas em meio de cultura suplementado com xilose e o perfil de consumo de açúcar e de produção de metabólitos foi analisado. Com base nesses resultados, as seis leveduras que mais consumiram xilose foram posteriormente identificadas taxonomicamente e avaliadas em experimentos comparativos e de cinética fermentativa em hidrolisado com e sem suplementação de fontes de carbono e nitrogênio. As seis leveduras foram identificadas como pertencentes à espécie *Meyerozyma guilliermondii*. Todas foram capazes de consumir toda a glicose e xilose presente no hidrolisado de bagaço de cana e produzir xilitol, porém com cinéticas diferenciadas entre si. Com base nos resultados de rendimento obtidos, uma das seis linhagens foi selecionada para comparação de cinética fermentativa de hidrolisado, em frasco e biorreator, com linhagens de

Spathaspora sp. JA1, *W. anomalus* 740 e *M. guilliermondii* A3 conhecidas como produtoras de xilitol. Essa linhagem selecionada foi capaz de assimilar xilose e produzir xilitol com rendimento máximo de $Y = 0,57$ g/g xilose. A estratégia de prospecção adotada nesse trabalho possibilitou a identificação de uma nova linhagem de *M. guilliermondii* capaz de produzir xilitol a partir de hidrolisados de biomassa de cana de açúcar.

Palavras-chave: xilitol, xilose, hidrolisado, fermentação, cana de açúcar.

ABSTRACT

Xylitol is a sugar alcohol with five carbons, which is attracting interest for their various biotechnology applications in the pharmaceutical and food industries. This compound is industrially produced only by chemical route, through the catalytic hydrogenation of the purified xylose. However, a more economical and environmentally friendly production is of interest. An alternative is to use microorganisms that are able to convert xylose present in lignocellulosic biomass hydrolysates into xylitol. To compete with chemical production, the chosen microorganisms must be able to maintain high levels of yield and productivity, even in the presence of inhibitors from the hydrolysis of lignocellulose. In this context, this study aimed to select wild yeasts able to produce xylitol from sugars derived from sugar cane bagasse. For this, 960 yeast strains, isolated from soil, wood and insects have been prospected and selected for the ability to grow on minimal medium containing xylose (40 g/L) as the only carbon source. The 42 yeasts that showed better growth were grown in microplates in culture medium supplemented with xylose (40 g/L), and the profile of sugar consumption and production of metabolites were analyzed. Based on these results, the six most xylose consumers yeasts were subsequently identified, molecular and taxonomically, and evaluated in comparative experiments of fermentative kinetics in hydrolyzed with and without any supplement of carbon and nitrogen sources. The six yeasts have been identified as belonging to the species *Meyerozyma guilliermondii* and were able to consume all the xylose and produce xylitol, however, they presented different fermentative kinetics. Based on the results obtained, one of the six strains was selected for comparison of the fermentative kinetics in sugar cane bagasse hydrolyzed, in bottle and bioreactor, with strains of *Spathaspora* sp. JA1, *W. anomalus* 740 and *M. guilliermondii* A3, known as xylitol producers. The strain selected was able to assimilate xylose and produce xylitol with a maximum yield of $Y = 0.57$ g/g Xylose. The

prospecting strategy adopted in this work enabled the identification of a new strain of *M. guilliermondii* able to produce xylitol from sugar cane biomass hydrolysates.

Keywords: xylitol, xylose, hydrolysate, fermentation, sugar cane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representando as principais etapas para produção de etanol e outros compostos químicos a partir de açúcares presentes na biomassa lignocelulósica. Após etapas de pré-tratamento e hidrólise os açúcares podem ser fermentados a etanol. Adicionalmente, a fração C5, rica em xilose, pode ser separada e utilizada na produção de outros compostos químicos.

Figura 2. Estrutura química da molécula de xilitol.

Figura 3. Esquema representativo das etapas de produção química de xilitol. Somente as etapas de hidrólise ácida da xilana e hidrogenação catalítica da xilose a xilitol são exemplificadas.

Figura 4. Metabolismo de xilose em bactérias (linhas pontilhadas), em leveduras e em fungos filamentosos (linhas preenchidas).

Figura 5. Esquema representando a metodologia utilizada nas prospecções iniciais.

Figura 6. Esquema representativo da região conservada D1/D2 do DNA ribossômico 26S de leveduras.

Figura 7. Curva de crescimento de leveduras em meio mínimo (YNB) suplementado com xilose em microplacas de 96 poços. Cada linha representa o crescimento de uma linhagem de levedura. (A) placa JAP14— Replica 1; (B) placa JAP14- replica 2; (C) placa JAP14- replica 3; (D) placa JAP14 replica 4.

Figura 8. Média e desvio padrão do crescimento máximo das quatro réplicas das 42 leveduras previamente selecionadas dentre todas as 960, em YNB 1X suplementado com xilose (40 g/L). OD600 nm medido após 180h de crescimento. Leveduras isoladas de cupim (verde), larva de inseto (laranja), solo profundo (cinza), solo superficial (azul), madeira (roxo).

Figura 9. Consumo de xilose e produção de xilitol (g/L), realizados pelas leveduras previamente selecionadas. Xilose consumida (barras coloridas); xilitol produzido (barra preta); Leveduras

isoladas de cupim (verde), larva de inseto (laranja), solo profundo (cinza), solo superficial (azul), madeira (roxo).

Figura 10. Consumo de xilose e produção de xilitol e etanol pelas leveduras previamente selecionadas. Xilose consumida (barras coloridas); produção de xilitol (barra preta); produção de etanol (linha rosa). Leveduras isoladas de cupim (verde), larva de inseto (laranja), solo profundo (cinza), madeira (roxo).

Figura 11. Fermentação de meio definido YNB suplementado com xilose (40 g/L), em condição microaeróbica, realizada pelas leveduras (A) A12 (*M. guilliermondii*), (B) B12 (*M. guilliermondii*), (C) G12 (*M. guilliermondii*), (D) H5 (*M. guilliermondii*), (E) H9 (*M. guilliermondii*), (F) H12 (*M. guilliermondii*). Xilose (▲), Xilitol (△), Etanol (□), DO600 nm (○).

Figura 12. Análise eletroforésica em gel de agarose para confirmação da amplificação do fragmento de DNA da região 26S do DNA ribossômico das leveduras (~680 pb). O marcador utilizado foi o 1 kb *plus DNA ladder*.

Figura 13. Relações filogenéticas entre as linhagens das leveduras selecionadas neste trabalho e outras linhagens de *M. guilliermondii* presentes em bancos de dados (NCBI e CBS-KNAW *Collections*). Sequências nucleotídicas do domínio D1/D2 do DNA ribossômico 26S das leveduras selecionadas, foram alinhadas e comparadas com o microrganismo escolhido para o grupo externo, *Candida tenuis*. Árvore filogenética foi montada através do software Geneious seguindo o modelo Jukes-Cantor com parâmetros *Neighbor-joining*, 1.000 *bootstraps*, 847,488 *random seeds*, *support threshold* 50 %. *M. gui* (*M. guilliermondii*), *M. car* (*M. caribbica*).

Figura 14. Fermentação de hidrolisado 30% em condição de oxigênio limitado, realizada pelas leveduras (A) *Spathaspora* sp. JA1, (B) *M. guilliermondii* B12, (C) *M. guilliermondii* Controle

positivo, (D) *M. guilliermondii* A3 (E) *W. anomalus* 740, em frasco. Xilose (▲), Xilitol (△), Etanol (□), Biomassa (O), Acetato (x).

Figura 15. Fermentação de hidrolisado 30% em condição aeróbica, realizada pelas leveduras (A) *M. guilliermondii* B12, (B) *Spathaspora* sp. JA1, (C) *W. anomalus* 740, em biorreator. Xilose (▲), Xilitol (△), Glicose (■), Etanol (□), Acetato (x), Biomassa (O).

Figura 16. Fermentação de hidrolisado 30% em condição de oxigênio limitado, realizada pelas leveduras (A) *M. guilliermondii* B12, (B) *Spathaspora* sp.JA1, (C) *W. anomalus* 740, em biorreator. Xilose (▲), Xilitol (△), Glicose (■), Etanol (□), Acetato (x), Biomassa (O).

Figura 17. Fermentação de hidrolisado 30% em condição microaeróbica, realizada pelas leveduras (A) B12 (*M. guilliermondii*), (B), Controle positivo (*M. guilliermondii*), (C) A3 (*M. guilliermondii*), em frasco. Xilose (▲), Xilitol (△), Glicose (■), Etanol (□), Acetato (x), Biomassa (O).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual de diferentes materiais lignocelulósicos ricos em pentoses.

Tabela 2. Concentração de inibidores em diferentes hidrolisados de biomassa lignocelulósica.

Tabela 3. Processos fermentativos para a produção de xilitol por diferentes microrganismos.

Tabela 4. Origem das linhagens pertencentes ao banco microbiano da Embrapa Agroenergia.

Tabela 5. Composição do hidrolisado utilizado.

Tabela 6. Parâmetros para a realização de Reação de Polimerase em Cadeia.

Tabela 7. Sequência dos primers utilizados na PCR.

Tabela 8. Parâmetros para PCR em termociclador.

Tabela 9. Melhores leveduras consumidoras de xilose e produtoras de xilitol.

Tabela 10. Valores máximos de rendimento alcançados na fermentação de xilose (40 g/L) em microplaca; em condição oxigênio limitado.

Tabela 11. Valores máximos de rendimento alcançados na fermentação de Xilose 40 g/L em frasco; em condição aeróbica.

Tabela 12. Identificação taxonômica das leveduras selecionadas.

Tabela 13. Valores máximos de rendimento (48h) e produtividade específica (48h) da fermentação de hidrolisado 30% sem suplementação, em frasco.; em condições aeróbicas.

Tabela 14. Valores máximos de rendimento e produtividade (48h) da fermentação de hidrolisado 30%, em duplicata em biorreator; em condições aeróbicas.

Tabela 15. Valores máximos de rendimento e produtividade relativa (44h) da fermentação de hidrolisado 30%, em duplicata em biorreator; em condições de oxigênio limitado.

Tabela 16. Valores máximos de rendimento e produtividade específica máximos (48h) da fermentação de hidrolisado 30%, em triplicata em frasco; em condições microaeróbicas.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Graus Celsius

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (deoxyribonucleotide triphosphate)

DO600 nm – Densidade Ótica 600 nanômetros

EDTA - Ácido Etileno-diamino-tetra-acético

H₂SO₄ - Ácido Sulfúrico

HCl - Ácido Clorídrico

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance (high performance liquid chromatography)

KOH - Hidróxido de Potássio

JAP - João Almeida Placa

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

NAD⁺/NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP⁺/NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaOH - Hidróxido de Sódio

OGM - Organismo Geneticamente Modificado

Pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia de polimerase (polymerase chain reaction)

SB - Tampão ácido bórico e sódio

XDH - Xilitol Desidrogenase

XI - Xilose Isomerase

XK - Xiluloquinase

XR - Xilose Redutase

YM - Molde de levedura (*Yeast Mold*) – Meio de cultura para leveduras

YNB - Base nitrogenada para levedura (*yeast nitrogen base*)

YPD - Extrato de levedura, peptona, dextrose (*yeast peptone dextrose*)

YPX - Extrato de levedura, peptona, xilose (*yeast peptone xylose*)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biomassa lignocelulósica e suas aplicações

A biomassa lignocelulósica é derivada de diversos resíduos e produtos agroindustriais, comumente divididos em 4 grupos: resíduos de indústrias energéticas e alimentícias, urbanos e florestais [44]. Esses resíduos lignocelulósicos estão disponíveis em abundância e são uma das maiores fontes de energia encontradas na natureza [1]. Tais resíduos podem ser utilizados para a produção de bioprodutos, como etanol, biodiesel, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e xilitol [44].

A fração lignocelulósica da biomassa é composta basicamente por: celulose, hemicelulose e lignina. Sua composição depende de alguns fatores como tipo de planta, clima e composição do solo [1-27]. A cana de açúcar, por exemplo, é composta por 40-50% de celulose, 25-30% de hemicelulose e 15-20% de lignina [24-44] (Tabela 1).

A celulose é o polímero mais abundante encontrado na natureza e possui diversas aplicações comerciais [44]. A celulose é uma cadeia homopolimérica linear composta por monômeros de glicose, ligados alternadamente entre si, por ligações glicosídicas $\beta - (1 - 4)$. Essa conformação possibilita a formação de cadeias com estruturas cristalinas, que conferem estabilidade e forma para a parede celular das plantas [44].

A hemicelulose, por sua vez, é um polímero heterogêneo composto por pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, galactose e glicose) e ácidos de açúcares; ligados entre si em diferentes regiões metil e acetil (Tabela 1). A cadeia principal é ramificada com diferentes resíduos de açúcares e ácidos, o que impede a formação de regiões cristalinas. Essa estrutura faz com que a hemicelulose seja menos recalcitrante que a celulose [44].

Tabela 1. Composição percentual de diferentes materiais lignocelulósicos ricos em pentoses.

Biomassa	Glucana	Xilana	Arabinana	Lignina	Acetil	Referências
Bagaço de cana de açúcar	43,3	24,3	2,0	22,8	2,0	[41]
Palha de trigo	41,2	26,1	-	19,1	4,2	[42]
Palha de arroz	34,2	24,5*	NR	19,9	NR	[43]
Resíduo de milho (americano)	36,1	2,4	3,5	17,2	3,2	[40]
Resíduo de milho (italiano)	36,8	22,2	5,5	21,2	1,7	[40]

NR, não reportado.

*inclui arabinana.

Tabela adaptada de Almeida, et al, 2011.

Além da celulose e hemicelulose, a biomassa lignocelulósica também é composta por lignina (Tabela 1). Um polímero aromático altamente hidrofóbico, composto por estruturas fenólicas unidas por ligações de éter e conexões carbono-carbono desordenadas. Possui uma conformação heterogênea policristalina, pertencente à classe dos compostos polifenólicos [50].

Para que os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica possam ser utilizados em processos fermentativos é necessário que a celulose e hemicelulose passe por processos de pré-tratamento e hidrólise. Nesses processos, os monômeros de açúcares constituintes da celulose e hemicelulose são liberados, e preferencialmente ocorre a remoção da lignina [1].

Diferentes tipos de pré-tratamento são conhecidos, e podem ser agrupados em processos químicos (ácidos, bases, líquidos iônicos), físicos (radiação, micro-ondas, pirólise), físico-químico (explosão a vapor, catálise elétrica, explosão por CO₂) e biológicos (catálise enzimática) [44]. O pré-tratamento tem como objetivo a redução da recalcitrância da celulose, e a quebra da hemicelulose e/ou lignina. Dependendo do tipo e das condições do pré-tratamento ocorre a solubilização da hemicelulose (pré-tratamentos em condições ácidas em altas temperaturas) ou da lignina (pré-tratamentos em condições alcalinas em altas temperaturas) [1].

Após o pré-tratamento, procede-se com o processo de hidrólise, o qual visa solubilizar completamente os açúcares presentes na celulose e hemicelulose. A hidrólise é realizada preferencialmente por processos enzimáticos, para maximizar a recuperação dos açúcares evitar a formação de compostos pela degradação dos açúcares [1].

Após o processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática, os açúcares presentes na hemicelulose são liberados no meio, porém, com eles, alguns compostos que inibem o metabolismo microbiano também são liberados e outros possivelmente formados [1-2]. Entre estes compostos estão o ácido acético, o qual é liberado no hidrolisado lignocelulósico pela deacetilação da hemicelulose; outros ácidos alifáticos podem ser formados a partir da quebra do HMF e furfural, tais como levulínico e fórmico [1].

O Hidroximetilfurfural – HMF e o furfural são formados pela degradação de hexoses e pentoses em altas temperaturas ($>100^{\circ}\text{C}$), respectivamente [2-31]. Os compostos fenólicos são formados pela quebra da molécula de lignina. Os compostos fenólicos mais encontrados em hidrolisados são 4-hidroxibenzeno e ácido ferúlico, (Tabela 2) [31].

O grau de tolerância aos inibidores pode variar de acordo com o microrganismo utilizado. Mas de forma geral, inibidores interferem diretamente na cinética fermentativa dos microrganismos. Eles podem influenciar na formação de ATP, proporcionar acúmulo de acetaldeído, o que resulta no aumento da fase *lag* na fermentação e ainda podem afetar a integridade da membrana celular e a formação de proteínas [31-32].

A biomassa do bagaço de cana possui altas concentrações de açúcares, principalmente de xilose (Tabela 1), o qual representa cerca de 33% dos açúcares presentes no bagaço de cana de açúcar[2]. Através do pré-tratamento e hidrólise do bagaço, é possível recuperar mais de 80% das

Tabela 2. Concentração de inibidores em diferentes hidrolisados de biomassa lignocelulósica.

Biomassa	Ácido acético (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)	Compostos fenólicos totais (g/L)	Referências
Bagaço de cana de açúcar	2,31	0,02	0,19	5,48	[11]
Resíduos de madeira	11,25	0,19	1,75	4,52	[52]
Álamo amarelo	11,33	0,18	1,4	4,53	[52]
Resíduo de cevada	1,31	0,05	0,64	1,32	[51]

Tabela adaptada de Rao, et al, 2016.

pentoses presentes na hemicelulose, o quais podem ser empregados em processos biotecnológicos para produção de compostos químicos de interesse, tais como o xilitol e etanol de segunda geração (Figura 1) [25-26].

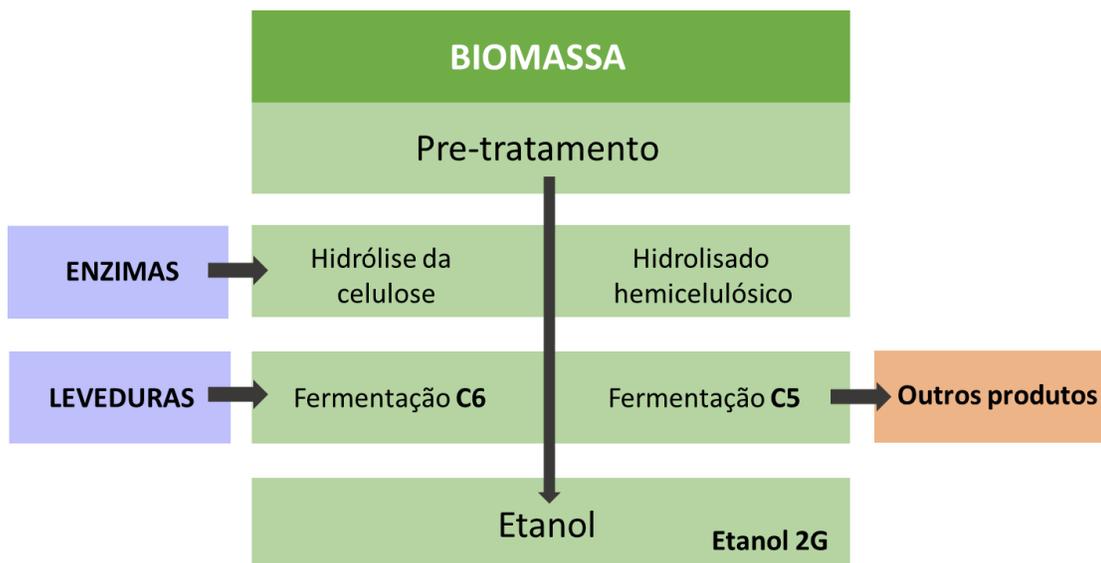


Figura 1. Esquema representando as principais etapas para produção de etanol e outros compostos químicos a partir de açúcares presentes na biomassa lignocelulósica. Após etapas de pré-tratamento e hidrólise os açúcares podem ser fermentados a etanol. Adicionalmente, a fração C5, rica em xilose, pode ser separada e utilizada na produção de outros compostos químicos.

