



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

GISELE MARTA MARTINS

**Estudo do comportamento fisiológico de cepas de
leveduras frente às condições do meio de cultivo
visando processos de fermentação alcoólica**

São José do Rio Preto
Novembro de 2015

ESTUDO DO COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DE CEPAS DE LEVEDURAS FRENTE ÀS CONDIÇÕES DO MEIO DE CULTIVO VISANDO PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

GISELE MARTA MARTINS

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eleni Gomes

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Trabalho apresentado como tese para
obtenção do título de Doutor pelo
Programa de Pós-graduação em
Microbiologia do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas
da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 10 de novembro de 2015.

Martins, Gisele Marta.

Estudo do comportamento fisiológico de cepas de leveduras frente às condições do meio de cultivo visando processos de fermentação alcoólica / Gisele Marta Martins. – São José do Rio Preto, 2015

133 f. : il., tabs.

Orientador: Eleni Gomes

Coorientador: Fernando Carlos Pagnocca

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Levedos – Aplicações industriais. 3. Fermentação. 4. Biomassa – Microbiologia. 5. Etanol. 6. Xilose. I. Gomes, Eleni. II. Pagnocca, Fernando Carlos. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 663.12

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

ESTUDO DO COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DE CEPAS DE LEVEDURAS FRENTE ÀS CONDIÇÕES DO MEIO DE CULTIVO VISANDO PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

GISELE MARTA MARTINS

Tese apresentada para obtenção do
título de Doutor pelo Programa de Pós-
graduação em Microbiologia do
Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de São José do Rio
Preto

Aprovado em 10/11/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Eleni Gomes (IBILCE - UNESP/ Rio Preto)

Prof. Dr^a. Sandra Regtina Ceccato Antonini (CCA – UFSCAR/ Araras)

Prof. Dr^a. Ana Marisa Fusco Almeida (FCFAR – UNESP/ Araraquara)

Prof. Dr^a. Daniela Alonso Bocchini Martins (IQ – UNESP/ Araraquara)

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz (IBILCE - UNESP/ Rio Preto)

“ A pesquisa procede por momentos distintos e prolongados, intuição, cegueira, exaltação e febre. Vem dar, um dia, nesta alegria e conhece tal alegria aquele que viveu estes momentos incomuns. ”

(Albert Einstein)

Dedico este trabalho à minha mãe Dulcinda e ao meu irmão Roberto, por todo apoio, incentivo e ajuda para que fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos familiares, por todo apoio e incentivo, especialmente à minha mãe Dulcinda e ao meu irmão Roberto, pelo amor e paciência;

À minha orientadora, Prof. Dr^a. Eleni Gomes e ao meu co-orientador Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, pela oportunidade, confiança e pelos valiosos ensinamentos;

Ao Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas da UNESP/ Câmpus de São José do Rio Preto, que por meio do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia tornou viável a obtenção do título de Doutora;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro, que possibilitou a minha dedicação exclusiva ao doutorado e a realização dos experimentos;

Aos amigos de laboratório Ana Dias, Ana Lúcia, Andréia, Angélica, Ariane, Bruna, Carol Bezerra, Carol Merheb, Carol Santos, Christiane, Daniela, Diego, Emily, Erick, Erik, Fernando, George, Isabel, Isabela, Janaína, Josiane Scarpassa, Josiani Pereira, Júnior, Leititia, Lucas, Maitê, Márcia, Márcio, Maria Cecília, Maria Eduarda, Marina, Olavo, Pedro, Priscila, Rafaela, Raisal, Rosimeire e Sidnei, pelo apoio, auxílio e por tornar os dias de dificuldades mais leves e divertidos;

Aos docentes Prof. Dr. Roberto da Silva e Prof. Dr. Maurício Boscolo, pela colaboração;

Ao Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa e ao Prof. Dr. Manuel Malfeito Ferreira, pela oportunidade e orientação durante minha estadia de 10 meses em Portugal, bem como os amigos de laboratório, Ana Carla, Analisa, Bárbara, Felipa, Inês, Janine, Mahesh, Marta, Miguel, Paula, Sofia, Thomás, senhoras D. Manuela e D. Helena e Prof^a Dr^a Luiza Brito, pelo acolhimento e auxílio;

Aos grandes amigos portugueses Hugo, Mariana Almeida, Mariana Paulo, Patrícia, Pedro, Sofia e Tiago, e às amigas brasileiras que encontrei em Lisboa, Jael, Rita e Silvana, que me deram total suporte durante o tempo que lá estive;

Por fim, aos meus grandes amigos, Camila, Flávio, Gabriel, Laís e Regiane, que estão entre os maiores incentivadores e apoiadores da minha carreira.