Biorrefinarias podem ser definidas como “indústrias para o processamento sustentável de biomassas para formação de produtos para o mercado alimentício, farmacêutico e energético” [50]. Essas indústrias surgem como alternativas mais sustentáveis às refinarias de produtos derivados do petróleo [43]. Processos químicos, físicos e biológicos podem ser empregados em biorrefinarias, afim de converter diferentes tipos de biomassa em produtos de interesse comercial e energia sustentável (Figura 1) [43].

Nesse contexto, a integração da produção de biocombustíveis, tais como etanol 1G e 2G com a produção de outros compostos químicos de interesse pode ser vantajoso. A fração celulósica da biomassa, rica em hexoses (glicose) podem ser facilmente convertidas a etanol por processos fermentativos empregando a levedura industrialmente utilizada *Saccharomyces cerevisiae*. Porém a xilose, proveniente da fração hemicelulósica da biomassa, a qual não é metabolizada por essa levedura, pode ser explorada para produção de outros compostos químicos (Figura 1).

1.2 Xilitol como um composto químico de interesse

O xilitol é um poliol (açúcar-álcool) de cinco carbonos ($C_5H_{12}O_5$) (Figura 2) e é um metabólito intermediário no catabolismo de carboidratos. Possui alto potencial adoçante, semelhante ao da sacarose. A energia proveniente do xilitol é apenas de 10 kJ/g, 40% menor do que a da sacarose, e, por não precisar de insulina para ser metabolizado, também pode ser utilizado como adoçante por pacientes com diabetes [1-7].

De fato, o xilitol tem sido amplamente utilizado como um substituto do açúcar em indústrias alimentícias e também em indústrias farmacêuticas, devido ao seu potencial bactericida. Por ser um açúcar não fermentável, as bactérias não utilizam xilitol para crescer, o que leva à sua

ação preventiva contra inflamações das vias aéreas, como a otite e a sinusite e o surgimento de cáries [7-30].

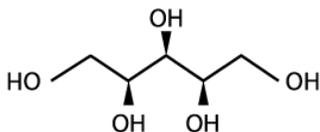


Figura 2. Estrutura química da molécula de xilitol.

Além de seus benefícios para a saúde, o xilitol tem um potencial refrescante na boca, causado pelo seu alto índice de calor endotérmico (38,8 cal/g) e alta solubilidade em água. Essas particularidades conferem a sensação de hálito fresco, característica essa, muito utilizada em gomas de mascar, pastas de dente e balas [5 – 8]. Ademais, 70% do mercado mundial de xilitol é direcionado para a confecção de doces [30].

O padrão alimentar da população está mudando, e com isso, a busca por produtos naturais, mais saudáveis e com baixos valores calóricos está aumentando. O mercado mundial de xilitol é estimado em 670 milhões por ano e a demanda mundial de xilitol aumenta estavelmente 6% ao ano [2 – 7].

O xilitol foi identificado pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos (DOE) como um dos 12 químicos de maior potencial para ser produzido a partir de biomassa. O interesse também se explica porque além de suas aplicações em diferentes indústrias, o xilitol tem potencial para ser transformado em outras classes de moléculas de interesse comercial, como o etilenoglicol e propilenoglicol, que podem ser utilizados em indústrias cosméticas, farmacêuticas e automobilísticas [25].

O xilitol, atualmente, é produzido apenas por rota química, através da hidrogenação catalítica da xilose oriunda de biomassa lignocelulósica, na presença de catalisadores de alumínio

ou níquel [1-2]. A maior empresa produtora, M/s DuPont Danisco, tem filiais na Finlândia e Estados Unidos e sede na China, e produz xilitol por rota química usando a xilose proveniente de biomassa de madeira [1]. Seguida pela segunda maior indústria M/s Xylitol Canada Inc. e M/s DFI Corp. sediada nos Estados Unidos [30]. O processo de conversão biotecnológica da xilose em xilitol pode ser atrativo num contexto de biorrefinarias, pelo emprego de processos ambientalmente menos impactantes e agregação de valor à resíduos agroindustriais. No Brasil, não existem indústrias produtoras de xilitol [30]

1.2.1 Produção de xilitol por rota química

A produção química de xilitol iniciou-se na Finlândia, na década de 70, logo após o desenvolvimento tecnológico da separação de compostos químicos por cromatografia, o que possibilitou a separação de xilose da porção hemicelulósica de resíduos de madeira, gerando uma produção em massa dessa pentose [30].

Industrialmente, o xilitol ainda é produzido apenas por rota química, através da redução da xilose purificada, na presença de catalisadores químicos, em condições de altas temperaturas e pressão (Figura 3). De forma geral, a produção de xilitol por rota química passa por 5 etapas: 1. Hidrólise ácida da xilana; 2. Purificação do hidrolisado para obtenção de xilose; 3. Utilização de catalisador de alumínio ou níquel para a reação de hidrogenação de xilose para xilitol; 4. Purificação do xilitol; 5. Cristalização do xilitol [1]. O parâmetro que regula a cinética de todas as etapas é a manutenção de altas temperaturas [30], o rendimento máximo do processo fica em torno de 60%-80% [4-5]. Sendo que a etapa de hidrogenação catalítica pode durar de 3 a 5 horas, dependendo dos equipamentos utilizados [1].

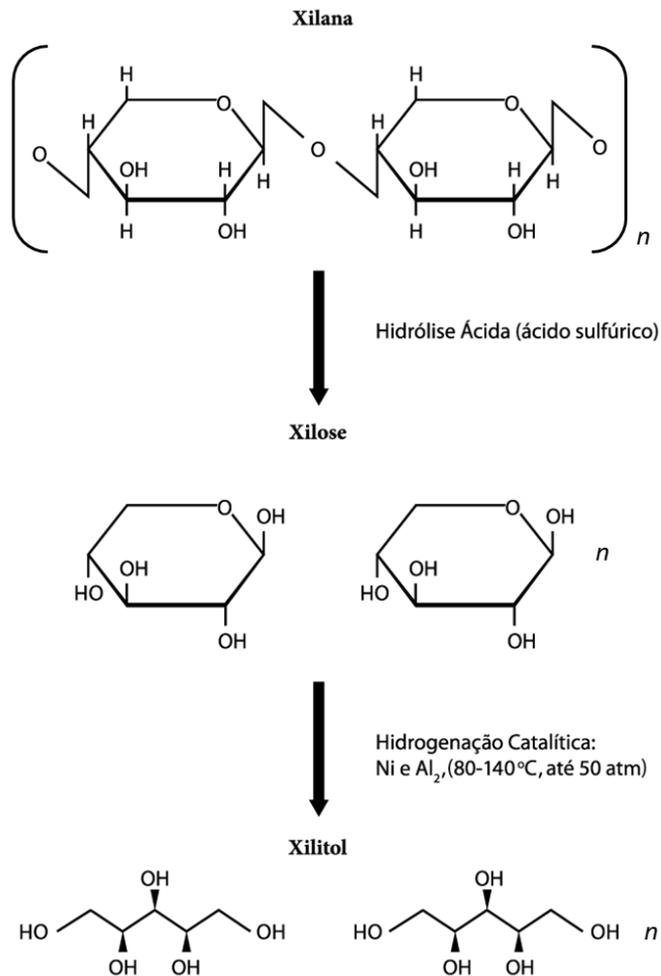


Figura 3. Esquema representativo das etapas de produção química de xilitol. Somente as etapas de hidrólise ácida da xilana e hidrogenação catalítica da xilose a xilitol são exemplificadas.

Apesar do emprego em escala industrial, o processo químico apresenta muitos gargalos no que diz respeito às suas diversas etapas de purificação, principalmente a purificação da xilose presente no hidrolisado. Preços elevados dos equipamentos, reagentes, e um considerável gasto energético reacional na purificação da xilose e conversão em xilitol, também são fatores que contribuem para o aumento do custo de produção e, conseqüente aumento do preço do xilitol no mercado mundial [4-30].

A produção biotecnológica de xilitol é preferível, principalmente, por não necessitar de condições de temperatura e pressão tão extremas quanto as utilizadas na hidrogenação catalítica. Além disso, tem o potencial de oferecer custos mais baixos para as rotas de produção [10].

Diversas estratégias de produção de xilitol por rota biotecnológica têm sido analisadas. A utilização de células livres ou imobilizadas, inseridas em diferentes processos fermentativos, como batelada, batelada alimentada ou fermentação contínua vem sendo avaliados. [2]. Para aumentar a eficiência do processo, diversos parâmetros têm sido analisados, tais como, microrganismo a ser utilizado, pH do meio de cultura, aeração, temperatura, fonte de carbono, concentração de açúcares e inibidores do crescimento celular, presentes no meio [25].

Em termos de catalisadores biológicos, diferentes microrganismos são capazes de produzir xilitol [1]. De qualquer forma, cada espécie e mesmo diferentes linhagens de uma mesma espécie apresentam peculiaridades e os resultados de produção relatados, geralmente, são muito discrepantes uns dos outros. Portanto, o principal fator limitante quando se diz respeito ao processo biotecnológico de produção de xilitol é a escolha do microrganismo, pois a partir dele, todos os outros parâmetros serão estabelecidos e otimizados (pH, aeração, fonte de carbono e nitrogênio) [2].

1.2.2 Produção de xilitol por rota biológica

Leveduras, fungos filamentosos e algumas bactérias são microrganismos que possuem a capacidade de produzir xilitol como um metabólito intermediário na via de assimilação de xilose. [2]. O metabolismo de xilose em leveduras e fungos filamentosos, ocorre em duas etapas: primeiro a xilose é reduzida à xilitol pela xilose redutase (XR), que é uma enzima NAD(P)H dependente.

Nesse ponto, o xilitol pode ser secretado, ou oxidado à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), que por sua vez necessita do cofator NAD^+ para realizar a catálise [2-9] (Figura 4).

Para a maioria das bactérias, o metabolismo de xilose ocorre apenas em uma etapa, catalisada pela enzima xilose isomerase (XI) [7], a qual converte a xilose diretamente em xilulose, (Figura 4). Alguns fungos filamentosos também possuem a via da XI. Nesses organismos a produção de xilitol pode ocorrer pela presença de aldose desidrogenases inespecíficas para xilose [21-30].

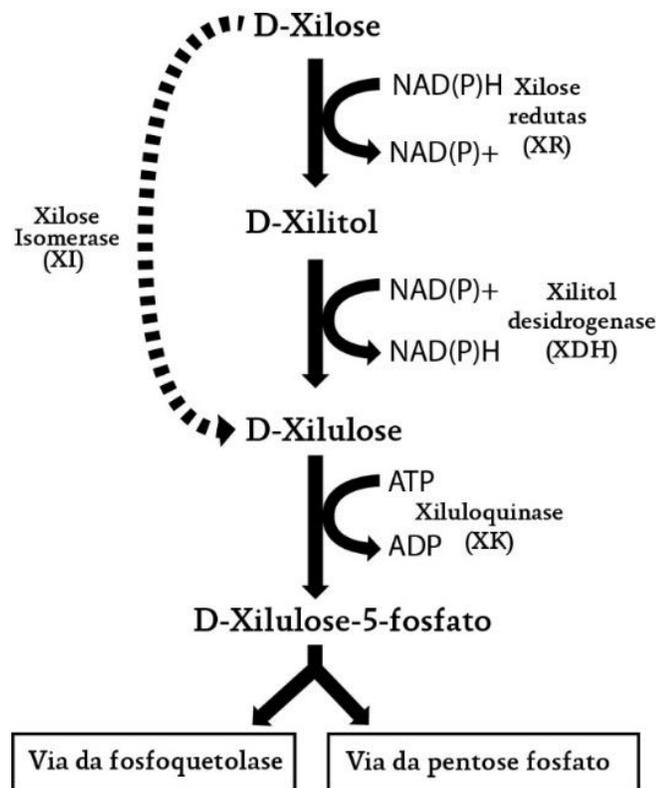


Figura 4. Vias do metabolismo de xilose mais comuns em bactérias (linhas pontilhadas), leveduras e fungos filamentosos (linhas preenchidas).

Uma das grandes limitações na produção de xilitol é a entrada de xilose na célula, uma vez que as pentoses geralmente utilizam os mesmos transportadores das hexoses. Porém, a afinidade desses sistemas de transporte pelas hexoses é bem maior, o que diminui a assimilação de xilose em comparação à glicose [30]. Dessa forma, a presença de hexoses em hidrolisados de biomassa tende a reduzir a eficiência do processo, diminuindo a produtividade da etapa de conversão.

Apenas algumas bactérias são capazes de consumir xilose e produzir xilitol naturalmente, como a *Corynebacterium* sp. e *Enterobacter liquefaciens*. No entanto, a produção é baixa, menos de 1 g/L, e por isso não tão atrativa quando se considera processos industriais. Contudo, estudos estão reportando novas bactérias capazes de produzir xilitol através da fermentação de xilose. Rangaswamy, e, Agblevor, [34], encontraram 10 bactérias anaeróbicas facultativas pertencentes aos gêneros *Serratia*, *Cellulomonas* e *Corynebacterium*, nesse estudo a produção máxima de xilitol foi de 0,81 g/L e rendimento máximo de 0,33 g/g xilose⁻¹.

As leveduras são consideradas os melhores microrganismos produtores de xilitol por produzirem xilitol em relativamente altas concentrações e rendimento, principalmente, as pertencentes ao gênero *Candida* (Tabela 3). Essas leveduras têm sido bastante avaliadas por apresentarem capacidade de metabolizar xilose naturalmente e apresentarem bons rendimentos de produção de xilitol devido à expressão das enzimas XR e XDH [2].

Como mostrado na Tabela 3, os valores de produção de xilitol, bem como de rendimento e produtividade, são muito diferentes quando as cinéticas fermentativas das várias linhagens produtoras de xilitol são comparadas. As pesquisas envolvendo o metabolismo dessas leveduras estão focadas, principalmente, na otimização da produção já existente de xilitol.

Tabela 3. Processos fermentativos para a produção de xilitol por diferentes microrganismos.

Microrganismo	Biomassa	Processo fermentativo	Y _{xilitol/xilose} (g/g)	Produtividade (g/h.- ¹)	Xilitol (g/L)	Referências
<i>C. athensensis</i> SB18	Resíduo de hortaliças	Batelada	0,81	0,98	100,10	[10]
<i>C. guilliermondii</i> FT 120037	Bagaço de cana	Batelada	0,81	0,60	50,50	[12]
<i>C. guilliermondii</i> FT 120037	Palha de arroz	Batelada	0,84	0,17	66,10	[13]
<i>C. tropicalis</i> As 2 1776	Espiga de milho	Batelada alimentada	0,83	1,01	96,50	[14]
<i>C. tropicalis</i> NBRC0618	Resíduo de azeitona	Batelada	0,49	-	53,00	[16]
<i>C. magnoliae</i>	Bamboo	Batelada	0,59	0,42	10,50	[55]
<i>C. tropicalis</i> HDY-02	Espiga de milho	Batelada alimentada	0,73	0,74	58,00	[15]
<i>C. tropicalis</i> W103	Espiga de milho	Batelada alimentada	0,70	0,95	68,40	[17]
<i>P. stipitis</i> NRRL Y - 30785	Palha de milho	Batelada	0,61	0,18	12,5	[57]
<i>D. hansenii</i>	Bagaço de cana	Batelada	0,82	0,46	71,20	[17]
<i>D. hansenii</i> CCMI 941	Resíduo de cevada	Batelada	0,57	0,51	24,00	[58]
<i>K. marxianus</i> CCA 510	Bagaço de castanha de caju	Batelada	-	-	6,76	[56]
<i>K. marxianus</i> CE 025	Bagaço de castanha de caju	Batelada	-	-	4,80	[11]

Yablochkova et al, [22] comparou a atividade das enzimas XR e XDH de 11 espécies diferentes de levedura, incluindo os gêneros: *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis* e *Pachysolen*, com isso, foi possível mostrar que a levedura *C. tropicalis* Y-456 possui a XR com a maior atividade enzimática específica (6.57 μ mol//min/ mg proteína) Estudos apontam que microrganismos que possuem alta atividade de XR - NAD(P)H dependente são excelentes produtores de xilitol [2 – 22].

A presença de xilose no meio induz a expressão da XR- NAD(P)H dependente e da XDH- NAD⁺ dependente, principalmente, em algumas espécies do gênero *Candida* [2]. Nesses microrganismos, a disponibilidade de oxigênio é um dos fatores fundamentais para a produção de xilitol. Isso porque em condições de oxigênio limitado, os cofatores NAD(P)H não podem ser re-oxidados e ocorre um desbalanço redox dos cofatores envolvidos no metabolismo de xilose, haja vista que o NADP⁺ gerado pela XR não é utilizado pela XDH, a qual é NAD⁺ dependente. Isso tudo resulta no acúmulo de xilitol e sua consequente secreção pela célula [2-28].

Apesar da disponibilidade de linhagens produtoras de xilitol, a prospecção de novas leveduras que sejam naturalmente capazes de produzir xilitol, ainda se faz necessária, para que a demanda de produção em larga escala seja suprida [2-39].

De fato, estudos de prospecção de novas leveduras estão sendo feitos, dentre eles, Mirsa et al, [23] estudou 18 espécies diferentes de leveduras provenientes do néctar da planta *Hibiscus rosa*. Dentre as espécies identificadas, 11 pertencem ao gênero *Candida*, e a linhagem que mais produziu xilitol (12,11 g/L em 72h, a partir de 50 g/L de xilose) foi uma *Candida tropicalis* [23].

Novas espécies de leveduras capazes de crescer e metabolizar xilose em hidrolisados de bagaço de cana foram identificadas. Como mostra Martini, et al [28], uma linhagem de *Meyerozyma guilliermondii* foi isolada de caldo de cana e foi capaz de assimilar toda a xilose e produzir xilitol, com rendimento máximo de $Y_{S/P} = 0,19$ g/g em hidrolisado de bagaço de cana. . Em outro trabalho, Martinez, et al [26], utilizaram parâmetros similares e observaram rendimento máximo de $Y_{S/P} = 0,57$ g/g [26].

Em outro estudo, Arruda, et al [25] realizaram a fermentação de hidrolisado de cana em biorreatores de bancada, utilizando a levedura *Candida guilliermondii*, levedura anamorfa à *Meyerozyma guilliermondii* [60], em condições de oxigênio limitado e obtiveram rendimento máximo de $Y_{S/P} = 0,69$ g/g [25].

2. OBJETIVOS:

2.1 Objetivo geral

Obter novas linhagens de leveduras naturalmente capazes de converter xilose em hidrolisado de biomassa de cana a xilitol.

2.2 Objetivos específicos

- Prospectar coleção microbiana para seleção de leveduras naturalmente capazes de fermentar xilose;
- Selecionar leveduras capazes de assimilar xilose e produzir xilitol;
- Selecionar leveduras capazes de fermentar xilose em hidrolisados de biomassa de cana;
- Avaliar a capacidade fermentativa das leveduras selecionadas em hidrolisado de biomassa de cana.

3. JUSTIFICATIVA

O Brasil possui grande diversidade de espécies microbianas com potencial biotecnológico, mas ainda inexploradas, tais como leveduras depositadas em bancos microbianos de diferentes biomas. A identificação e seleção de leveduras que são naturalmente capazes de fermentar C5 é vantajosa por não necessitar da obtenção de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) para a conversão de pentoses em produtos de interesse. Além disso, a exploração dessas leveduras abrirá novas opções de configuração do processo de produção, como também possibilitará a identificação de novas linhagens para a conversão de xilose. Nesse projeto, leveduras que são naturalmente capazes de consumir xilose, depositadas em bancos microbianos e de amostras ambientais, foram identificadas e selecionadas quanto à capacidade de crescimento e produção de xilitol.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Linhagens

As 960 leveduras utilizadas neste trabalho são provenientes da coleção microbiana de linhagens da Embrapa Agroenergia. Todas as linhagens foram isoladas em meio YM (descrito abaixo suplementado com xilana) a partir de amostras de solo, madeira em decomposição e vísceras de insetos, coletadas na Embrapa Cerrados, Brasília, Distrito Federal. Após isolamento, as leveduras foram crescidas em meio YM suplementado com xilana e armazenadas em freezer a -80°C , em placas de 96 poços (1,1 mL), denominadas JAP 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14. A Tabela 4 resume o local de isolamento das leveduras estocadas em cada placa.

Tabela 4. Origem das linhagens pertencentes ao banco microbiano da Embrapa Agroenergia

Código	Solo superficial ^a	Solo profundo ^a	Madeira ^b	Cupim ^c	Larva de inseto ^d
JAP – 5			X		
JAP – 6				X	
JAP – 7				X	
JAP – 8					X
JAP – 9					X
JAP – 10		X			
JAP – 11		X			
JAP – 12		X			
JAP – 13	X				
JAP – 14			X		

^aSolo superficial refere-se a amostras de solo retirado da superfície, logo abaixo de folhas e troncos de árvores, enquanto o profundo refere-se ao solo retirado a cerca 5 cm de profundidade; ^bmadeira em decomposição encontrada sob solo; ^c inseto adulto; ^d larvas de insetos encontrados em/sobre madeira em decomposição

4.1.2 Meios de cultura para leveduras:

YM:

- Glicose 10 g/L
- Extrato de levedura 3 g/L
- Peptona bacteriológica 5 g/L
- Extrato de malte 3 g/L

YPX:

- Extrato de levedura 1%
- Peptona bacteriológica 2%
- Xilose 2%

YPD:

- Extrato de levedura 1%
- Peptona bacteriológica 2%
- Glicose 2%

YPD ágar:

- Extrato de levedura 1%
- Peptona bacteriológica 2%
- Glicose 2%
- Ágar bacteriológico 2%

Meio YNB 10X (estoque):

- YNB: meio sintético YNB 1,7%
- Sulfato de amônia 5%

Hidrolisado C5 diluído 30%

- Centrifugar o Hidrolisado
- Filtrar o sobrenadante
- Ajustar o pH para 5,5
- Autoclavar
- Diluir para 30% em fluxo laminar

Composição do hidrolisado 100%

Tabela 5. Composição do hidrolisado utilizado.

Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Furfural (g/L)	5-HMF (g/L)
1,85	5,06	95,24	21,43	3,13	0,38

Meio Mineral:

- Solução de sais 10X
- Hidrolisado 30%
- Elementos traço
- Solução de vitaminas
- Ureia (4g/L)
- Xilose (40 g/L)
- Glicose (8 g/L)

4.1.3 Soluções

Solução de Elementos Traço (1000X - Concentração final para uso 0,25%)

- 1,5 g de EDTA dissódico (etilenodiamino tetracético) em 50 mL de H₂O.
- 0,45 g de sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄-7H₂O).
- Ajustar pH para 6,0
- Adicionar:
- Cloreto de manganês dihidratado (MnCl₂-2H₂O) 0,1 g
- Cloreto de cobalto hexahidratado (CoCl₂-6H₂O) 0,03 g
- Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄-5H₂O) 0,03 g
- Molibdato de sódio hidratado (Na₂MoO₄-H₂O) 0,04 g
- Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂-2H₂O) 0,45 g
- Sulfato de ferro heptahidratado (FeSO₄-7H₂O) 0,3g
- Ácido bórico (H₃BO₃) 0,1 g
- Iodeto de potássio (KI) 0,01 g

Solução de Vitaminas (1000X - Concentração final para uso 0,25%)

- Dissolver 0,005g de biotina em 1ml de NaOH 0,1M (hidróxido de sódio)
- 80mL de H₂O.
- Ajustar pH para 6,5 com HCl 1M/ NaOH 1M.
- Dissolver as seguintes vitaminas nas soluções de biotina, uma de cada vez.
- Ajustar o pH para 6,5 após cada adição:
- Pantotenato de cálcio ((C₉H₁₆NO₅)₂Ca) 0,1 g
- Niacina (C₆H₅NO₂) 0,1 g Inositol (C₆H₁₂O₆) 2,5 g
- Cloridrato de tiamina (C₁₂H₁₇ClN₄O₅) 0,1 g
- Cloridrato de piridoxina (C₈H₁₁NO₃) 0,1 g
- Ácido papa-aminobenzóico (C₇H₇NO₂) 0,02 g
- Riboflavina (C₁₇H₂₀N₄O₆) 0,02 g
- Ácido fólico (C₁₉H₁₉N₇O₆) 0,0002 g

- Ajustar volume para 100mL com água e pH = 6,5.
- Esterilizar por filtração com membrana Millipore 0,22 µm,
- Dividir o volume em tubos de 50mL.
- Armazenar na geladeira.

Solução de Sais (10X – Concentração final para uso 25%)

- Sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) 50 g/L
- Sulfato de magnésio (MgSO₄-7H₂O) 5 g/L
- Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 30 g/L

Fase móvel para HPLC (Cromatografia líquida de alta performance)

- Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 5mM
- Completar com água ultrapura

4.1.4 Protocolos

I) Extração de DNA total:

A extração de DNA total foi realizada de acordo com protocolo do Kit: Gentra Puregene Yeast/Bact.

II) Reação de Polimerase em Cadeia – PCR:

As PCRs para amplificação dos fragmentos da região D1/D2 de DNA ribossômico 26S foram realizadas seguindo os parâmetros descritos na Tabela 6. A sequência dos primers NL1/NL4 utilizados na reação estão apresentadas na Tabela 7 (item 4.1.4) e os parâmetros para a reação de PCR no termociclador, na Tabela 8 (item 4.1.5).

Tabela 6. Parâmetros para a realização de Reação de Polimerase em Cadeia.

Reagentes	Estoque	Concentração de uso	Volume da reação (µl)
Tampão	5X	1X	80
MgCl	25 mM	2,25 mM	24
Primer NL1	10 µM	0,2 µM	10
Primer NL4	10 µM	0,2 µM	10
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	8,0
Enzima Taq DNA polimerase	5 U/µL	2 U/µL	2,0
Template – DNA genômico	-	-	40*
Água Mili-Q	-	-	258
Total	-	-	400

4.1.4 Primers para amplificação da região D1/D2 do DNA ribossomal 26S de leveduras

Tabela 7. Sequência dos primers utilizados na PCR.

Nome	Sequência	Alvo	Referência
NL-1 5'-3'	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	rDNA	[60]
NL-4 3'-5'	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	rDNA	[60]

4.1.5 Condições de amplificação da região D1/D2 do DNA ribossômico 26S de leveduras

Tabela 8. Parâmetros para PCR em termociclador.

Desnaturação inicial	94°C por 5 minutos
35 ciclos	94°C por 30 segundos (desnaturação) 52°C por 1 minuto (anelamento dos primers) 72°C por 1 minuto (extensão da cadeia de nucleotídeos pela Taq DNA polimerase)
Extensão final	72°C por 10 minutos
Armazenamento	4°C
Referência	[60]

4.1.6 Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos fragmentos da região D1/D2 do DNA ribossômico 26S, amplificado através da reação de polimerase em cadeia – PCR - foi feita segundo o protocolo disponibilizado no kit Thermo Scientific – molecular biology, para que as sequências de DNA fossem enviadas para análise de sequenciamento pela empresa Eurofins Scientific.

4.1.7 Análise em gel de agarose

Tampão SB

- NaOH 0,8%
- Ácido Bórico 4,5%
- pH 8,0.

Brometo de etídio (EtBr)

- Brometo de etídio diluído em água ultrapura (concentração final 62,5 µg/mL).
- Concentração final de uso: 5µg/m

Gel de agarose 1%:

- 0,8g de agarose
- 70mL de tampão SB
- Dissolver em micro-ondas
- Resfriar o frasco até 60°C
- Adicionar aproximadamente 100 µL da solução de brometo de etídio xxx µg/M.

4.1.8 Armazenamento de linhagens

As leveduras utilizadas neste trabalho foram retiradas da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia e crescidas em meio YPD ágar. As linhagens selecionadas durante esse trabalho foram estocadas novamente em freezer -80°C. Para tanto, após crescimento em meio YPD, 0,625 mL da cultura foram colocados em tubos de criopreservação de 1,5 mL e misturados com 0,375 mL de glicerol 80 %.

4.1.9 Análises dos metabólitos por HPLC

Todas as alíquotas coletadas durante os experimentos foram analisadas em HPLC- UPLC Waters (AcQuity UPLC H Class) com a coluna Aminex HPX 87H. As amostras foram diluídas três vezes com água ultrapura, 10 µl de cada amostra foi injetado na coluna, já pré-aquecida à 45°C. A eluição foi feita com 5mM de H₂SO₄, com fluxo de 0,6 mL/min, durante 24 minutos. Os compostos foram monitorados por Detector do Índice de Refração e as concentrações foram calculadas por comparação com a área do pico obtido através de uma curva-padrão, contendo: glicose, xilose, xilitol, glicerol, acetato e etanol.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Prospecção de coleção microbiana para seleção de leveduras naturalmente capazes de consumir xilose

A seleção das leveduras foi realizada pela prospecção de 960 linhagens da coleção de microrganismos da Embrapa Agroenergia. Para que a capacidade de crescimento em meio mínimo contendo xilose fosse avaliada, as linhagens contidas em 10 placas de 96 poços (1,1 mL) denominadas JAP - 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 (Tabela 8 - Materiais), armazenadas em freezer

-80°C foram retiradas do estoque e inoculadas em 200 µL de meio YM suplementado com glicose 10 g/L e incubadas em estufa a 30°C por 24 h.

Posteriormente, as linhagens foram replicadas em 200 µL de meio YNB (1x) suplementado com xilose (40g/L). A transferência foi feita utilizando replicador de 96 pinos estéril (Boekel, USA). As placas foram incubadas a 30°C e o crescimento monitorado por medidas de densidade ótica (DO 600 nm) com o auxílio de um espectrofotômetro (SpectraMax M3, Molecular Devices).

Os dados coletados foram avaliados para quantificar a capacidade de crescimento de cada linhagem. Os experimentos foram feitos em duplicata biológica, como mostrado na Figura 5

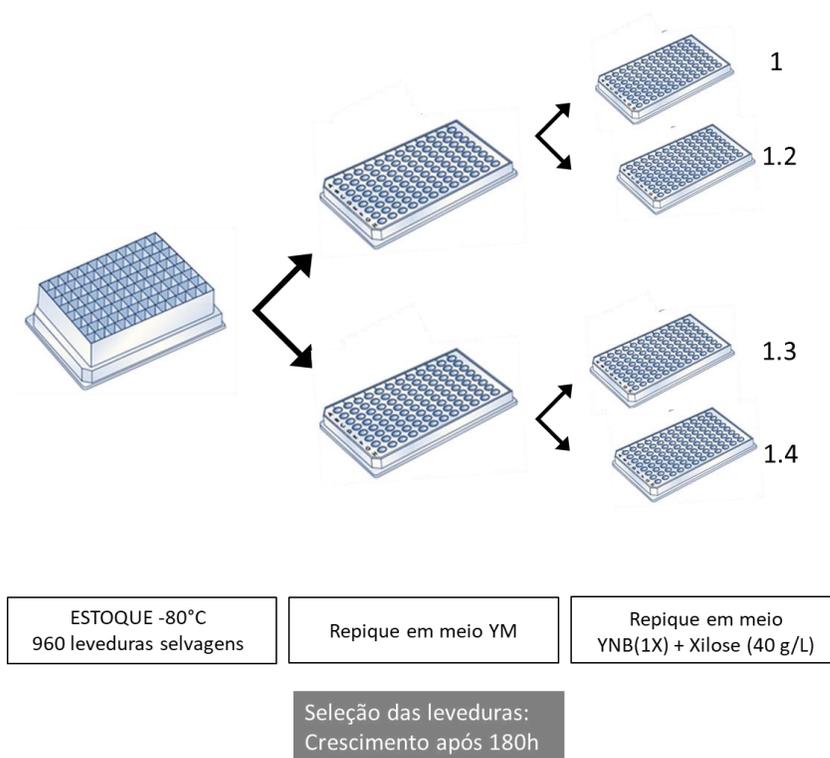


Figura 5. Esquema representando a metodologia utilizada nas prospecções iniciais.

Para realizar a seleção os seguintes critérios foram utilizados: i) identificação de linhagens que atingem DO_{600} nm mais altas, independentemente do tempo, ii) identificação de linhagens com crescimento mais rápido, ou seja, atinjam a fase estacionária mais rapidamente. Além disso, para garantir diversidade de origem e possivelmente genética das linhagens, leveduras de todas as placas foram selecionadas para os próximos experimentos. Esses critérios garantiram que leveduras com DOs altas e baixas fossem escolhidas

Gráficos contendo médias e desvios padrão de todas as replicatas foram feitos para tornar possível a seleção das linhagens conforme critérios estabelecidos.

4.2.2 Avaliação da capacidade fermentativa de leveduras em microescala

Para analisar a capacidade de conversão de xilose, as linhagens previamente escolhidas pelo crescimento nesse açúcar foram inoculadas em microplaca de 96 poços com 200 μ L de meio YM, e incubadas por 24h em estufa 30°C. Após o crescimento as leveduras foram repicadas utilizando repicador de 96 pinos estéril (Boekel, USA) em microplacas de 1,1mL e colocadas em estufa 30°C por 48h. Depois desse período as placas foram centrifugadas por 20 min a 3.800 x g e os sobrenadantes foram coletados para análise dos metabólitos produzidos pelas leveduras por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- HPLC.

Adicionalmente, foi realizado ensaio de fermentação de 40g/L de xilose utilizando uma maior densidade celular inicial. Para isso, colônias crescidas em placas de Petri com meio YPD, por 24h em estufa a 30°C, foram inoculadas em tubos de 50 mL contendo 10 mL de meio YNB 1x suplementado com 40 g/L de xilose. Os tubos foram colocados em shaker a 180 rpm, 28°C, depois de 24h os tubos foram centrifugados por 20 min a 3.800 x g, o sobrenadante foi descartado

e as células foram ressuspensas em 5 mL de água destilada autoclavada e centrifugadas novamente por 20 min a 3.800 x g.

Todo o *pellet* foi inoculado em 1 mL de meio YNB 1x suplementado com xilose 40 g/L em placa de 1,1 mL, o inóculo foi colocado em estufa a 28°C. Após 48h os sobrenadantes foram coletados e as concentrações dos metabólitos foram analisadas em HPLC.

4.2.3 Avaliação da capacidade fermentativa de leveduras em frasco, em condições de oxigênio limitado

As seis leveduras que apresentaram maior rendimento e consumo da fonte de carbono foram selecionadas para as próximas etapas de experimentos. Cada linhagem de levedura foi inoculada em um tubo de 50 mL contendo 7 mL de meio YNB suplementado com xilose 40 g/L. Tais tubos foram colocados no shaker, 180 rpm 28 °C por 24 h. Após o período de incubação as leveduras foram inoculadas em frascos de 100 mL contendo 50 mL de meio YNB suplementado com 40 g/L de xilose. O inóculo foi realizado com densidade ótica (DO 600 nm) inicial de 0,2, os frascos foram incubados em shaker a 180 rpm 28 °C. Alíquotas foram retiradas em intervalos regulares para mensuração de densidade ótica, consumo de açúcar e formação de produtos por HPLC.

Para a determinação do peso seco da biomassa celular, 5 mL ou 10 mL da cultura foram centrifugados por 15 min a 3.800 x g, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensado com 5mL de água destilada. A amostra foi centrifugada novamente seguindo o mesmo padrão anterior, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 1 mL de água destilada e colocado em fôrmas de alumínio. As fôrmas foram colocadas em estufa 60 °C durante 48 h. As mesmas foram pesadas em balança analítica antes e após o procedimento.

4.2.4 Identificação taxonômica e comparação filogenética das linhagens selecionadas

Para a identificação molecular, foi realizada a extração de DNA genômico, utilizando o protocolo proveniente do kit de extração de DNA genômico de levedura da Invitrogen. Após a extração, a região 26S do DNA ribossômico foi amplificada por PCR, utilizando os primers NL1 e NL4 (Figura 6). Os produtos de PCR foram purificados e enviados para a Empresa Eurofins Scientific para a realização do sequenciamento. Após o recebimento das sequências *forward* e *reverse* de cada amostra, a qualidade das mesmas foi checada pela análise dos esferogramas. Posteriormente, as sequências (formato Fasta, Anexo 1) foram alinhadas através dos programas BLAST pertencente ao banco de dados NCBI (Centro Nacional de Informação Biotecnológica) e do programa Geneious.

Após o alinhamento e confirmação de identidade entre as sequências de DNA e formação da sequência consenso, as duas sequências nucleotídicas (*forward* e *reverse*), da região D1/D2 de cada levedura, foram comparadas com as sequências da região D1/D2 das linhagens pertencentes aos bancos de dados NCBI e CBS-KNAW Collections para identificação taxonômica.