Sumário

Capítulo 1 – Considerações Gerais.....	1
Introdução	2
Revisão Bibliográfica	5
As leveduras e sua importância industrial.....	5
Fermentação alcoólica de pentoses	6
Fatores ambientais que influenciam o processo de fermentação alcoólica	11
Objetivos	24
Referências Bibliográficas	25
Capítulo 2 - Teste rápido para Seleção de leveduras fermentadoras de xilose.....	38
Resumo	39
Introdução	40
Material e Métodos	42
Microrganismos	42
Teste para triagem de leveduras fermentadoras de xilose.....	43
Determinação da concentração mínima de etanol para o crescimento das cepas assimiladoras de etanol.....	44
Padronização do inóculo nos experimentos de cultivo e fermentação	45
Produção de etanol a partir de xilose.....	45
Avaliação de crescimento	46
Avaliação de viabilidade celular e taxa de brotamento	46
Quantificação de etanol	47
Quantificação de açúcares	47
Resultados e Discussão	47
Triagem de leveduras fermentadoras de xilose	47
Produção de etanol a partir de xilose.....	53
Conclusões.....	56
Referências Bibliográfica.....	57
Capítulo 3 - Influência das condições de cultivo na fermentação alcoólica de xilose por <i>Candida shehatae</i> e <i>Aureobasidium pullulans</i>.....	61
Resumo	62
Introdução	63
Material e Métodos	65
Teste de resistência a etanol e capacidade de utilizá-lo como fonte de carbono	65

Teste de resistência a acidez e tolerância a compostos aromáticos	66
Estudo dos efeitos de parâmetros de cultivo sobre o potencial fermentativo	67
Métodos Analíticos	68
Resultados e Discussão	69
Teste de resistência a etanol e capacidade de utilizá-lo como fonte de carbono	69
Teste de resistência a acidez e tolerância a compostos aromáticos	73
Estudo dos efeitos de parâmetros de cultivo sobre o potencial fermentativo	75
Conclusões.....	91
Referências Bibliográfica.....	92
Capítulo 4 - Influência de componentes do meio na tolerância a SO₂ e no desenvolvimento da cepa <i>B. bruxelensis</i> ISA 2211	97
Resumo	98
Introdução	99
Material e Métodos	100
Origem e manutenção da cepa.....	100
Influência de nutrientes na tolerância a SO ₂	101
Avaliação da inibição do crescimento e produção de fenóis voláteis sob diferentes concentrações de SO ₂	101
Influência da presença de ácidos hidroxicinâmicos e etanol na tolerância a SO ₂	102
Capacidade de recuperação da viabilidade na presença de SO ₂	102
Capacidade de assimilação de ácido p-cumárico	103
Utilização de ácido p-cumárico como fonte de carbono em variadas concentrações.....	104
Métodos Analíticos	104
Resultados e Discussão	105
Influência de nutrientes na tolerância a SO ₂	105
Avaliação da inibição do crescimento e produção de fenóis voláteis sob diferentes concentrações de SO ₂	106
Influência da presença de ácidos hidroxicinâmicos e etanol na tolerância a SO ₂	109
Capacidade de recuperação da viabilidade na presença de SO ₂	111
Capacidade de assimilação de ácido p-cumárico	112
Utilização de ácido p-cumárico como fonte de carbono em variadas concentrações.....	114
Conclusões.....	116
Referências Bibliográfica.....	117
Conclusões Gerais.....	119
Discussão Geral	120
Conclusão	122
Referências Bibliográfica.....	122

Estudo do comportamento fisiológico de cepas de leveduras frente às condições de cultivo visando processos de fermentação alcoólica

RESUMO

O comportamento fisiológico de um determinado microrganismo pode se mostrar diferente frente às variações das condições de cultivo. Em processos biotecnológicos, esse conhecimento permite definir os parâmetros fermentativos a serem controlados de modo a se otimizar custos e rendimento. Neste trabalho, foi padronizado um teste de avaliação da produção de etanol por leveduras a partir de xilose, utilizando placas de Petri, o qual permitiu o reconhecimento de 17 leveduras fermentadoras xilose. Dessas cepas, quando em fermentação em meio líquido, destacaram-se a *Candida shehatae*, var. *shehatae* PT1-1BASP, que produziu 12 g.L⁻¹ de etanol e *Aureobasidium pullulans* LB3.1, com 7 g.L⁻¹. A produção de etanol por essas duas cepas foi avaliada com relação à parâmetros fermentativos, como tolerância a compostos reconhecidos como inibidores do crescimento de leveduras, temperatura de incubação, pH inicial do mosto, concentração do inóculo e adição de nutrientes minerais. A definição das melhores condições de fermentação elevou o consumo de xilose por ambas as cepas, ao mesmo tempo que diminui a produção de biomassa e aumentou o rendimento em etanol por *A. pullulans* LB3.1. As linhagens *C. shehatae* PT1-1BASP e *A. pullulans* LB3.1 atingiram um máximo de produção de etanol de 18,7 g.L⁻¹ e 17,5 g.L⁻¹, respectivamente. Além dessas duas leveduras, a cepa *Brettanomyces bruxellensis* ISA 2211, contaminante de vinhos, foi avaliada com relação à tolerância a SO₂ diante de variações nas condições de cultivo. A adição de vitaminas e extrato de levedura ao mosto aumentou a resistência da levedura ao dióxido de enxofre, enquanto a presença do etanol, em combinação com o SO₂, exerceu maior inibição do crescimento. Foi estudada também nesse trabalho, a capacidade de *B. bruxellensis* ISA 2211 de utilizar o ácido p-cumárico como fonte de carbono, observando-se que o crescimento da levedura nessa condição foi dependente da concentração do ácido no meio, não tolerando concentrações a partir de 5 mmol. L⁻¹.

Palavras chaves: xilose, etanol, *Candida shehatae*, *Aureobasidium pullulans*, *Brettanomyces bruxellensis*, SO₂, ácido p-cumárico.

Study of the behavior of yeast strains according the conditions of the culture media aiming alcoholic fermentation processes

ABSTRACT

The microorganisms can show different behavior in different conditions of cultivation. In biotechnological processes, this knowledge allows that fermentation parameters to be controlled in order to optimize costs and yield. In this work it was standardized a test of ethanol production by yeast from xylose using Petri dishes assay, which allowed the recognition of 17 xylose fermenting yeasts. Using submerged fermentation it was detected that *Candida shehatae*, var. *shehatae* PT1-1BASP produced 12 g L⁻¹ of ethanol and *Aureobasidium pullulans* LB3.1, 7 g L⁻¹. Ethanol production by these two strains was evaluated with respect to fermentation parameters, such as tolerance to compounds recognized as inhibitors of growth of yeast, temperature of incubation, initial pH of the must, concentration of the inoculum and nutrient addition. The definition of the best fermentation conditions increased the xylose consumption by both strains, while it decreases the production of biomass and increased ethanol yield by *A. pullulans* LB3.1. The *C. shehatae* PT1-1BASP and *A. pullulans* LB3.1 reached a maximum ethanol yield of 18.7 gL⁻¹ and 17.5 gL⁻¹, respectively. Besides these two yeasts, *Brettanomyces bruxellensis* the ISA 2211, a wine contaminating strain, was evaluated with respect to SO₂ tolerance in the face of variations in culture conditions. The addition of vitamins and yeast extract to must increased the yeast resistance to sulfur dioxide, while the presence of ethanol, in combination with SO₂, had greater growth inhibition. It was also studied in this work, the ability of *B. bruxellensis* ISA 2211 to use the p-coumaric acid as a carbon source, noting that the growth of yeast in that condition was dependent on the acid concentration in the medium, not tolerating concentrations high than 5 mmol. L⁻¹.

Key-words: xylose, ethanol, *Candida shehatae*, *Aureobasidium pullulans*, *Brettanomyces bruxellensis*, SO₂, p-coumaric acid.

Capítulo 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

O uso de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol combustível é uma prática estabelecida com base em avanços incontestes de rendimentos obtidos por meio de seleção de cepas dentro do próprio processo fermentativo. O excelente desempenho de linhagens selecionadas das dornas de fermentação tem mostrado que as condições do próprio processo exercem pressão seletiva sobre as linhagens salientando características da espécie que sejam desejáveis (alto rendimento de etanol, baixa formação de glicerol, manutenção de viabilidade, etc) ou indesejáveis (floculação, formação de espuma, biofilme, etc).

A atual perspectiva de se aproveitar fontes de carbono alternativas como as pentoses, não fermentadas pela *S. cerevisiae*, abriu espaço para busca de diferentes espécies de leveduras que fermentem esse açúcar e que possam permitir a identificação de genes e enzimas envolvidas nessa rota metabólica.

Com a proposta de utilização do hidrolisado lignocelulósico como fonte de açúcar fermentescível veio também o desafio de se encontrar cepas que sejam capazes de utilizar as pentoses e produzir compostos de valor agregado. Uma vez que hexoses e pentoses são liberadas na hidrólise daquela biomassa, numa produção eficiente de etanol a partir desse material, o microrganismo fermentador deveria ser capaz de utilizar não apenas a glicose, mas a xilose e arabinose. Cepas capazes de utilizar ambos os tipos de açúcares, têm sido isoladas ou construídas por técnicas de engenharia genética. Assim, o isolamento de cepas, com sistemas genéticos naturais para assimilação e fermentação de pentoses e adaptadas às condições climáticas de nosso país, vem fornecer não só o microrganismo com uso potencial, mas sistemas gênicos importantes para futuras pesquisas.

Embora várias cepas fermentadoras de pentoses já tenham sido isoladas e caracterizadas, o pouco conhecimento dos efeitos de fatores ambientais como temperatura, pH, oxigenação, concentração de nutrientes e concentração de massa celular sobre o desempenho dessas leveduras no processo de fermentação de pentoses a etanol ainda é fator limitante considerando as rotas metabólicas diferenciadas seguidas por essas células e que ainda são pouco conhecidas. Cada cepa tem suas características próprias de adaptação ao ambiente em que vive, podendo ser diferentes até mesmo entre estirpes pertencentes à mesma espécie.

Além das condições ambientais é desejado que a estirpe seja tolerante a compostos que comumente levam à inibição do metabolismo durante o processo de fermentação, que podem ser liberados durante a etapa de pré-tratamento para hidrólise do material lignocelulósico. Dependendo da tecnologia empregada, o pré-tratamento gera compostos que atuam nas membranas celulares e sistemas de transporte, equilíbrio de pH interno e do potencial de membrana, além de rotas metabólicas, interferindo, portanto, na viabilidade, crescimento e capacidade fermentativa das leveduras. Entre esses compostos, os mais comuns são ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos liberados a partir da fração de lignina, tais como vanilina e ácido 4-hidroximetilbenzóico. Além desses compostos espera-se também que a cepa seja tolerante a altas concentrações do seu próprio produto, o etanol.