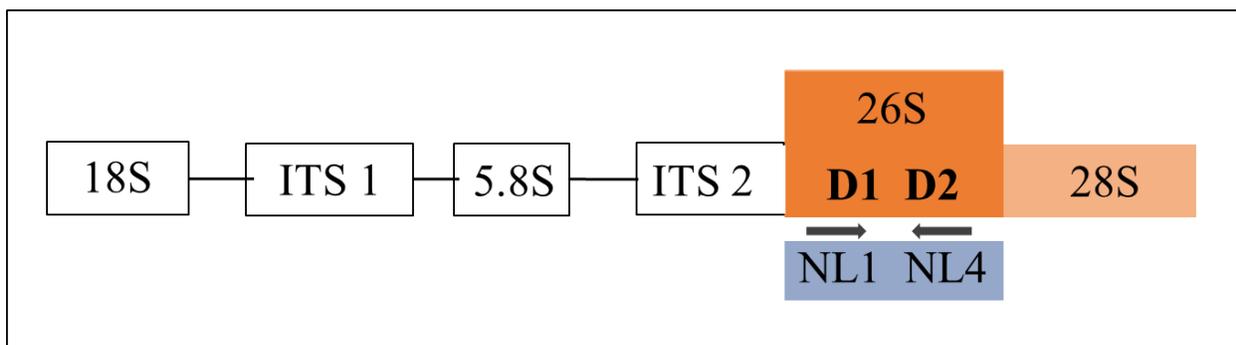


Figura 6. Esquema representativo da região conservada D1/D2 do DNA ribossômico 26S de leveduras.

Para a construção de árvore filogenética contendo as linhagens selecionadas foram utilizadas as sequências consenso da região D1/D2 de cada levedura, formadas através do programa Geneious, assim como das leveduras padrões *M. guilliermondii* NRRL Y-2075, *M. guilliermondii* ZGE34B e *M. caribbica* NRRL Y-27274, coletadas no banco de dados NCBI. O grupo externo designado foi o domínio conservado D1/D2 da sequência de DNA ribossômico 26S da levedura *Candida tenuis*, também retirada do banco de dados NCBI. A Árvore filogenética foi montada através do software Geneious seguindo o modelo *Jukes-Cantor*, com parâmetros *neighbor-joining*, 1.000 *bootstraps*, 847,488 *random seeds*, *support treshold* 50 %.

4.2.5 Avaliação da capacidade fermentativa e produção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar

I) Avaliação da cinética fermentativa em frasco

O desempenho da levedura *Meyerozyma guilliermondii* B12 em hidrolisado, selecionada nesse estudo, foi comparado com as linhagens *Spathaspora* sp. JA1, *Wickerhamomyces anomalus* 740, *Meyerozyma guilliermondii* A3 (pertencentes a coleção de leveduras da Embrapa Agroenergia, dados não publicados) e uma linhagem controle *Meyerozyma guilliermondii* Y-324 obtida do ARS *Culture Collection* (NRRL), Estados Unidos.

Para realizar esse processo fermentativo, foi feito um pré inóculo de 50 mL em YPX em frasco aletado de 500 mL, durante 72 h, a 28 °C e 180 rpm. Para o inóculo, a DO600 nm inicial foi estabelecida entre 15 e 20, o meio utilizado foi de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar diluído para 30%, sem suplementação de fontes de carbono ou nitrogênio.

As leveduras foram inoculadas em 100 mL de meio de cultura em frasco de 500 mL e o experimento foi acompanhado por 72h. Para o peso seco, foram coletados 5 mL da cultura de inoculo do experimento e 5 mL ao final do período de cultivo. Uma alíquota por dia foi coletada para aferir crescimento e consumo de açúcares e formação de metabólitos.

Após as análises *in silico* dos resultados, as leveduras *M. guilliermondii* B12, *M. guilliermondii* A3 e *Meyerozyma guilliermondii* controle, foram submetidas a mais um processo fermentativo em frasco (Tabela 9), desta vez em triplicata técnica, contendo hidrolisado 30%, suplementado com glicose (10 g/L) e ureia (4 g/L) (Meio Mineral).

Para este experimento, foi realizado um pré inoculo em frascos de 1 L, contendo 300 mL de meio YPX, os frascos foram incubados em *shaker* à 30°C, 180 rpm, por 24h. Após este período, alíquotas foram coletadas para iniciar o experimento. As leveduras foram inoculadas com DO de 20 em frascos de 125mL, contendo 40mL de Meio Mineral, e os frascos foram colocados em shaker a 30°C, 180rpm por 96h. Alíquotas de 1 mL foram coletadas 3 vezes ao dia para análises de crescimento e dos metabólitos formados em espectrofotômetro e HPLC, respectivamente.

Para cálculos de peso seco e biomassa, alíquotas de 5mL foram retiradas ao final do pré inoculo e ao final da fermentação, ressuspensas em 1mL de água destilada e deixadas em estufa à 60 °C por 72 h. Esse procedimento foi realizado em duplicata.

II) Avaliação da cinética fermentativa em biorreator

O desempenho das leveduras *M. guilliermondii* B12, *Spathaspora* sp. JA1 e *W. anomalus* 740 também foi comparado em fermentação de xilose/hidrolisado em biorreator em condições aeróbica e de oxigênio limitado.

Para iniciar a fermentação, foram feitos pré-inóculos em frascos de 1 L, contendo 150 mL de meio YPD, os frascos foram colocados em shaker, à 30 °C e 180 rpm, por 24 h. Após esse período, a densidade óptica de cada meio foi medida.

Os experimentos foram realizados em 500 mL de meio mineral contendo hidrolisado 30 %, 10 g/L de glicose, 10 g/L de ureia e 40 g/L de xilose, no fermentador Multifors (Infors Suíça) em vaso de 1 L. A DO600 nm inicial do inóculo foi igualada a 1 em todas as amostras, para padronizar a densidade celular inicial no biorreator. O primeiro processo fermentativo foi realizado em condições aeróbicas (0,8 v.min⁻¹, 400 rpm, 28°C e pH 5,5), durante 96 h. O segundo, foi feito sob condição de oxigênio limitado (0,2 v.min⁻¹, 400 rpm, 28°C e pH 5,5), durante 62h. Os experimentos foram realizados em duplicata biológica. Alíquotas de 2 mL foram retiradas 4 vezes ao dia para leitura de densidade óptica em espectrofotômetro e análise cromatográfica em HPLC.

Os procedimentos para realização de peso seco, seguiram os mesmos padrões já abordados no tópico acima.

5. RESULTADOS

5.1 Prospecção

Com o intuito de selecionar leveduras com capacidade de metabolizar xilose, 960 leveduras pertencentes à coleção da Embrapa Agroenergia foram prospectadas pela capacidade crescimento em meio mínimo contendo xilose (40 g/L) como única fonte de carbono. Para tanto, acompanhou-se o crescimento das leveduras através de análises de densidade óptica, medida três vezes ao dia, durante sete dias (180 h) (Figura 7).

Entre as 960 linhagens prospectadas, aproximadamente 90% foram capazes de assimilar xilose. Resultados representativos das curvas de crescimento obtidas são mostrados na Figura 7. O crescimento se mostra variado, algumas leveduras cresceram rapidamente, entretanto, não atingiram DOs relativamente altas, quando comparadas a outras que cresceram lentamente.

Cada uma das 10 placas da coleção foi replicada em duplicata biológica, a DO_{600} nm de cada linhagem foi checada e comparada com média e desvio padrão. Após a análise de crescimento de todas as 960 leveduras e suas respectivas replicatas, as 42 linhagens que melhor cresceram foram selecionadas. Dentre essas, 9 foram isoladas de amostras de cupim, 10 vieram de larvas de inseto, 13 de solo profundo, 5 de solo superficial e 5 de madeira em decomposição (Figura 8).

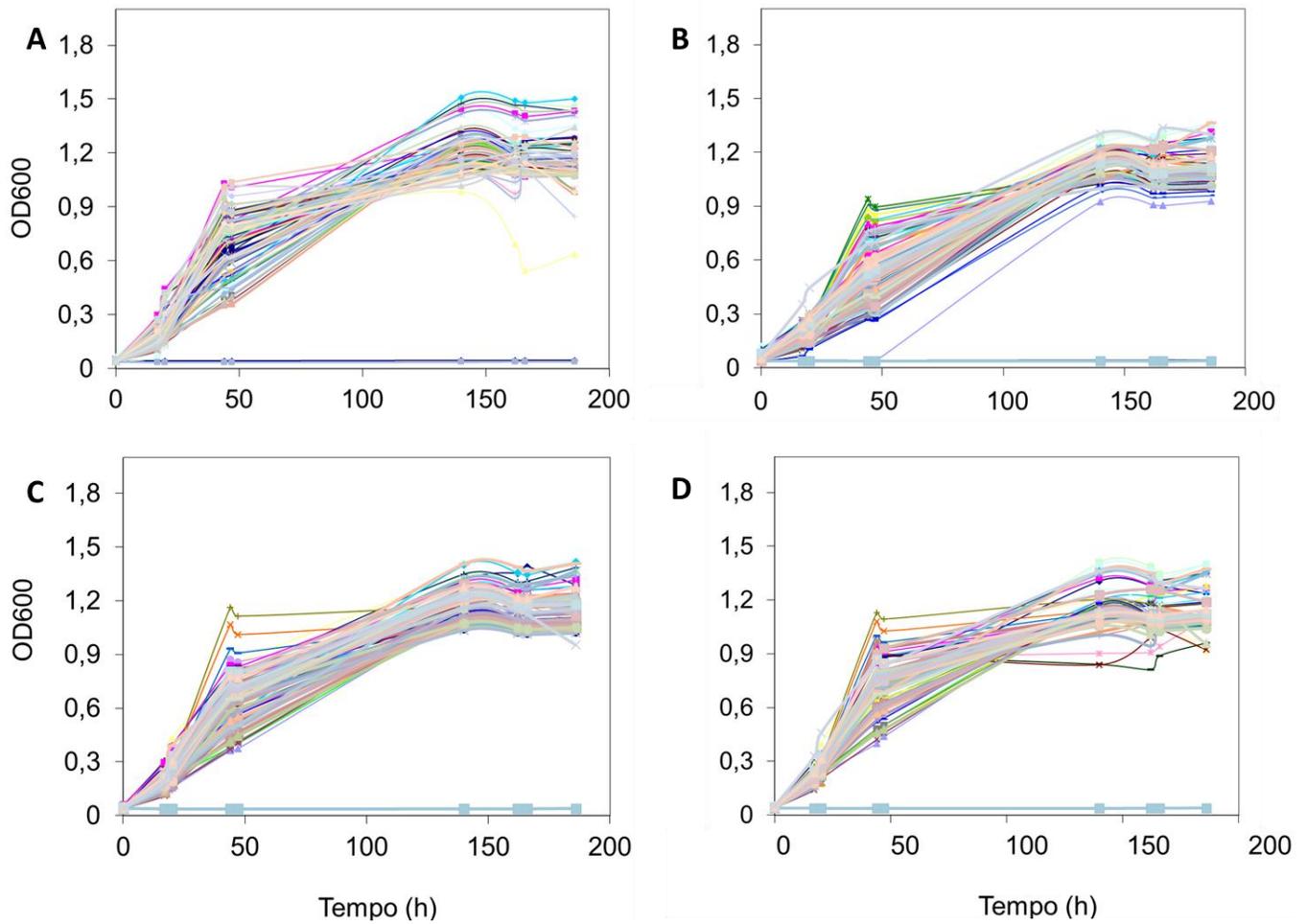


Figura 7. Curva de crescimento de leveduras em meio mínimo (YNB) suplementado com xilose (40 g/L) em microplacas de 96 poços. Cada linha representa o crescimento de uma linhagem de levedura. (A) placa JAP14— Replica 1; (B) placa JAP14- replica 2; (C) placa JAP14- replica 3; (D) placa JAP14 replica 4.

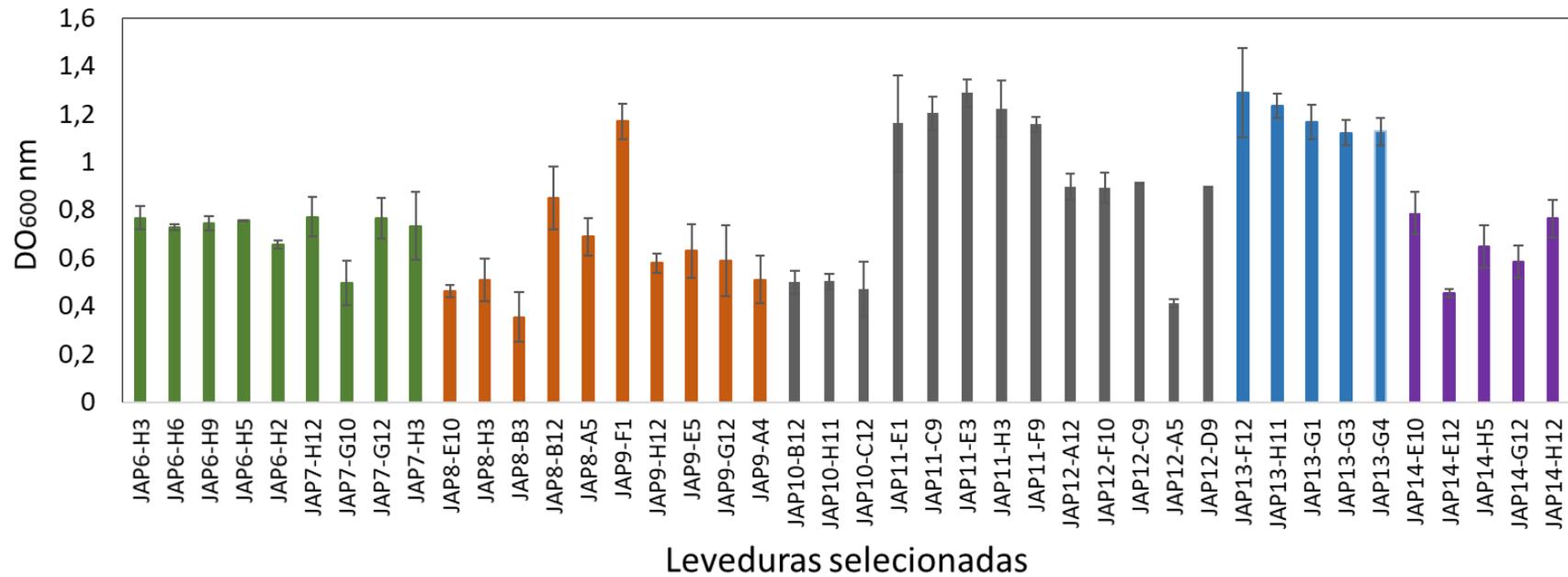


Figura 8. Média e desvio padrão do crescimento máximo das quatro réplicas das 42 leveduras previamente selecionadas dentre todas as 960, em YNB 1X suplementado com xilose (40 g/L). OD600 nm medido após 180h de crescimento. Leveduras isoladas de cupim (verde), larva de inseto (laranja), solo profundo (cinza), solo superficial (azul), madeira (roxo).

5.2 Seleção das leveduras capazes de produzir xilitol

A fim de analisar o consumo de xilose juntamente com a produção de xilitol, as 42 linhagens previamente selecionadas (Figura 8) foram inoculadas em placas Deepwell de 1,1 mL contendo YNB (1X) suplementado com xilose (40 g/L). Após 48h os sobrenadantes das culturas foram coletados e o consumo de xilose e produção de xilitol analisados em HPLC. O consumo máximo de xilose foi de 20 g/L e dentre as 42 leveduras selecionadas, 41 foram capazes de produzir quantidades detectáveis de xilitol (Figura 9).

As 8 leveduras que mais consumiram xilose e produziram maiores quantidades de xilitol foram isoladas de diferentes tipos de amostras, dentre as quais, quatro foram provenientes de cupim, duas de larvas de insetos, uma de solo profundo e uma de madeira em decomposição (Tabela 9). Essas leveduras foram selecionadas para realizar um processo fermentativo com maior densidade celular, para que fosse possível detectar a produção de xilitol em maior concentração.

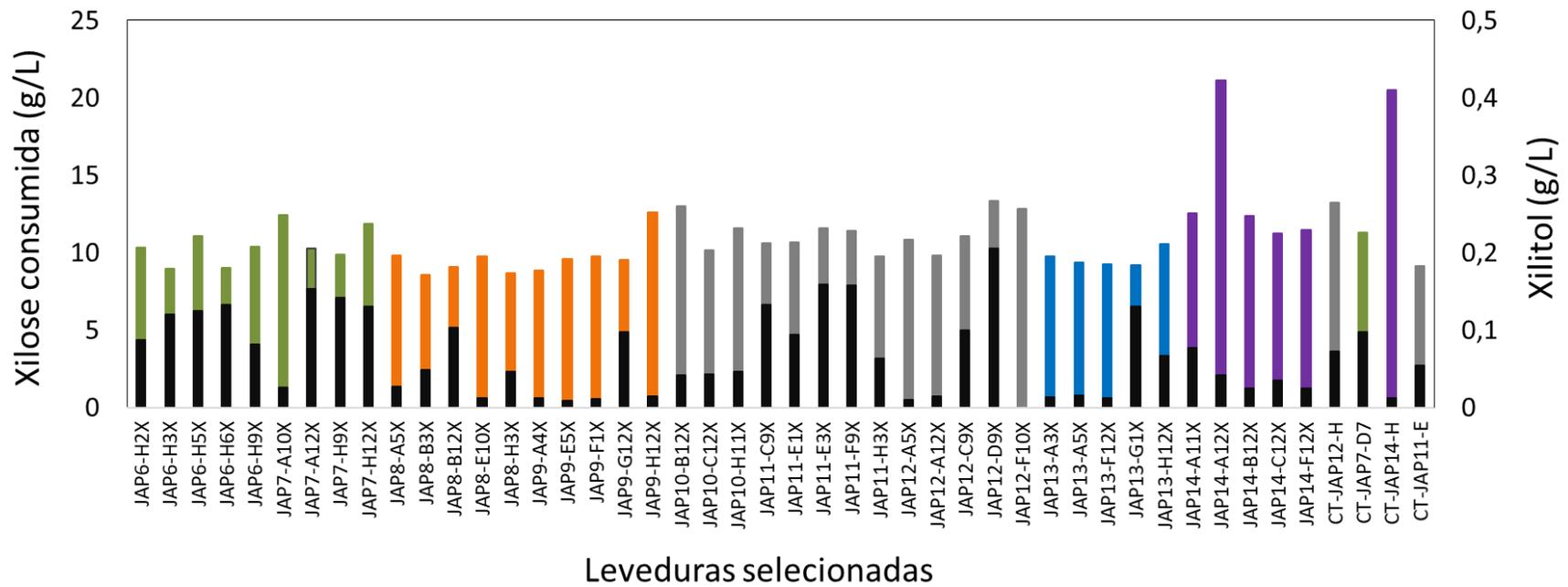


Figura 9. Consumo de xilose e produção de xilitol (g/L), realizados pelas leveduras previamente selecionadas. Xilose consumida (barras coloridas); xilitol produzido (barra preta); Leveduras isoladas de cupim (verde), larva de inseto (laranja), solo profundo (cinza), solo superficial (azul), madeira (roxo).

Tabela 9. Melhores leveduras consumidoras de xilose e produtoras de xilitol.