Em outro contexto, no que se refere à leveduras que podem influenciar um processo fermentativo, há a espécie *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, que é facilmente encontrada no ambiente de fermentação alcoólica e que pode representar um sério desafio para as indústrias, principalmente de vinho, representando um dos principais motivos de contaminação devido ao seu desenvolvimento metabólico após o engarrafamento, sendo responsáveis pela produção de sabores desagradáveis e aromas rançosos no vinho, descritos como “suor de cavalo”.

No ambiente da produção de bioetanol, *D. bruxellensis* é comumente citada como uma das leveduras contaminantes mais importantes nas usinas de álcool brasileiras devido ao processo de reciclagem das células de *Saccharomyces cerevisiae* que acaba concentrando células de *D. bruxellensis* e desenvolvendo contaminações. Assim, o número de estudos sobre a fisiologia das leveduras *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* tem aumentado, devido à sua habilidade de desenvolvimento em processos fermentativos industriais, principalmente por sua notável capacidade de se adaptar a este ambiente.

O presente trabalho buscou estudar características de cepas de leveduras visando aplicação em processos de fermentação alcoólica. O trabalho se divide em 4 Capítulos: este primeiro capítulo aborda as referências bibliográficas sobre o assunto do trabalho. No **Capítulo 2** é apresentada a padronização de uma metodologia fácil e rápida para identificar cepas de leveduras fermentadoras de xilose, utilizando ensaios com placas de Petri, no qual produção de etanol pela levedura fermentadora de xilose permite o crescimento de outra levedura que não é capaz de metabolizar pentose, mas assimila o etanol, resultando em crescimento dessa cepa ao redor da colônia produtora de etanol e permitindo o reconhecimento das cepas produtoras de etanol. O teste permitiu a seleção

de duas cepas promissoras para produção de etanol a partir de xilose, a *Candida shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP e *Aureobasidium pullulans* LB3.1.

No **Capítulo 3** são mostrados os resultados do estudo dessas duas cepas quanto ao comportamento frente a parâmetros fermentativos típicos de um processo de produção de etanol de segunda geração. Foi avaliado o comportamento das mesmas diante de variação da temperatura de incubação, de diferentes valores de pH inicial do mosto, da concentração do inóculo e da adição de nutrientes no meio, além da tolerância a compostos conhecidos como inibidores de leveduras como ácidos orgânicos, compostos fenólicos e etanol. O conhecimento da influência desses parâmetros sobre cada cepa permitiu o delineamento de condições de fermentação que resultaram em maior consumo do açúcar e aumento da produtividade de etanol.

O **Capítulo 4** descreve trabalho realizado no Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, Portugal, no qual se estudou a influência de compostos como vitaminas, SO₂, etanol e ácidos hidroxicinâmicos sobre o crescimento e viabilidade de *Brettanomyces bruxelensis*. O estudo dessas características mostrou que o comportamento da cepa pode variar de acordo com a composição do meio em que se encontra e abre caminhos para novas possibilidades de controlar o crescimento da espécie ou mesmo de utilizá-la em outros tipos de processo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. As leveduras e sua importância industrial

As leveduras encontram-se entre o grupo de microrganismos mais intensamente utilizados em indústrias. São cultivadas visando a obtenção de biomassa, para indústrias de fermentos biológicos, derivados de componentes celulares, como nas indústrias farmacêuticas e de suplementos alimentares, e a produção de compostos, como o etanol. As leveduras fermentativas vêm sendo exploradas pelo homem há milhares de anos nos processos fermentativos de produção de cerveja, vinho e pão, embora, somente no século XIX tenha sido reconhecida a natureza biológica dos agentes responsáveis por estes processos (TORTORA et al., 2012).

Como microrganismos quimiorganotróficos, utilizam compostos orgânicos diversos como fonte de carbono e energia, tais como D-glucose, D-galactose, D-xilose, glicerol, sorbitol, entre muitos outros. Contudo, as diferentes espécies apresentam uma variação na habilidade de assimilação desses compostos, assim como na forma de metabolizá-los, por vias respiratórias ou fermentativas no processo de geração de energia a partir dos mesmos. Podem crescer eficientemente em substratos que contêm açúcar, multiplicando-se e gerando CO₂ (este último oriundo do ciclo do ácido cítrico) por via aeróbica. Por outro lado, podem também realizar um metabolismo anaeróbio, denominado fermentação alcoólica, que resulta em uma pequena taxa de reprodução, mas com produção de quantidades significativas de álcool e CO₂ quando em presença de elevadas concentrações de açúcares e/ou ausência de O₂ (PHAFF et al., 1978; AMORIM; LEÃO, 2005).

Na fermentação alcoólica o piruvato, formado a partir da glicólise, é convertido em etanol e CO₂ em um processo de duas etapas. Na primeira etapa, o piruvato é descarboxilado em uma irreversível reação catalisada pela enzima piruvato descarboxilase. A piruvato descarboxilase requer Mg²⁺ e possui uma coenzima fortemente ligada, a tiamina pirofosfato (derivada da vitamina B1, com o importante papel de clivar ligações adjacentes a um grupo carbonil). Na segunda etapa, acetaldeído é reduzido a etanol por meio da ação da enzima álcool desidrogenase, com o poder de redução fornecido por NADH (NELSON; COX, 2014). Etanol e CO₂ são, então, os produtos finais da fermentação alcoólica, cuja equação global é:



Em termos energéticos, a respiração é muito mais favorável para a levedura do que a fermentação alcoólica, uma vez que na fermentação cada molécula de glicose gera duas de ATP, enquanto a respiração origina 38 moléculas de ATP (CAMPBELL, 2000).