Código do microrganismo	Origem da amostra	Consumo de Xilose (g/L)	Produção de xilitol (g/L)
JAP 6 – H2	Cupim	10,34	0,09
JAP 6 – H5	Cupim	11,06	0,13
JAP 6 – H9	Cupim	10,37	0,08
JAP 9 – G12	Larva de inseto	9,52	0,09
JAP 7 – H12	Cupim	11,89	0,13
JAP 8 – B12	Larva de inseto	9,09	0,11
JAP 12 – D9	Solo profundo	13,36	0,21
JAP 14 – A12	Madeira em decomposição	21,15	0,04

Nesse experimento, 7 mL do pré inoculo foi centrifugado e todo o pellet foi inoculado no meio fermentativo contendo xilose 40g/L, com OD inicial de 0,2. Após 72h de fermentação em placa Deepwell (1,1 mL), a levedura JAP 14 – A12 que foi isolada de madeira em decomposição, apresentou o melhor consumo de xilose (8 g/L) e produção de xilitol (6 g/L) (Figura 10, Tabela 10). Apenas duas leveduras, D9 e H12, as únicas isoladas de amostras de solo e madeira em decomposição, não apresentaram rendimentos superiores a $Y = 0,50$ g/g, e, portanto, foram excluídas das próximas etapas experimentais (Tabela 10). As outras 6 linhagens apresentaram bons valores de rendimento de xilitol, os quais variaram de 0,12 a 0,74 g/g (Tabela 10) e também produziram traços de etanol nas condições testadas.

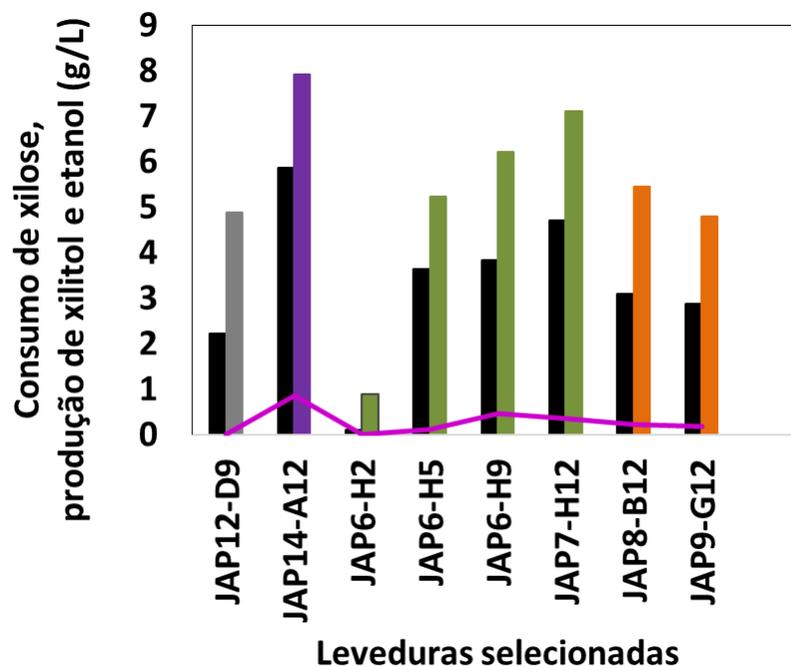


Figura 10. Consumo de xilose e produção de xilitol e etanol pelas leveduras previamente selecionadas. Xilose consumida (barras coloridas); produção de xilitol (barra preta); produção de etanol (linha rosa). Leveduras isoladas de cupim (verde), larva de inseto (laranja), solo profundo (cinza), madeira (roxo).

Tabela 10. Valores máximos de rendimento alcançados na fermentação de xilose (40 g/L) em microplaca; em condição oxigênio limitado.

Levedura	Produção de xilitol (g/L)	Y (gxilitol/gxil. Consumida)	Produção de etanol (g/L)	Y (getanol/gxil. Consumida)
A12	5,88	0,74	0,87	0,11
B12	3,10	0,57	0,22	0,04
G12	2,87	0,59	0,18	0,04
H5	3,63	0,69	0,13	0,02
H9	3,84	0,61	0,47	0,08
H12	4,71	0,66	0,36	0,05
D9	2,22	0,45	0,00	-
H2	0,11	0,12	0,00	-

5.3 Avaliação da cinética fermentativa

A partir dos resultados obtidos anteriormente, as seis leveduras (A12, B12, G12, H5, H9 e H12) que apresentaram maior consumo de xilose e consequente produção de xilitol foram selecionadas para avaliação em fermentação micro-aeróbica. Dentre as leveduras selecionadas, a H5, H9 e H12 foram isoladas de vísceras de cupim, B12 e G12 de larvas de insetos e a A12 de madeira em decomposição.

Em condições de micro-aerobiose, todas as linhagens apresentaram cinéticas fermentativas semelhantes, destacando-se a produção de xilitol e biomassa como principais produtos da conversão de xilose (Figura 11). Não houve produção significativa de etanol. Todas as 6 leveduras consumiram cerca de 30g/L de xilose em 72 horas e produziram principalmente biomassa celular e xilitol. As linhagens B12, A12, G12 e H12 foram as melhores produtoras de xilitol, com a produção de aproximadamente 15 g/L. Não houve produção significativa de etanol (Figura 11). Apenas a linhagem H9 não apresentou rendimento de produção de xilitol em relação ao consumo de xilose, acima de $Y = 0,4$ g/g, como mostrado na Tabela 11.

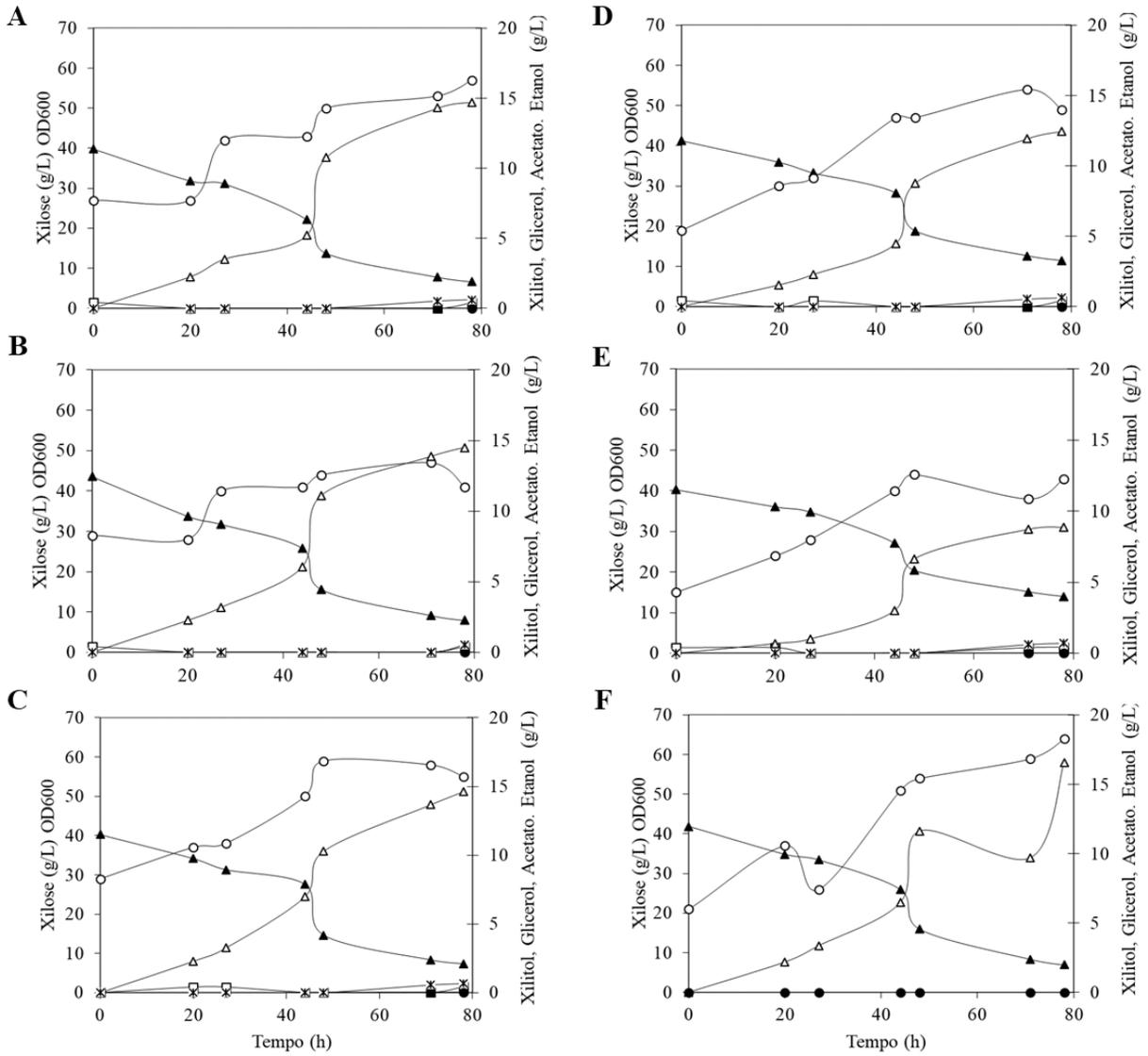


Figura 11. Fermentação de meio definido YNB suplementado com Xilose (40 g/L), em condição micro-aeróbica, realizada pelas leveduras (A) A12; (B) B12; (C) G12; (D) H5; (E) H9; (F) H12. Xilose (▲), Xilitol (△), Etanol (□), OD (○).

Tabela 11. Valores máximos de rendimento alcançados na fermentação de Xilose 40 g/L em frasco; em condição aeróbica.

Microrganismo	Produção de xilitol (g/L)	Y (g _{xilitol} /g _{xil. Consumida})
A12	14,71	0,42
B12	14,50	0,43
G12	14,61	0,43
H5	12,44	0,41
H9	8,84	0,32
H12	16,56	0,47

A partir dos resultados obtidos, a levedura *Meyerozyma guilliermondii* B12, isolada de larvas de insetos, foi selecionada como melhor produtora de xilitol dentre as 960 prospectadas.

5.4 Identificação taxonômica das leveduras

Para identificação molecular das 6 linhagens selecionadas, o fragmento correspondente à região D1/D2 do DNA ribossomal 26S foi amplificado por PCR. Conforme esperado, um fragmento com tamanho esperado de aproximadamente 680 pares de base foi obtido (Figura 12).

Os fragmentos de DNA obtidos foram sequenciados e as sequências obtidas foram comparadas por similaridade em banco de dados NCBI e CBS-KNAW *Collections* descritos em Materiais e Métodos. Todas as linhagens identificadas se mostraram como do gênero *Meyerozyma*. O que não é incomum, pois, leveduras do gênero *Meyerozyma* são maioria em amostras de intestino de insetos e solo [35]. Não foi possível diferenciar a levedura G12, da qual foram obtidos resultados taxonômicos para as espécies: *M. guilliermondii* e *M. caribica*, com 99% de identidade (Tabela 12). A Tabela 12, resume o resultado da identificação das 6 leveduras, evidenciando os principais hits no banco de dados NCBI.

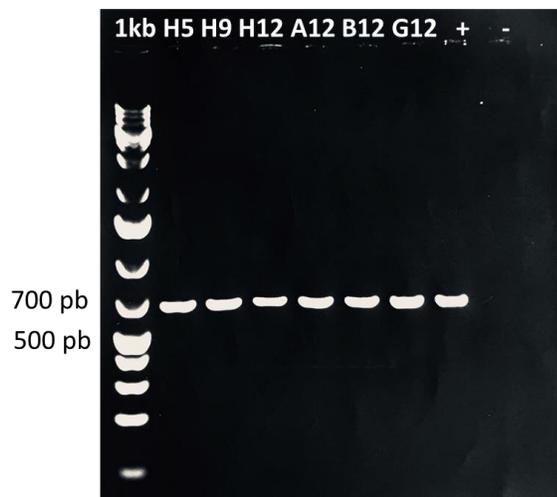


Figura 12. Análise eletroforética em gel de agarose para confirmação da amplificação do fragmento de DNA da região 26S do DNA riossomal das leveduras (~680 pb). O marcador utilizado foi o 1 kb *plus DNA ladder*.

Tabela 12. Identificação taxonômica das leveduras selecionadas.

Código	Levedura	ID da sequência	Identidade
A12	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> MSRY_19	KY952849.1	100%
B12	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> MSRY_19	KY952849.1	100%
G12	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> N2-1	MF148904.1	99%
	<i>Meyerozyma caribbica</i>	KX507035.1	99%
H5	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> DGC-G-z	MG518185.1	100%
H9	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> 2A-1C315III	MG736036.1	100%
H12	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> MSRY_19	KY952849.1	100%

A Figura 13 apresenta a árvore filogenética comparativa entre as espécies de *Meyerozyma* identificadas neste trabalho e outras linhagens de *M. guilliermondii* presentes em banco de dados (NCBI e CBS-KNAW *Collections*), como descrito em Materiais e Métodos. Conforme mostrado na Figura 13, apesar de pertencerem a mesma espécie existe certo grau de polimorfismo nas linhagens selecionadas.

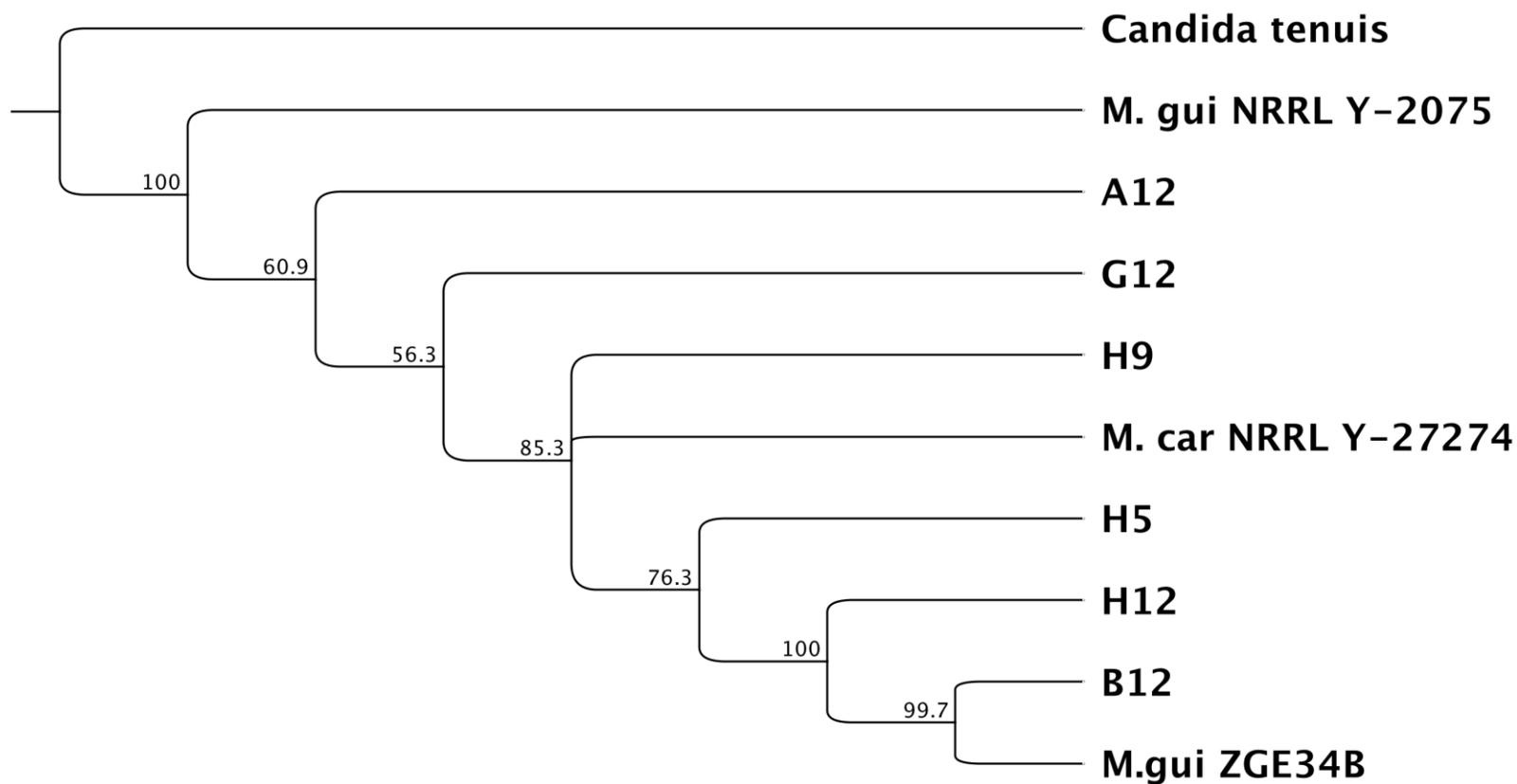


Figura 13. Relações filogenéticas entre as linhagens das leveduras selecionadas neste trabalho e outras linhagens de *M. guilliermondii* presentes em bancos de dados (NCBI e CBS-KNAW *Collections*). Sequências nucleotídicas do domínio D1/D2 do DNA ribossômico 26S das leveduras selecionadas, foram alinhadas e comparadas com o microrganismo escolhido para o grupo externo, *Candida tenuis*. Árvore filogenética foi montada através do software Geneious seguindo o modelo Jukes-Cantor com parâmetros *Neighbor-joining*, 1.000 *bootstraps*, 847,488 *random seeds*, *support treshold* 50 %. *M. gui* (*M. guilliermondii*), *M. car* (*M. caribbica*).

5.5 Avaliação da cinética fermentativa em hidrolisado

O desempenho fermentativo da linhagem *M. guilliermondii* B12 em hidrolisado de biomassa de cana foi comparado com outras quatro linhagens de leveduras produtoras de xilitol. Três leveduras previamente caracterizadas como boas produtoras de xilitol (não publicado) pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Genética e Biotecnologia da Embrapa Agroenergia: *Spathaspora* sp. A1; *Wickerhamomyces anomalus* 740, *M. guilliermondii* A3; e com a linhagem controle *M. guilliermondii* Y-324 (Tabela 13). Para tanto, o crescimento e a cinética fermentativa dessas leveduras foram avaliados em hidrolisado sem suplementação.

As 5 linhagens apresentaram cinéticas fermentativas muito semelhantes, foram capazes de consumir pouco mais de 10 g/L de xilose e, a produção máxima de xilitol chegou a 4 g/L. A levedura que apresentou a maior produção de xilitol foi a *Spathaspora* sp. JA1 (4 g/L), seguida pela *W. anomalus* 740, *M. guilliermondii* Y-324 controle positivo e *M. guilliermondii* B12. A *M. guilliermondii* A3 ficou por último, com a menor produção de xilitol, que atingiu menos de 2 g/L. O perfil fermentativo para cada linhagem é apresentado na Figura 14.

Apesar de a *M. guilliermondii* B12 e a *M. guilliermondii* A3 não terem se destacado na produção de xilitol, elas, juntamente com o controle positivo (*M. guilliermondii* Y-324) foram as linhagens que melhor assimilaram a xilose nessa avaliação fermentativa, consumindo 8,5 g/L, 9 g/L e 10 g/L, respectivamente. Todas as leveduras consumiram o ácido acético presente no meio, a linhagem Controle consumiu todo o acetato e as linhagens *M. guilliermondii* B12 e A1, chegaram a consumir mais de 4 g/L (Figura 14).