As principais leveduras de importância econômica correspondem ao gênero *Saccharomyces*, sendo que as cepas comerciais atualmente utilizadas são relativamente diferentes das linhagens selvagens, visto que foram aperfeiçoadas ao longo dos anos por cuidadosa seleção e manipulação genética (MUTTON; MUTTON, 2005).

No caso de processos de fermentação para bebidas, como o vinho, outras leveduras, além da *Saccharomyces* que estejam presentes na matéria-prima e, conseqüentemente, no processo de fermentação, podem influenciar a qualidade final do produto, devido à produção de metabólitos que podem contribuir ou prejudicar o aroma e sabor da bebida (UGLIANO; HENSCHKE, 2009).

Nos últimos anos, as leveduras não-*Saccharomyces* têm conquistado espaço no que se refere ao potencial de aplicação industrial. Com a alternativa da utilização de materiais lignocelulósicos para produção de compostos de valor agregado, essas leveduras ganharam importância devido à necessidade de cepas capazes de utilizar os mais diversos tipos de açúcares encontrados na biomassa lignocelulósica. Assim, o estudo das características dessas cepas ganhou importância entre os pesquisadores da área de Biotecnologia.

2. Fermentação alcoólica de pentoses

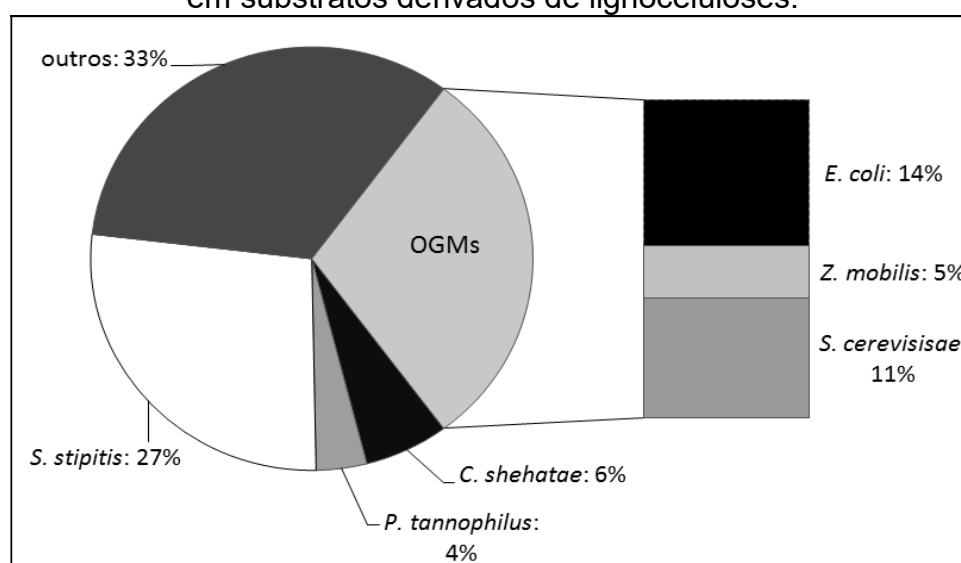
No processo de produção de etanol de segunda geração, a bioconversão dos açúcares em etanol representa uma etapa crucial em sequência ao pré-tratamento e a solubilização a partir da matriz lignocelulósica. Há duas vertentes nesta etapa, a primeira – mais simples – diz respeito à fermentação de hexoses, essencialmente glicose proveniente da celulose. A segunda está relacionada à fermentação das pentoses resultantes da solubilização da hemicelulose, que não são metabolizadas pelas linhagens tradicionais de *Saccharomyces cerevisiae* e, por isso, a fermentação de pentoses apresenta-se como limitante tecnológico até o presente momento.

Inicialmente, os estudos não priorizavam a utilização das porções de xilose e arabinose para a fermentação alcoólica, especialmente evidenciadas pela elevada agressividade dos pré-tratamentos pioneiros sobre a hemicelulose, estruturalmente mais frágil e susceptível à degradação do que a celulose. Entretanto o interesse pela utilização

das pentoses como substrato para diferentes produtos é crescente, tais como hidrogênio, butanol, ácidos succínico e láctico (CHEN et al., 2013; GOTTUMUKKALA; PARAMESWARAN, 2014; YE et al., 2013; ZHAO et al., 2013). Atualmente esforça-se por perdas mínimas da hemicelulose no pré-tratamento, permitindo recuperar ambos os carboidratos, C6 e C5 de forma a incrementar o rendimento global do processo, e/ou diversificar a gama de bioprodutos derivados a partir da biomassa vegetal hidrolisada.

Scheffersomyces stipitis é majoritariamente a cultura mais recorrente na aplicação de fermentação de pentoses, conforme levantamento de aproximadamente 80 publicações científicas entre 2005 e 2014 (**Figura 1**). Há ainda uma grande diversidade de outras culturas estudadas com menor frequência nas pesquisas visando à produção de bioetanol: *Spathaspora arborariae* (CUNHA-PEREIRA et al., 2011; HICKERT et al., 2014), *Pichia guilliermondii* (FAN et al., 2013), *Hansenula polymorpha* (VORONOVSKY et al., 2009), e algumas espécies de fungos filamentosos, principalmente as pertencentes aos gêneros *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. e *Rhizomucor* spp. (MILLATI et al., 2005; SUES et al., 2005; KARIMI et al., 2006; ABEDINIFAR et al., 2009), bem como *Fusarium* spp. e *Acremonium* spp. (PANAGIOTOU et al., 2005; ALMEIDA et al., 2013). Okamoto e colaboradores também relatam utilização das espécies *Trametes hirsuta* (2011) e *Neolentinus lepideus* (2012). Entre as bactérias produtoras de etanol a partir de pentoses foram relatadas *Caloramator boliviensis* (CRESPO et al., 2012) e espécies dos gêneros *Thermoanaerobacter* spp., *Thermoanaerobacterium* spp. e *Caldanaerobacter* spp. (HE et al., 2009; CHENXI et al., 2013).

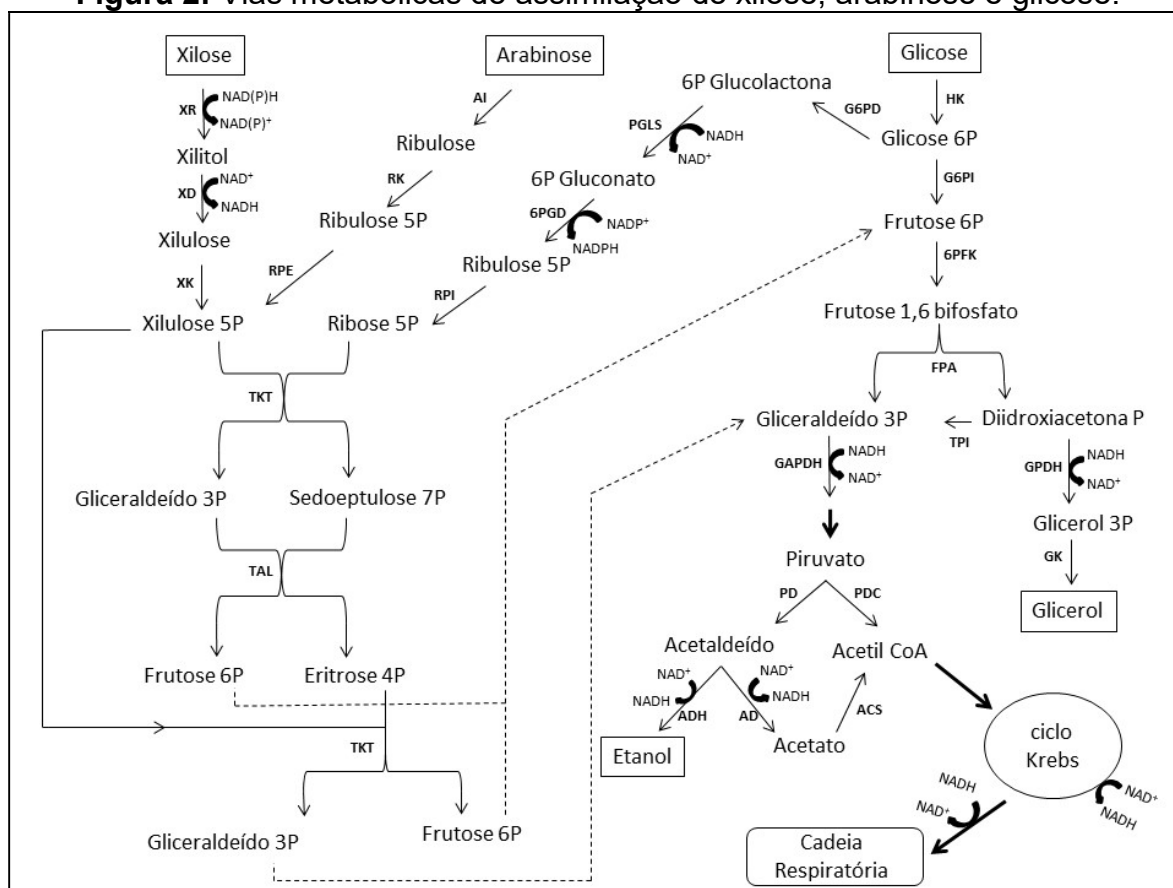
Figura 1: Microrganismos comumente empregados para a fermentação de pentoses em substratos derivados de lignoceluloses.



OGMs: organismos geneticamente modificados. Fonte: próprio autor.

A assimilação de xilose segue algumas vias diferentes da glicose, como pode ser observado na **Figura 2**, discutida a seguir.

Figura 2: Vias metabólicas de assimilação de xilose, arabinose e glicose.