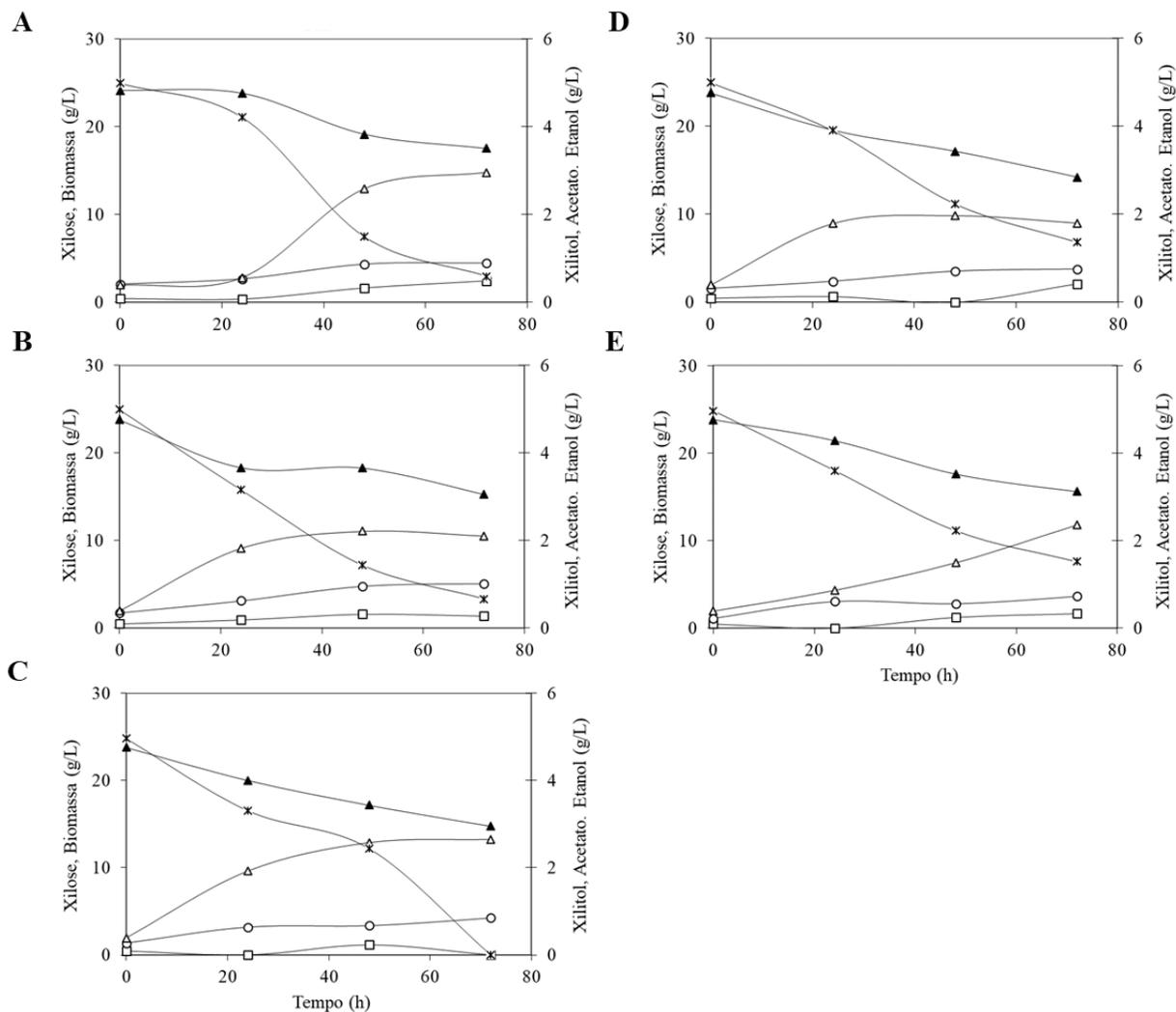


Figura 14. Fermentação de hidrolisado 30% em condição de oxigênio limitado, realizada pelas leveduras (A) *Spathaspora* sp. JA1, (B) *M. guilliermondii* B12, (C) *M. guilliermondii* Controle positivo, (D) *M. guilliermondii* A3 (E) *W. anomalus* 740, em frasco. Xilose (▲), Xilitol (△), Etanol (□), Biomassa (○), Acetato (x).

Tabela 13. Valores máximos de rendimento (48h) e produtividade específica (48h) da fermentação de hidrolisado 30% sem suplementação, em frasco.; em condições aeróbicas.

Microrganismo	Produção de xilitol (g/L)	Y (g _{xilitol} /g _{xil. Consumida})	P(g./g.h ⁻¹)	Produção de etanol (g/L)	Y (g _{etanol} /g _{xil. Consumida})
<i>Spathaspora sp.</i> A1	2,961	0,519	0,012	2,454	0,330
<i>M. guilliermondii</i> A3	1,962	0,420	0,031	2,085	0,217
<i>M. guilliermondii</i> B12	2,211	0,401	0,024	1,587	0,288
<i>W. anomalus</i> 740	2,361	0,364	0,012	1,650	0,199
<i>M. guilliermondii</i> Y-324	2,646	0,509	0,025	1,161	0,176
Controle +					

Houve uma pequena produção de etanol, sendo 2,454 g/L o valor máximo produzido pela linhagem *Spathaspora sp.* A1, seguido por 2,085 g/L produzido pela *M. guilliermondii* A3. As leveduras *W. anomalus* 740, *M. guilliermondii* B12 e *M. guilliermondii* Y-324 Controle produziram quantidades muito similares de etanol, 1,650 g/L, 1,587 g/L e 1,161 g/L, respectivamente (Figura 14, Tabela 14).

As leveduras apresentaram bons valores de rendimento em hidrolisado, levando em consideração sua elevada acidez (5 g/L de ácido acético). A linhagem *Spathaspora sp.* JA1 foi capaz de atingir rendimento máximo de Y = 0,519 g/g. A linhagem *M. guilliermondii* A3 apresentou o maior valor de produtividade, sendo P = 0,031 g.L.h⁻¹, seguida pelas linhagens *M. guilliermondii* Y-324 Controle P = 0,025 g.L.h⁻¹ e *M. guilliermondii* B12 = 0,024 g.L.h⁻¹.

5.6 Avaliação da cinética fermentativa em biorreator

As leveduras *M. guilliermondii* B12, *Spathaspora* sp. JA1 e *W. anomalus* 740 foram submetidas à fermentação em biorreator, utilizando duas condições de processos fermentativos em batelada: aeróbica e com oxigênio limitado.

Em condições aeróbicas (fluxo de ar comprimido de 0,8 L/min) e meio contendo hidrolisado 30% suplementado com xilose (40 g/L) e ureia (4 g/L) (Figura 15). As três linhagens consumiram toda a xilose antes de 80 h; e produziram principalmente biomassa celular (Figura 15).

A linhagem *M. guilliermondii* B12 consumiu toda a xilose rapidamente e, direcionou quase toda a fonte de carbono para crescimento celular, que atingiu quase 30 g/L; e produziu 5 g/L de xilitol (Figura 15 A, Tabela 14). A levedura *W. anomalus* 740 começou a consumir a xilose muito lentamente, mas apesar da demora para se adaptar ao meio, assimilou toda a pentose, e a sua produção de xilitol e biomassa foram, respectivamente, de aproximadamente 4 g/L e 16 g/L (Figura 15 C, Tabela 14).

O acúmulo de xilitol não é favorecido em condições aeróbicas, mesmo assim a levedura *Spathaspora* sp. JA1 (Figura 15 B) produziu quase 20 g/L de xilitol, com rendimento e produtividade máximos de $Y = 0,58$ g/g e $P = 0,056$ g/h⁻¹, respectivamente (Tabela 14). Ela consumiu a xilose rapidamente, a partir do momento em que toda a pentose foi consumida (50h), ela começou a metabolizar o xilitol acumulado e o converter em biomassa. Ao final da fermentação, a levedura consumiu toda a xilose e sobrou apenas 0,3 g/L de xilitol.

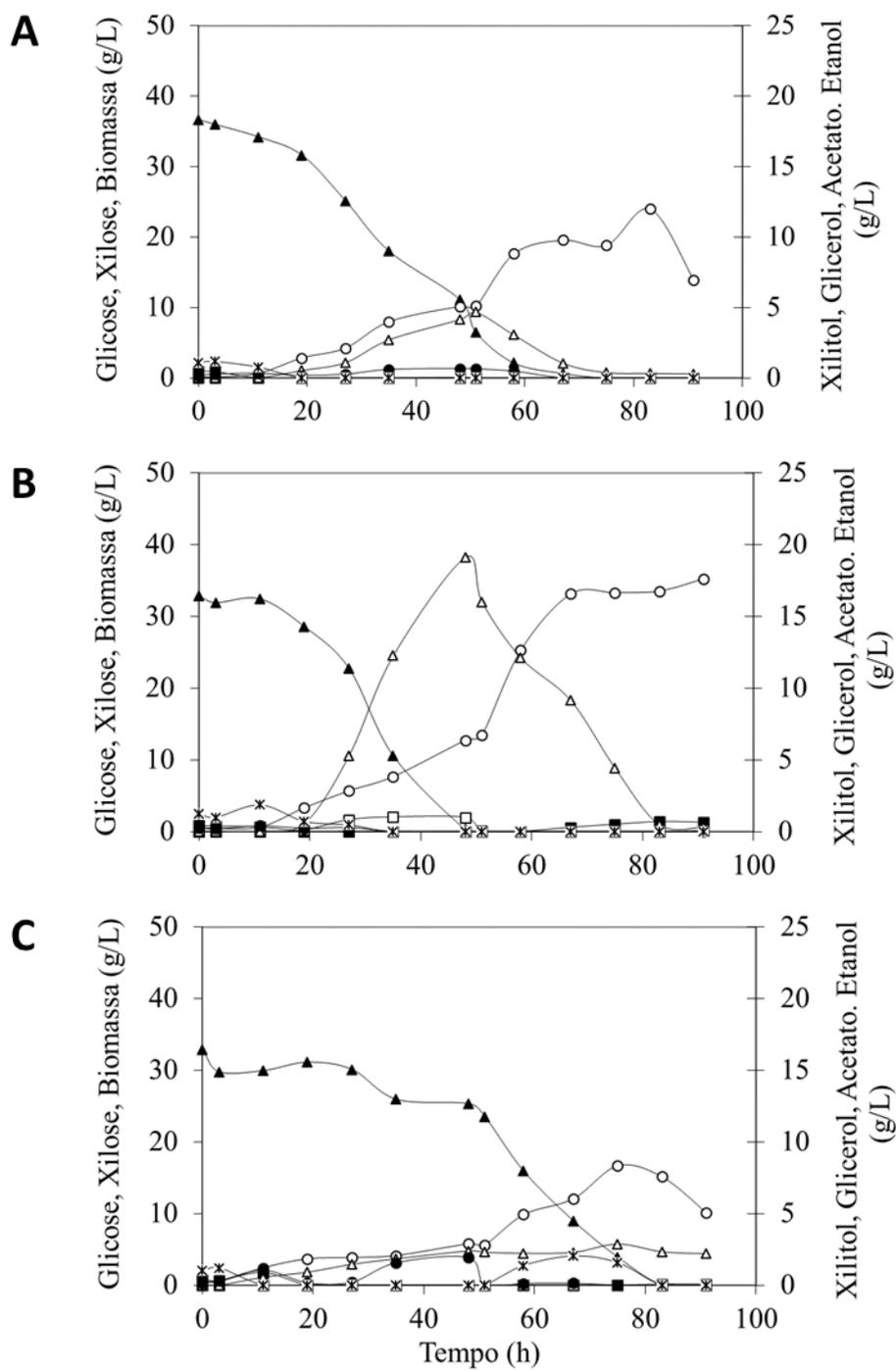


Figura 15. Fermentação de hidrolisado 30% em condição aeróbica, realizada pelas leveduras (A) *M. guilliermondii* B12, (B) *Spathaspora* sp.JA1, (C) *W. anomalus* 740, em biorreator. Xilose (▲), Xilitol (△), Glicose (■), Etanol (□), Acetato (x), Biomassa (O).

Tabela 14. Valores máximos de rendimento e produtividade (48h) da fermentação de hidrolisado 30%, em duplicata em biorreator; em condições aeróbicas.

Microrganismo	Produção de xilitol (g/L)	Y (g _{xilitol} /g _{xil. Consumida})	P(g/.h ⁻¹)
<i>M. guilliermondii</i> B12	3,402 ± 1,278	0,143 ± 0,003	0,005 ± 0,003
<i>Spathaspora sp.</i> A1	21,391± 5,398	0,589 ± 0,096	0,056 ± 0,011
<i>W. anomalus</i> 740	3,312 ± 0,924	0,382 ± 0,117	0,022 ± 0,009

Posteriormente, o perfil fermentativo das leveduras foi comparado em condição de oxigênio limitado (0,2 v/min), em hidrolisado 30 %, suplementado com xilose (40 g/L), glicose (10 g/L) e Ureia (4 g/L). Todas as leveduras consumiram a glicose em pouco mais de 10h de fermentação, o que pode justificar a produção de 5,2 g/L de etanol pela leveduras *Spathaspora sp.* JA1(Figura 16) (Tabela 15), a qual não foi observada na fermentação em batelada aeróbica (Figura 15).

Quando a glicose acabou, as leveduras começaram a consumir a xilose mais rapidamente, tendo seu ponto máximo às 50h, no qual, a linhagem B12 produziu 5 g/L de xilitol e a A1 produziu 21 g/L. A linhagem *W. anomalus* 740 chegou a produzir quase 25 g/L de xilitol nesse processo fermentativo. Dessa forma, ficou evidente o efeito benéfico da presença de glicose no meio para a assimilação de xilose por parte dessa levedura.

Apenas as leveduras *Spathaspora sp.* JA1 e a *W. anomalus* 740 foram capazes de consumir toda a xilose em condições microaeróbicas. Após as 50h não havia mais fonte de carbono no meio, contudo, a concentração de xilitol começou a diminuir, sugerindo que as leveduras começam a assimilar o xilitol na ausência de outras fontes de carbono disponíveis (Figura 16).

Conforme esperado, apesar do consumo da xilose, as linhagens não produziram quantidades de biomassa tão altas quanto em condições de aerobiose. A levedura *W. anomalus* 740 foi a que mais cresceu, chegando a quase 15 g/L de células, seguida pela *Spathaspora* sp. JA1 e *M. guilliermondii* B12, que produziram 12 g/L e 10 g/L, respectivamente (Figura 16).

A linhagem *M. guilliermondii* B12 apresentou perfil fermentativo diferente das outras, passou mais tempo se adaptando ao meio, começou a consumir xilose mais rapidamente a partir das 40 h, e assimilou 20 g/L até o fim do processo fermentativo (Figura 16). Enquanto as linhagens *Spathaspora* sp. JA1 e *W. anomalus* 740, apresentaram perfis semelhantes, no qual consumiram rapidamente toda a xilose.

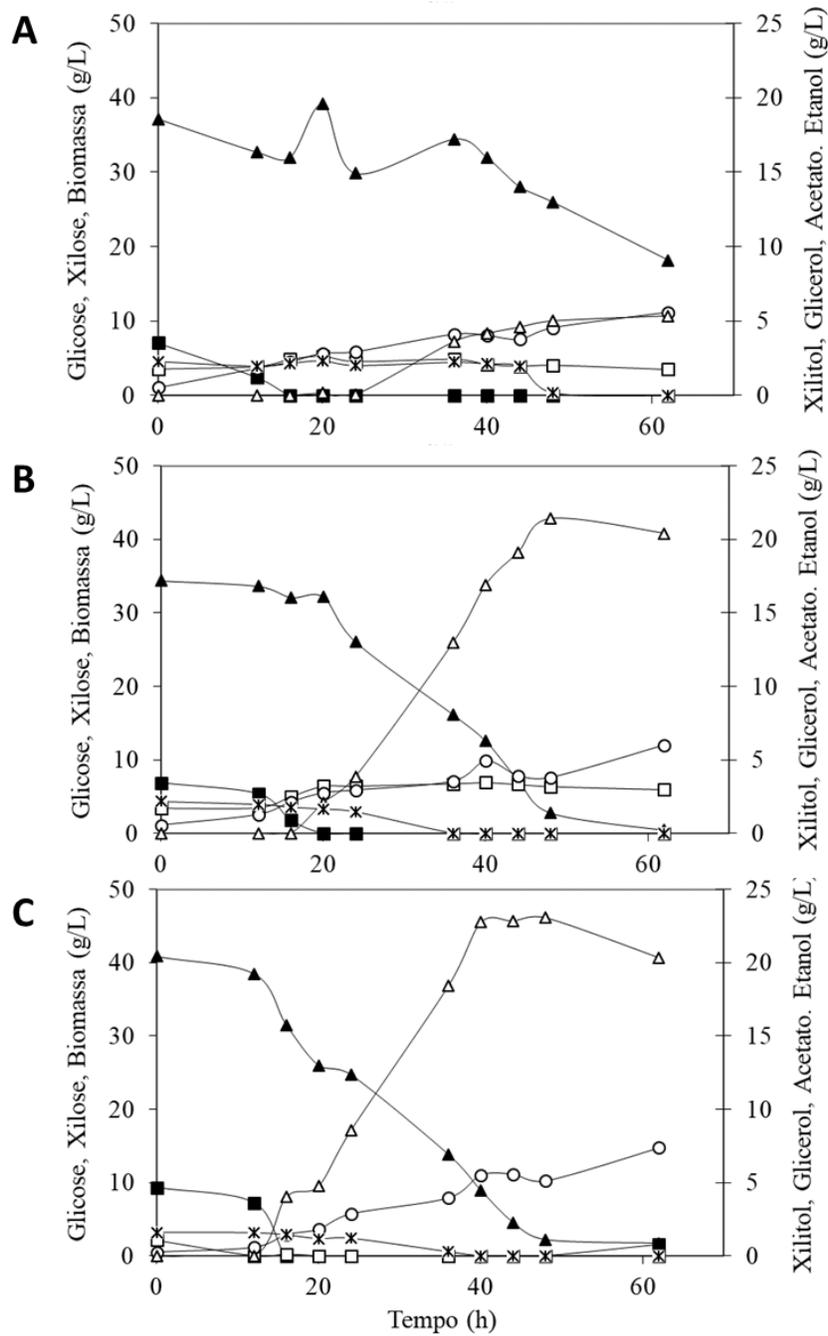


Figura 16. Fermentação de hidrolisado 30% em condição de oxigênio limitado, realizada pelas leveduras (A) *M. guilliermondii* B12, (B) *Spathaspora* sp.JA1, (C) *W. anomalus* 740, em biorreator. Xilose (▲), Xilitol (△), Glicose (■), Etanol (□), Acetato (x), Biomassa (O).

Tabela 15. Valores máximos de rendimento e produtividade relativa (44h) da fermentação de hidrolisado 30%, em duplicata em biorreator; em condições de oxigênio limitado.