6PFK: 6-fosfofrutoquinase (EC2.7.1.11); **6PGD:** fosfogluconato 2-desidrogenase (EC1.1.1.43); **ACS:** acetil-CoA sintase (EC6.2.1.1); **AD:** aldeído desidrogenase (EC1.2.1.3); **ADH:** álcool desidrogenase (EC1.1.1.1); **AI:** arabinose isomerase (EC5.3.1.3); **FPA:** frutose-bisfosfato aldolase (EC4.1.2.13); **G6PD:** glicose-6-fosfato desidrogenase (EC1.1.1.49); **G6PI:** glicose-6-fosfato isomerase (EC5.3.1.9); **GAPDH:** gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (EC1.2.1.12); **GK:** glicerol quinase (EC2.7.1.30); **GPDH:** glicerol-3-fosfato desidrogenase (EC1.1.1.8); **HK:** hexoquinase (EC2.7.1.1); **PD:** piruvato descarboxilase (EC4.1.1.1); **PDC:** complexo piruvato desidrogenase (EC1.2.4.1; EC2.3.1.12; EC1.8.1.4); **PGLS:** 6-fosfogluconolactonase (EC3.1.1.31); **RK:** ribulose quinase (EC2.7.1.16); **RPE:** L-ribulose-5-fosfato 4-epimerase (EC5.1.3.4); **RPI:** ribose-5-fosfato isomerase (EC5.3.1.6); **TAL:** transaldolase (EC2.2.1.2); **TKT:** transcetolase (EC2.2.1.1); **TPI:** triose-fosfato isomerase (EC5.3.1.1); **XD:** xilitol desidrogenase (EC1.1.1.113); **XK:** xiluloquinase (EC2.7.1.17); **XR:** xilose redutase (EC1.1.1.307).

O transporte de D-xilose através da membrana de leveduras ocorre por sistemas de baixa e alta afinidade. Entre esses sistemas estão a difusão facilitada e o mecanismo de simportador ligado a co-transporte de próton e dependem do estado nutricional da levedura (TYAGI, 2013). Por exemplo, *Rhodotorula glutinis* tem pelo menos um sistema de transporte de baixa e um de alta afinidade para D-xilose. Esse último é reprimido quando a levedura cresce em xilose e desreprimido sob inanição e ambos os sistemas são reprimidos por glicose (KILIAN; UDEN, 1988).

Em *S. stipitis* os transportes tanto de xilose como de glicose ocorrem principalmente por sistema simportador com próton. Em *C. shehatae* o transporte de D-glicose, D-xilose e D-manose ocorrem principalmente por difusão facilitada, sendo para D-glicose com alta afinidade/baixa capacidade e para D-xilose ou D-manose, de baixa afinidade/alta capacidade. Portanto, a glicose exerce efeito competitivo inibitório sobre a absorção dos outros dois açúcares. Sob inanição, um sistema simportador ligado a co-transporte de próton com alta afinidade é induzido para glicose (K_m - 0.12 mmol.L⁻¹) e D-xilose (K_m - 1.0 mmol.L⁻¹) (VAN VLEET; JEFFRIES, 2009).

Muitos transportadores heterólogos de pentoses têm sido expressos em *S. cerevisiae*. A descoberta de transportadores mais eficientes e específicos é necessária para melhorar a captação de D-xilose e L-arabinose e, assim, promover a capacidade metabólica de *S. cerevisiae*. Contudo, até agora, a capacidade de captar pentose usando transportadores heterólogos ainda é baixa, o principal desafio continua sendo a contradição entre a especificidade e a eficiência do transporte de D-xilose. Alguns estudos utilizam como estratégia a mutação, a fim de obter cepas com atividade específica para transporte de xilose e livre de inibição por glicose (YOUNG et al., 2012; NIJLAND et al., 2014; WANG et al., 2015)

Após o transporte, D-xilose é primeiro reduzida a xilitol por meio da enzima D-xilose redutase (aldose redutase EC 1.1.1.21) e subsequentemente oxidada a D-xilulose pela xilitol desidrogenase (D-xilose redutase, EC 1.1.1.9). Por meio da enzima D-xiluloquinase (EC 2.7.1.17.) a D-xilulose é convertida em D-xilulose-5-fosfato. Ribulose-fosfato-3-epimerase (EC 5.1.3.1) transaldolase (EC 2.2.1.2) e transcetolase (EC 2.2.1.1) sequencialmente convertem a D-xilulose-5-fosfato em gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato por rearranjo não oxidativo levando à formação de etanol pela via Embden-Meyerhof (CHANDEL et al., 2011).

A enzima xilose redutase (XR), que catalisa a primeira reação é capaz de usar NADPH e NADH, sendo que utiliza o NADPH com maior frequência, já a enzima xilitol desidrogenase, que produz xilulose a partir do xilitol, é NAD⁺-dependente. Dependendo do balanço redox da célula (equilíbrio entre NADPH e NAD⁺), o xilitol pode ser liberado para o meio externo, resultando em baixo rendimento em etanol. Desse modo, o potencial redox da célula pode determinar o sucesso do processo fermentativo de xilose, devendo, por isso, ser considerado (LIANG et al., 2014).