Microrganismo	Produção de xilitol (g/L)	Y (g _{xilitol} /g _{xil. Consumida})	P(g.h ⁻¹)	Produção de etanol (g/L)	Y (g _{etanol} /g _{xil. Consumida})
<i>M. guilliermondii</i> B12	5,005 ± 0,418	0,418 ± 0,083	0,014 ± 0,001	0,870 ± 0,083	0,138 ± 0,060
<i>Spathaspora sp.</i> A1	21,085 ± 1,972	0,744 ± 0,031	0,057 ± 0,006	5,221 ± 1,687	0,177 ± 0,069
<i>W. anomalus</i> 740	24,753 ± 1,692	0,838 ± 0,125	0,101 ± 0,035	0,573 ± 0,360	0,111 ± 0,087

Em fermentação em batelada com oxigênio limitado o rendimento máximo de consumo de xilose comparada a produção de xilitol foi de $Y_{P/S} = 0,42$ g/g, Três vezes maior do que o rendimento máximo registrado em fermentação em batelada aeróbica. O valor máximo de produtividade específica da levedura *M. guilliermondii* B12 em batelada microaeróbica foi 2,8 vezes maior do que o apresentado em batelada aeróbica (Tabela 14 e Tabela 15).

No presente trabalho, foi obtida a diminuição da concentração de biomassa em mais de 75%, quando em condições de oxigênio limitado em biorreator (Figura 16). Portanto, condições fermentativas aeróbicas para a produção de xilitol não são muito reportadas na literatura, já que nesses parâmetros, a levedura direciona a fonte de carbono para a produção de biomassa celular.

5.7 Avaliação da cinética fermentativa em frasco

Em seguida, as leveduras pertencentes ao gênero *Meyerozyma* - B12, A3 e controle - foram escolhidas para realizar fermentação de hidrolisado 30% em frasco, com o intuito de comparar a fermentação em hidrolisado entre as leveduras do mesmo gênero.

Dessa vez houve a suplementação de xilose (40 g/L), glicose (10 g/L) e uréia (4 g/L), afim de potencializar a produção de xilitol. O experimento foi feito em triplicata, em condições limitantes de oxigênio (40 mL de meio em frascos de 125 mL).

Nesse experimento, as leveduras começaram a fermentação com DO 20, para favorecer a conversão do açúcar em xilitol, e não para o crescimento celular. O consumo máximo de xilose foi de 30 g/L e a produção de xilitol atingiu mais de 12 g/L (Figura 17). A levedura que mais produziu xilitol foi a linhagem A3, mais de 12,3 g/L, em seguida foi a controle, que produziu 12

g/L até as 40h de fermentação, quando passou a consumi-lo, um pouco antes da xilose acabar (Figura 15 B). A B12 não se destacou na produção de xilitol, a mesma não chegou a 6 g/L.

Como a quantidade de oxigênio foi muito limitada, as três leveduras produziram etanol, a linhagem controle produziu 10,6 g/L, a B12 produziu 5 g/L e a A3 produziu 8 g/L.

Apesar de a B12 não ter apresentado a melhor produção de xilitol, seu rendimento máximo de xilitol aumentou para 0,572 g/g (Tabela 16), melhora considerável, se comparada com a fermentação anterior que apresentou rendimento de 0,41 g/g (Tabela 16). O que pode ser justificado pela adição das fontes de carbono e nitrogênio no meio fermentativo.

A linhagem controle apresentou o maior rendimento de produção de xilitol de $Y = 0,621$ g/g, e também a maior produtividade $P = 0,042$ g.L.h⁻¹ A levedura *M. guilliermondii* A3 obteve o segundo maior valor de produtividade $P = 0,039$ g.L.h⁻¹ e o menor valor de rendimento $Y = 0,36$ g/g (Tabela 16).

Houve significativa produção de etanol, a levedura *M. guilliermondii* Y-324 controle produziu em média, quase 9 g/L de etanol, seguida pela *M. guilliermondii* A3 que produziu 7 g/L. A produção de etanol realizada pela linhagem *M. guilliermondii* B12 foi um pouco maior do que sua produção média de xilitol, chegou a antingir quase 5 g/L, porém, o valor de rendimento máximo na produção de etanol para esta levedura foi menor ($Y = 0,416$ g/g) do que o apresentado em relação a produção de xilitol ($Y = 0,572$ g/g) (Tabela 16).

O maior rendimento para a produção de etanol foi o da linhagem *M. guilliermondii* B12, seguido pelas leveduras *M. guilliermondii* A3 e *M. guilliermondii* Y-324 controle, que obtiveram valores máximos de rendimento muito similares, $Y = 0,322$ g/g e $Y = 0,328$, respectivamente. Conforme esperado, não houve aumento muito significativo na biomassa durante a fermentação (Figura 17).

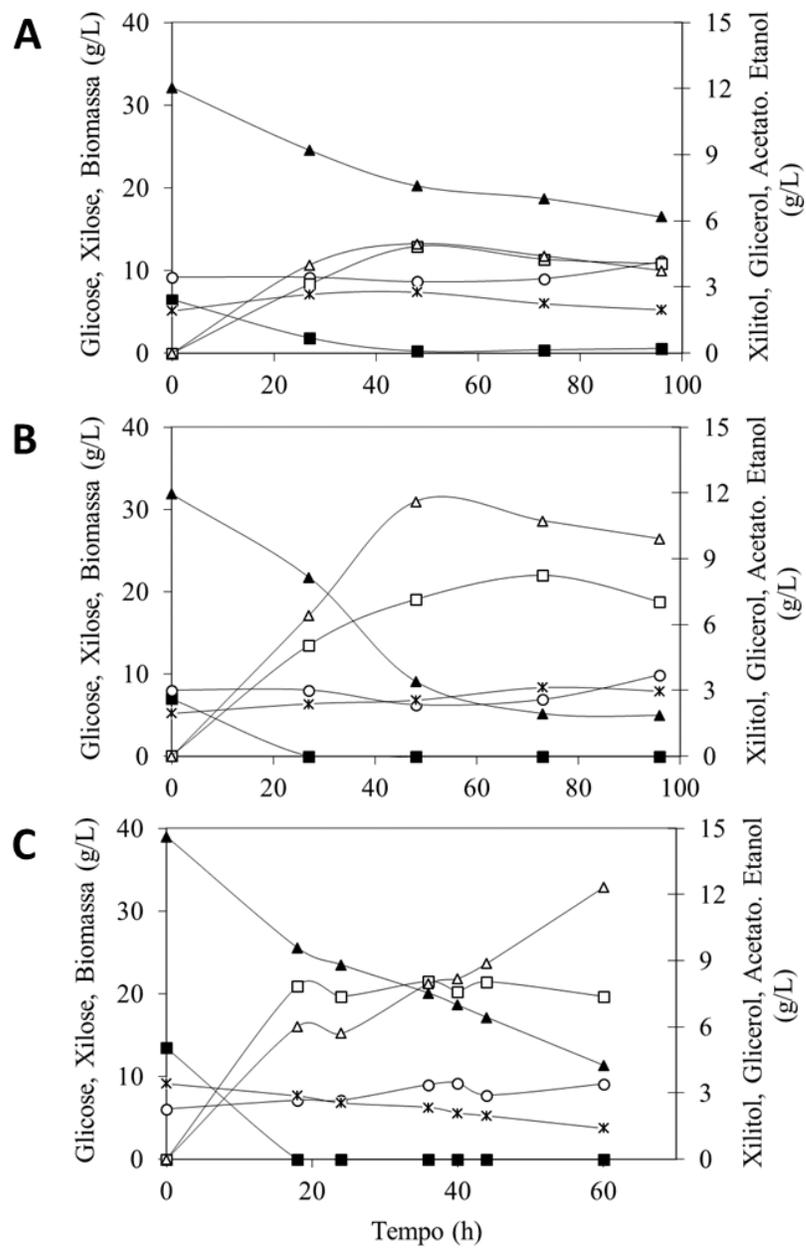


Figura 17. Fermentação de hidrolisado 30% em condição microaeróbica, realizada pelas leveduras (A) B12 (*M. guilliermondii*), (B), Controle positivo (*M. guilliermondii*), (C) A3 (*M. guilliermondii*), em frasco. Xilose (▲), Xilitol (△), Glicose (■), Etanol (□), Acetato (x), Biomassa (O).

Tabela 16. Valores máximos de rendimento e produtividade específica máximos (48h) da fermentação de hidrolisado 30%, em triplicata em frasco; em condições microaeróbicas.

Microrganismo	Produção de xilitol (g/L)	Y (g _{xilitol} /g _{xil. Consumida})	P _{xilitol} (g/g .h ⁻¹)	Produção de etanol (g/L)	Y (g _{etanol} /g _{xil. Consumida})
<i>M. guilliermondii</i> B12	4,662 ± 0,146	0,572 ± 0,038	0,015 ± 0,001	4,865 ± 0,138	0,416 ± 0,012
<i>M. guilliermondii</i> A3	10,999 ± 1,091	0,360 ± 0,008	0,039 ± 0,008	7,172 ± 0,584	0,322 ± 0,041
<i>M. guilliermondii</i> Controle +	10,261 ± 1,024	0,621 ± 0,030	0,042 ± 0,004	8,850 ± 0,623	0,328 ± 0,014

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, a prospecção de 960 leveduras isoladas de solo, madeira em decomposição e intestino de insetos resultou na seleção de 6 linhagens de leveduras fermentadoras de xilose. Todas elas foram identificadas como do gênero *Meyerozyma*. Tal fato pode ser explicado pela ubiquidade das espécies desse gênero. As mesmas podem ser isoladas de diferentes ambientes (águas termais, frutas, insetos, solo), além de se destacarem pela capacidade de consumir pentoses [35-49].

Kurtzman, 2010 [60], propôs a criação do gênero *Meyerozyma* para enquadrar duas espécies de leveduras que são identificadas por sua característica de produzir Coenzima-Q9, são elas, *Pichia guilliermondii* (levedura anamorfa à *Candida guilliermondii*) e *Pichia caribica*. Agora, renomeadas, se tornaram *Meyerozyma guilliermondii* e *Meyerozyma caribica*, respectivamente [45]. As espécies do gênero *Meyerozyma* pertencem ao Filo *Ascomycota* e estão inseridas no clado *Saccharomycotina CTG*. Contudo, a estrutura filogenética das leveduras deste grupo não é totalmente compreendida [35].

Neste trabalho foi feita a identificação taxonômica através do fragmento de DNA ribossomal 26S, foi possível identificar todas as leveduras em nível de espécie. Ainda faltam métodos biotecnológicos para auxiliar na diferenciação das linhagens dentro da espécie [45]. Romi, et al, 2014, mostrou que foi possível diferenciar as espécies *M. guilliermondii* e *M. caribica*, porém, o mesmo não ocorreu com a diferenciação entre as linhagens [46].

Com a prospecção realizada neste trabalho foi possível encontrar leveduras selvagens que fossem naturalmente capazes de assimilar a xilose presente em hidrolisado e produzir xilitol, mesmo na presença de inibidores (Tabela 12). A linhagem *Meyerozyma guilliermondii* B12 selecionada ao fim dos experimentos, foi capaz de produzir xilitol em hidrolisado de cana alcançando rendimento de xilitol de 0,57 g/g xilose (Tabela 16).

Mesmo na presença de 5 g/L de ácido acético, a linhagem *M. guilliermondii* B12 foi capaz de produzir xilitol com rendimento máximo de $Y_{P/S} = 0,40$ g/g (Figura 13). Um dos maiores impedimentos no uso de hidrolisados de biomassa lignocelulósica como meio fermentativo, é a quantidade de inibidores (HMF, furfural e ácidos) que nele estão presentes (Tabela 2), dificultando o crescimento celular. Portanto, o interesse também aumenta na procura por microrganismos que sejam capazes de crescer em hidrolisado, tolerando as concentrações de inibidores [47].

Hernández-Pérez e Arruda, 2016 [3], realizaram testes fermentativos em condições semelhantes às deste trabalho, utilizando a levedura *C. guilliermondii*, e obtiveram rendimentos de produção de xilitol similares em hidrolisado sem suplementação ($Y_{P/S} = 0,41$ g/g). Já em hidrolisado suplementados com glicose (10 g/L) e ureia (4 g/L), o rendimento foi de $Y_{P/S} = 0,50$ g/g, menor do que o registrado para a levedura *M. guilliermondii* B12 ($Y_{P/S} = 0,57$ g/g) (Tabela 16).

Contudo, se faz necessária a suplementação do hidrolisado com fontes de carbono e nitrogênio, para que o meio de cultura fique menos hostil para o crescimento celular. [30]. Como demonstrado na Figura 17 a suplementação do hidrolisado com glicose (10 g/L), ureia (4 g/L) e xilose (40 g/L), possibilitou o aumento na assimilação da xilose e na consequente produção de xilitol. Esses resultados corroboram observações prévias de que as condições para a produção de

xilitol a partir de hidrolisado devem ser muito bem pré-estabelecidas. Diversos fatores podem influenciar no crescimento celular, como aeração, pH, temperatura, fonte de nitrogênio. Portanto, a otimização do processo fermentativo depende do microrganismo que vai ser utilizado [2].

As fontes de nitrogênio são importantes, principalmente, para o aumento da formação de metabólitos. Diversos compostos orgânicos e inorgânicos podem ser utilizados, dentre eles estão: peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio, farelo de soja e ureia [30]. Neste trabalho, foi utilizado extrato de levedura como fonte de nitrogênio nas fermentações iniciais (Figuras 10 e 11), mas meios com Ureia (4 g/L) foram preferidos nos processos posteriores (Figuras 15, 16 e 17) por ser um substrato de menor custo.

Um aumento no rendimento de $Y_{P/S} = 0,401$ g/g para $Y_{P/S} = 0,572$ g/g (Tabela 12 e Tabela 16) foi observado para a linhagem *M. guilliermondii* B12 durante a fermentação de hidrolisado sem suplementação de fontes de carbono e nitrogênio, e com suplementação, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com observações similares de Albuquerque, et al, 2014 e Ko, et al, 2008, que apontaram em seus trabalhos que os rendimentos de produção de xilitol tendem a aumentar após a adição de ureia.

Podemos avaliar o efeito da aeração comparando os rendimentos das fermentações em biorreator, em condições aeróbica (Figura 15) e de oxigênio limitado (Figura 16). Quando a quantidade de ar dissolvido no meio foi diminuída, houve um aumento da produção de xilitol pelas células. A levedura *M. guilliermondii* B12 apresentou uma mudança significativa nos valores de rendimento quando as duas condições de aeração foram comparadas.

Dentre os fatores reguladores da produção de xilitol, a aeração se destaca devido à sua importância na regeneração de cofatores e balanço redox da célula. Quando há oxigênio disponível, a fonte de carbono é direcionada para a via das pentoses fosfato, a qual é utilizada para a regeneração de cofatores importantes para o crescimento celular [47]. Se a quantidade de oxigênio é restringida, não ocorre a regeneração de cofatores, diminuindo assim, a atividade enzimática da XDH que necessita da regeneração de NAD⁺ para converter xilitol em xilulose; promovendo o acúmulo de xilitol na célula [2].

Neste estudo, a levedura *Spathaspora* sp. JA1 demonstrou melhor eficiência na conversão de xilose, mesmo em aerobiose, produzindo quase 20 g/L de xilitol (Figura 15), com rendimento máximo de $Y_{P/S} = 0,59$ g/g (Tabela 14), em batelada, em biorreator de bancada. O que não diferenciou muito da sua performance em condição de oxigênio limitado (Figura 16), na qual produziu 22 g/L de xilitol, porém, o rendimento da conversão aumentou para $Y_{P/S} = 0,74$ g/g (Tabela 15). O aumento do rendimento pode ser explicado pelo uso de glicose como fonte de carbono para consumo inicial na fermentação microaeróbica, já que a levedura pôde direcionar este açúcar para a formação de biomassa e utilizar a maior parte da xilose para produzir xilitol [25].

Silva e Felipe, 2006, descreveram que, para a levedura *C. guilliermondii*, anamorfa à *M. guilliermondii*, que a razão ótima de glicose/xilose presente no hidrolisado do bagaço de cana de açúcar, para uma melhor produção de xilitol é de 1/5 [54]. Contudo, se a concentração de glicose for mais alta, possibilita a formação de coprodutos [29]. Como observado na fermentação microaeróbica de hidrolisado em frasco, suplementada com 10 g/L de glicose, além de 40 g/L de xilose. Na qual, as leveduras *M. guilliermondii* B12, *M. guilliermondii* A3 e *M. guilliermondii* controle produziram 4,6 g/L, 10,9 e 10,2 g/L de etanol, respectivamente (Figura 17).

7. CONCLUSÃO

A prospecção realizada neste trabalho resultou na seleção de 42 leveduras selvagens consumidoras de xilose e, possíveis produtoras de xilitol. Seis leveduras capazes de assimilar xilose foram caracterizadas e comparadas. E uma levedura capaz de assimilar xilose presente em hidrolisado lignocelulósico foi selecionada.

As cinéticas fermentativas das seis linhagens que apresentaram maior potencial foram avaliadas, dentre elas, uma foi selecionada para que mais testes fossem aplicados. A linhagem escolhida, *Meyerozyma guilliermondii* B12, foi capaz de realizar a conversão de xilose em xilitol, mesmo com a presença de inibidores no meio de cultura, e com rendimento máximo de xilitol de 0,57 g/g xilose.

A produção de xilitol foi avaliada variando-se diferentes condições de processo, tais como: aeração, suplementação de fontes de carbono (xilose e glicose) e nitrogênio (extrato de levedura e ureia), e concentração celular inicial do inoculo. Nesses processos, pôde ser constatada a importância da disponibilidade de oxigênio na produção de xilitol, nos quais, foi preferível a fermentação com oxigênio limitado (0,2 v/min de ar). Também foi observado que processos aeróbicos não favorecem o acúmulo de xilitol.

A concentração celular inicial foi um dos fatores que mais influenciou o acúmulo de xilitol, sendo 10 g/L de célula (para concentração inicial de xilose de 40 g/L), o melhor valor para a levedura *M. guilliermondii* B12 apontado neste estudo. Portanto, quando não foi possível começar a fermentação com uma maior densidade celular, o uso de glicose como fonte de carbono inicial se mostrou eficaz.

A glicose, possibilitou a assimilação de xilose o que proporcionou um aumento no acúmulo de xilitol, já que a xilose pôde ser utilizada primeiramente para a produção do poliol. Com a adição de glicose no meio, a levedura *W. anomalus* 740 aumentou a produção de 2 g/L para 23 g/L.

A ureia como fonte de nitrogênio também se mostrou favorável. O valor máximo de rendimento obtido para a levedura *M. guilliermondii* B12 foi de $Y P/S = 0,43$ g/g quando utilizado apenas extrato de levedura, e $Y P/S = 0,57$ g/g, quando ureia foi adicionada ao meio.

Portanto, foi possível a identificação de novas linhagens de leveduras, capazes de crescer em hidrolisados de bagaço de cana de açúcar, assimilar a xilose e produzir xilitol, mesmo na presença de inibidores.

8. ANEXOS

Sequências FASTA referentes ao sequenciamento e identificação taxonômica das 6 linhagens selecionadas:

A12 - *Meyerozyma guilliermondii* MSRY_19

ID da sequência: KY952849.1

100% de identidade.

F

```
TAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTG
TCCGAGTTGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGG
AACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTA
AGGTGCTTTTGAAGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATT
CCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAA
AGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGG
AAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACC
CGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTG
ACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGA
CTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCG
```

R

```
CAGTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAGGCTATAAACTTCACCGAAGTA
AAGTCACATTCCTACGCCATTATCCTACCGCCCAAACCGATGCTGGCCCGATAAGCT
GCGGGTCACCCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTCTGATCTCAAAC
CCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCT
TTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAA
TTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAGCACCTTA
CATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGGATTCTCACCTCTGTGACGTCTGTGTTCCA
AGAAACATAGACAAGAGCCAACCCCAAGGTTACAATCTTCAAATTACAACCTCGGAC
ACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAG
GCAATCCCTGTTGGTTTCTTTT
```

B12 - *Meyerozyma guilliermondii* MSRY_19

ID da sequência: KY952849.1

100% de identidade.

F

```
TAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTCC
GAGTTGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAAC
```

AGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGG
TGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCA
TCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGA
TGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAAG
GGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGC
AGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTT
TACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGC
GATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCG

R

AGTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAGGCTATAACACTTCACCGAAGTAA
AGTCACATTCTACGCCATTATCCTACCGCCCAAACCGATGCTGGCCCGATAAGCTG
CGGGTCACCCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTCTGATCTCAAACC
CTTCCCTTTCACAATTTACAGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTT
TCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAAT
TTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAGCACCTTAC
ATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGGATTCTCACCCCTCTGTGACGTCCTGTTCCAA
GAAACATAGACNAGAGCCAACCCCAAGGTTACAATCTTCAAATTACAACCTCGGACA
CCGAANGCGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTAC

G12 - *Meyerozyma guilliermondii* N2-1

ID da sequência: MF148904.1

99% de identidade.

G12 - *Meyerozyma caribbica*

ID da sequência: [KX507035.1](#)

99% de identidade.

F

GTAGCGGCGAGTGANGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGTG
CGAGTTGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAA
CAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAG
GTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCC
ATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAG
ATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA
GGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCG
CAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGAC
TTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACT
GCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCGCCCGTCTTANNNNCCGG

R

CTTGATNNATCGCAGTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAGGCTATAACACT
TCACCGAAGTAAAGTCACATTCTACGCCATTATCCTACCGCCCAAACCGATGCTGG
CCCGATAAGCTGCGGGTACCCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTC

TGATCTCAAACCCTTCCCTTTCAACAATTTACACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGT
TCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCT
TTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGA
AAGCACCTTACATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGGATTCTCACCCCTCTGTGACG
TCCTGTTCCAAGAAACATAGACAAGAGCCAACCCCAAGGTTACAATCTTCAAATTAC
AACTCGGACACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCC
GCTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTT

H5 - *Meyerozyma guilliermondii* DGC-G-z

ID da sequência: MG518185.1

100% de identidade.

F

CCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCG
GTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCT
TGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTAT
GTAAGGTGCTTTTGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAA
ATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATG
GAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAA
GGGAAGGGTTTGAAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTG
ACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAAT
GTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCGA
GGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCGCC

R

TCGCAGTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAGGCTATAAACTTACCGAA
GTAAAGTCACATTCCTACGCCATTATCCTACCGCCCAAACCGATGCTGGCCCCGATAA
GCTGCGGGTCAACCCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTCTGATCTCA
AACCTTCCCTTTCAACAATTTACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCA
TCTTTCCATCACTGTACTTGTTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATG
GAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAGCACC
TTACATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGGATTCTCACCCCTCTGTGACGTCTGTTC
CAAGAAACATAGACAAGAGCCAACCCCAAGGTTACAATCTTCAAATTACAACCTCGG
ACACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTA
AGGCAATCCCTGTTGG

H9 - *Meyerozyma guilliermondii* 2A-1C315III

ID da sequência: MG736036.1

100% de identidade.

F

GCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTC
GGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTC
TTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTA
TGTAAGGTGCTTTTGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTA

AATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGAT
GGAAAGATGAAAAGAAGTCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAA
AGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGT
GACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAA
TGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCG
AGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCGC

R

GCAGTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAGGCTATAACACTTCACCGAAGT
AAAGTCACATTTCCTACGCCATTATCCTACCGCCAAACCGATGCTGGCCCGATAAGC
TGCGGGTACACCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTCTGATCTCAA
CCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATC
TTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGA
ATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAGCACCTT
ACATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGGATTCTCACCTCTGTGACGTCCTGTTCC
AAGAAACATAGACAAGAGCCAACCCCAAGGTTACAATCTTCAAATTACAACCTCGGA
CACCGAAGGCGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAA
GGCAATCCCTGTTGG

H12 - *Meyerozyma guilliermondii* MSRY_19

ID da sequência: KY952849.1

100% de identidade.

F

TTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGT
GTCCGAGTTGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTG
GAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCATGAGATGCCCAATTCTATGT
AAGGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAAT
TCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGA
AAGATGAAAAGAAGTCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGG
GAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGAC
CCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGT
GACTTTACTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCGAGG
ACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACCGCC

R

AGTCCTCGGTCTAGGCAGGCAGCATCAACGCAGGCTATAACACTTCACCGAAGTAA
AGTCACATTTCCTACGCCATTATCCTACCGCCAAACCGATGCTGGCCCGATAAGCTG
CGGGTACACCCGCCACGAAGGCAAGGCTCACAAAATATCGAGTCTGATCTCAAACC
CTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTT
TCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAAT
TTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGAAAGCACCTTAC
ATAGAATTGGGCATCTCATCGCACGGGATTCTCACCTCTGTGACGTCCTGTTCCAA
GAAACATAGACNAGAGCCAACCCCAAGGTTACAATCTTCAAATTACAACCTCGGACA
CCGAANGCGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGCTAC

Meyerozyma guilliermondii ZGE-34B 26S

ID da sequência: KX263039.1

ACACGGTCATGCTTTAGTAGCGGGCAGTGAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCCTTCGGTGT
CCGAGTTGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGGGGTTGGCTCTTGCTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCAC
AGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTT
GGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC
AAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGG
GAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCG
GGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTACTTCGGTGAAGTGTATAGC
CTGCGTTGATGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAA
CCGCCCGTCTTGAACCACGGAC

Grupo externo para montagem da árvore filogenética:

Sequência consenso.

Candida tenuis

AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAATAGCTCAAATTTG
AAATCTGGCGTCTTCGACGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGAATTGG
CTCTTGCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATG
AGATGCCCAATTCCGTGTAAAGTTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGC
TCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCG
AACAAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGAAGCTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTA
CGTGAATTTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGGTCAGACTTGGTTTTACCAGGCCAGC
ATCAGTTTGGACGGCAGGATAATAGCTAAGAAATGTGACTCCACCTCGGTGGTGTGT
TATAGTCTTGGTTGATACTGCCTGTCTAGACTGAGGACTGCGTCTTTGACTA

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albuquerque TL De, Da Silva IJ, De MacEdo GR, Rocha MVP. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. *Process Biochem.* 2014;49(11):1779-1789. doi:10.1016/j.procbio.2014.07.010
2. Venkateswar Rao L, Goli JK, Gentela J, Koti S. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. *Bioresour Technol.* 2015;213:299-310. doi:10.1016/j.biortech.2016.04.092
3. Hernández-Pérez AF, Costa IAL, Silva DD V, et al. Biochemical conversion of sugarcane straw hemicellulosic hydrolyzate supplemented with co-substrates for xylitol production. *Bioresour Technol.* 2016;200:1085-1088. doi:10.1016/j.biortech.2015.11.036
4. Su B, Wu M, Zhang Z, Lin J, Yang L. Efficient production of xylitol from hemicellulosic hydrolysate using engineered *Escherichia coli*. *Metab Eng.* 2015;31:112-122. doi:10.1016/j.ymben.2015.07.003
5. Granström TB, Izumori K, Leisola M. A rare sugar xylitol. Part I: The biochemistry and biosynthesis of xylitol. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74(2):277-281. doi:10.1007/s00253-006-0761-3
6. Kalu DN, Masoro EJ. Metabolic and nutritional aspects of aging. *Gerodontology.* 1986;2(4):121-126.
7. Chen X, Jiang ZH, Chen S, Qin W. Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application. *Int J Biol Sci.* 2010;6(7):834-844. doi:10.7150/ijbs.6.834
8. De Freitas Branco R, Dos Santos JC, Da Silva SS. A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. *Biomass and Bioenergy.* 2011;35(7):3241-3246. doi:10.1016/j.biombioe.2011.02.014
9. Pratter SM, Eixelsberger T, Nidetzky B. Systematic strain construction and process development: Xylitol production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Candida tenuis* xylose reductase in wild-type or mutant form. *Bioresour Technol.* 2015;198:732-738. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.046
10. Zhang J, Geng A, Yao C, Lu Y, Li Q. Xylitol production from d-xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. *Bioresour Technol.* 2012;105:134-141. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.119
11. de Arruda PV, de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues R, da Silva DDV, de Almeida Felipe M das G. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. *Biodegradation.* 2011;22(4):815-822. doi:10.1007/s10532-010-9397-1
12. Mussatto SI, Roberto IC. Xylitol production from high xylose concentration: Evaluation of the fermentation in bioreactor under different stirring rates. *J Appl Microbiol.* 2003;95(2):331-337. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01990.x
13. Li M, Meng X, Diao E, Du F. Xylitol production by *Candida tropicalis* from corn cob hemicellulose hydrolysate in a two-stage fed-batch fermentation process. *J Chem Technol Biotechnol.* 2012;87(3):387-392. doi:10.1002/jctb.2732

14. Ling H, Cheng K, Ge J, Ping W. Statistical optimization of xylitol production from corncob hemicellulose hydrolysate by *Candida tropicalis* HDY-02. *N Biotechnol.* 2011;28(6):673-678. doi:10.1016/j.nbt.2010.05.004
15. García JF, Sánchez S, Bravo V, Cuevas M, Rigal L, Gaset A. Xylitol production from olive-pruning debris by sulphuric acid hydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*. *Holzforschung.* 2011;65(1):59-65. doi:10.1515/HF.2010.113
16. Cheng KK, Zhang JA, Ling HZ, et al. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. *Biochem Eng J.* 2009;43(2):203-207. doi:10.1016/j.bej.2008.09.012
17. Prakash G, Varma AJ, Prabhune A, Shouche Y, Rao M. Microbial production of xylitol from d-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Bioresour Technol.* 2011;102(3):3304-3308. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.074
18. Qi XH, Zhu JF, Yun JH, et al. Enhanced xylitol production: Expression of xylitol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* and mixed culture of resting cell. *J Biosci Bioeng.* 2016;122(3):257-262. doi:10.1016/j.jbiosc.2016.02.009
19. Ahmad I, Shim WY, Jeon WY, Yoon BH, Kim JH. Enhancement of xylitol production in *Candida tropicalis* by co-expression of two genes involved in pentose phosphate pathway. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2012;35(1-2):199-204. doi:10.1007/s00449-011-0641-9
20. Hector RE, Dien BS, Cotta MA, Mertens JA. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. *Biotechnol Biofuels.* 2013;6(1):1-12. doi:10.1186/1754-6834-6-84
21. Madhavan A, Tamalampudi S, Ushida K, et al. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: Gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;82(6):1067-1078. doi:10.1007/s00253-008-1794-6
22. Yablochkova EN, Bolotnikova OI, Mikhailova NP, Nemova NN, Ginak AI. The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. *Microbiology.* 2003;72(4):414-417. doi:10.1023/A:1025032404238
23. Misra S, Raghuwanshi S, Gupta P, Dutt K, Saxena RK. Fermentation behavior of osmophilic yeast *Candida tropicalis* isolated from the nectar of *Hibiscus rosa sinensis* flowers for xylitol production. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 2012;101(2):393-402. doi:10.1007/s10482-011-9646-2
24. Lee YG, Jin YS, Cha YL, Seo JH. Bioethanol production from cellulosic hydrolysates by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol.* 2017;228:355-361. doi:10.1016/j.biortech.2016.12.042
25. Vaz de Arruda P, dos Santos JC, de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues R, et al. Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *J Ind Eng Chem.* 2017;47:297-302. doi:10.1016/j.jiec.2016.11.046
26. Martínez EA, de Almeida e Silva JB, Giulietti M, Solenzal AIN. Downstream process for xylitol produced from fermented hydrolysate. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40(5):1193-1198. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.09.003

27. Vallejos ME, Chade M, Mereles EB, et al. Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Ind Crops Prod.* 2016;91:161-169. doi:10.1016/j.indcrop.2016.07.007
28. Hernández-Pérez AF, de Arruda PV, Felipe M das G de A. Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Brazilian J Microbiol.* 2016;47(2):489-496. doi:10.1016/j.bjm.2016.01.019
29. López-Linares JC, Romero I, Cara C, Castro E, Mussatto SI. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresour Technol.* 2018;247(September 2017):736-743. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.139
30. Dasgupta D, Bandhu S, Adhikari DK, Ghosh D. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. *Microbiol Res.* 2017;197:9-21. doi:10.1016/j.micres.2016.12.012
31. Gupta R, Hemansi, Gautam S, Shukla R, Kuhad RC. Study of charcoal detoxification of acid hydrolysate from corncob and its fermentation to xylitol. *J Environ Chem Eng.* 2017;5(5):4573-4582. doi:10.1016/j.jece.2017.07.073
32. Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;66(1):10-26. doi:10.1007/s00253-004-1642-2
33. da Cunha-Pereira F, Hickert LR, Sehnem NT, de Souza-Cruz PB, Rosa CA, Ayub MAZ. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. *Bioresour Technol.* 2011;102(5):4218-4225. doi:10.1016/j.biortech.2010.12.060
34. Rangaswamy S, Agblevor FA. Screening of facultative anaerobic bacteria utilizing D-xylose for xylitol production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;60(1-2):88-93. doi:10.1007/s00253-002-1067-8
35. Marco L De, Epis S, Capone A, et al. Genome report The genomes of four *Meyerozyma caribbica* isolates and novel insights into the *Meyerozyma guilliermondii* species complex. 2018. doi:10.1534/g3.117.300316
36. Zhao J, Mou Y, Shan T, et al. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* Isolated from *Paris polyphylla* var. yunnanensis. *Molecules.* 2010;15(11):7961-7970. doi:10.3390/molecules15117961
37. Coda R, Rizzello CG, Di Cagno R, Trani A, Cardinali G, Gobbetti M. Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: Identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. *Food Microbiol.* 2013;33(2):243-251. doi:10.1016/j.fm.2012.09.023
38. Dantán-gonzález E, Quiroz-castañeda RE, Cobaxin-cárdenas M, et al. Impact of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from chickens against *Eimeria* sp . protozoan , an in vitro analysis. *BMC Vet Res.* 2015:1-11. doi:10.1186/s12917-015-0589-0
39. Cadete RM, Melo MA, Dussán KJ, et al. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. *PLoS One.* 2012;7(8). doi:10.1371/journal.pone.0043135
40. Öhgren K, Bura R, Saddler J, Zacchi G. Effect of hemicellulose and lignin removal on

- enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. 2007;98:2503-2510. doi:10.1016/j.biortech.2006.09.003
41. Carrasco C, Baudel HM, Sendelius J, et al. Enzyme and Microbial Technology SO 2 - catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. 2010;46:64-73. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.10.016
 42. Rémond C, Aubry N, Crônier D, et al. Bioresource Technology Combination of ammonia and xylanase pretreatments : Impact on enzymatic xylan and cellulose recovery from wheat straw. *Bioresour Technol.* 2010;101(17):6712-6717. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.115
 43. Paes BG, Almeida JRM. Genetic improvement of microorganisms for applications in biorefineries. 2014;(Figure 1):1-10. doi:10.1186/s40538-014-0021-1
 44. Chen H, Liu J, Chang X, et al. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Process Technol.* 2017;160:196-206. doi:10.1016/j.fuproc.2016.12.007
 45. Wrent P, Rivas EM, Peinado JM, de Sil?niz MI. Development of an affordable typing method for *Meyerozyma guilliermondii* using microsatellite markers. *Int J Food Microbiol.* 2016;217:1-6. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.008
 46. Romi W, Keisam S, Ahmed G, Jeyaram K. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC Microbiol.* 2014;14(1). doi:10.1186/1471-2180-14-52
 47. Zou Y, Qi K, Chen X, Miao X, Zhong J. Favorable effect of very low initial K L a value on xylitol production from xylose by a self-isolated strain of *Pichia guilliermondii*. *JBIOSC.* 2010;109(2):149-152. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.07.013
 48. Ko C, Chiang P, Chiu P, Liu C, Yang C, Shiau I. Integrated xylitol production by fermentation of hardwood wastes. 2008;540(July 2007):534-540. doi:10.1002/jctb
 49. Corte L, Cagno R, Groenewald M, Roscini L, Gobetti M, Cardinali G. Phenotypic and molecular diversity of *Meyerozyma guilliermondii* strains. *Food Microbiol.* 2015;48:206-215. doi:10.1016/j.fm.2014.12.014
 50. Kumar R, Singh S, Singh O V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2008;35(5):377-391. doi:10.1007/s10295-008-0327-8
 51. Carvalheiro F, Duarte LC, Lopes S, Parajó JC, Pereira H, Gírio FM. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. *Process Biochem.* 2005;40(3-4):1215-1223. doi:10.1016/j.procbio.2004.04.015
 52. Kundu C, Lee HJ, Lee JW. Enhanced bioethanol production from yellow poplar by deacetylation and oxalic acid pretreatment without detoxification. *Bioresour Technol.* 2015;178:28-35. doi:10.1016/j.biortech.2014.08.082
 53. Kim JH, Han KC, Koh YH, Ryu YW, Seo JH. Optimization of fed-batch fermentation for xylitol production by *Candida tropicalis*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2002;29(1):16-19. doi:10.1038/sj.jim.7000257
 54. Virg D, Felipe DA. Effect of glucose : xylose ratio on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. 2006;1300(November 2005):1294-1300. doi:10.1002/jctb

55. Miura M, Watanabe I. Microbial conversion of bamboo hemicellulose hydrolysate to xylitol. 2013:515-522. doi:10.1007/s00226-012-0501-z
56. Valderez M, Rocha P, Helena T, et al. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. *Chem Eng J.* 2014;243:234-243. doi:10.1016/j.cej.2013.12.099
57. Jeffries TW. Xylitol production from DEO hydrolysate of corn stover by *Pichia stipitis* YS-30. 2011:1649-1655. doi:10.1007/s10295-011-0953-4
58. Duarte CÆ, Medeiros R, G1 ÆFM. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* in brewery spent grain dilute-acid hydrolysate : effect of supplementation. 2007:1887-1891. doi:10.1007/s10529-007-9468-5
59. Kurtzman CP. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(PART 2):325-332. doi:10.1099/ijs.0.054197-0
60. Kurtzman M, Suzuki M, Kurtzman CP, et al. *Meyerozyma Kurtzman & M. Suzuki (2010)*. Elsevier B.V.; 2010. doi:10.1016/B978-0-444-52149-1.00047-1