O requerimento de oxigênio durante a fermentação da xilose é frequentemente relacionado ao aparente desequilíbrio redox. Em condições anaeróbicas, devido a

diferença de cofator das duas enzimas, ou seja, uma requer NADPH e outra NAD^+ , ocorre um acúmulo de NADP^+ e NADH. O NADP^+ pode ser reduzido via frutose-6-fosfato, porém esse sistema, em algumas leveduras, não reoxida NADH em ausência de oxigênio, levando à liberação de xilitol. Como essas leveduras não tem atividade transhidrogenase ($\text{NADH} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$) o equilíbrio não pode ser obtido por essa rota (**Figura 1**). Entretanto, *S. stipitis*, *C. shehatae* e *P. tannophilus* tem atividade de XR com dupla especificidade pelo co-fator o que alivia o balanço redox e permite produção de etanol em anaerobiose, sem o acúmulo de xilitol (BRUINENBERG et al., 1983; VAN VLEET; JEFFRIES, 2009).

Pelo motivo de cada grupo de leveduras ter um perfil de resposta em função do equilíbrio redox e presença de oxigênio, a avaliação desse parâmetro deve ser feita para cada linhagem estudada.

A xilulose 5-fosfato formada é metabolizada pela via das pentoses fosfato. Essa via, que ocorre na grande maioria dos eucariotos, tem a função de suprir as necessidades de NADPH, ribose-P e eritrose-4-P para as vias de síntese normais das células. Em geral, cerca de 0,9 a 10% da glicose é metabolizada por essa via. Em leveduras fermentadoras de xilose, a totalidade do açúcar é metabolizada pela via das pentoses fosfato com conversão de xilulose-5-P a frutose que é direcionada por intersecção da via glicolítica a piruvato. A partir do piruvato, rotas oxidativas ou fermentativas podem se seguir. (BRUINENBERG et al., 1983; VAN VLEET; JEFFRIES, 2009).

Apesar de a maioria das pesquisas serem concentradas em D-xilose, a arabinose está presente em concentrações significantes em muitas hemiceluloses como os resíduos da cana-de-açúcar ou espécies herbáceas. As vias de assimilação de arabinose também podem ser observadas na **Figura 2**. A primeira demonstração de fermentação de L-arabinose em etanol por uma levedura foi realizada em 1996 (DIEN et al., 1996), enquanto a produção de etanol a partir de D-xilose é amplamente relatada já no início da década de 80 (GONG et al., 1981, 1983; TOIVOLA et al., 1984; NIGAM et al., 1985).

Assim como acontece no metabolismo de D-xilose, a L-arabinose será convertida a D-xilulose-5-fosfato, porém por meio de cinco etapas. Primeiramente, ocorrem quatro reações redox: duas oxidações acopladas ao consumo de NAD^+ , nas quais a L-arabinose é primeiramente convertida a L-arabinitol pela enzima aldose redutase (EC 1.1.1.21) e, após, a L-arabinitol-4-desidrogenase (EC 1.1.1.12) forma L-xilulose a partir do L-arabinitol. Em seguida, ocorrem duas reduções com consumo de NADPH, a L-xilulose, por meio da L-xilulose redutase (EC 1.1.1.10), é transformada em xilitol, que, por meio da D-xilulose

redutase (EC 1.1.1.9) é modificado a D-xilulose. Esta, por sua vez, é fosforilada, pela xiluloquinase (EC 2.7.1.17), a D-xilulose-5-fosfato, que adentra na via das pentoses fosfato, assim como ocorre com a D-xilose (RICHARD et al., 2003).

Existem diversos estudos com as espécies *S. cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*, além de cepas de *Kluyveromyces marxianus* e *Candida tropicalis* visando o aprimoramento do processo de produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos, bem como o melhoramento das linhagens por mutação (WATANABE et al., 2011; TOMITAKA et al., 2013; WANG et al., 2015).

Estudos de fermentação empregando hidrolisados de diferentes tipos de materiais lignocelulósicos, como bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz e de trigo, madeira e plantas herbáceas, foram realizados com as principais leveduras fermentadoras de xilose, alguns empregando processos de adaptação das cepas ao hidrolisado, adição de xiloses isomerase ou enriquecimento nutricional. Os resultados mostram fatores de rendimento de substrato em etanol (Yp/s) que variam de 0,2 a 0,44 g/g, sendo que esses valores correspondem a 39 e 86% do máximo teórico (LINDEN; HAHN-HAGERDAL, 1989; SREENATH; JEFFRIES, 2000; NIGAM, 2001; BALLESTEROS et al., 2004; GARCÍA MARTÍN et al., 2010; SINGH et al., 2014; HICKERT et al., 2014).

Recentemente, vários grupos de pesquisas têm se concentrado na Engenharia Genética da espécie *S. cerevisiae* para que esta seja capaz de produzir etanol a partir de pentoses, uma vez que esta levedura é muito bem adaptada ao processo de fermentação alcoólica, apresentando altos rendimentos. Entretanto ainda não se obteve a linhagem ideal para ser aplicada industrialmente, a produtividade e rendimento de etanol por essas cepas é semelhante à de algumas que naturalmente fermentam xilose (GUO; JIANG, 2013; HECTOR et al., 2013; KATO et al., 2013; MOON et al., 2013). Assim, é importante que a busca por novas estirpes continue, principalmente porque o estudo destas leva ao conhecimento do metabolismo de pentoses das leveduras e serve como fonte de sistemas gênicos envolvidos (LORLIAM et al., 2013; CADETE et al., 2013; MORAIS et al., 2013).

3. Fatores ambientais que influenciam o processo de fermentação alcoólica

O sucesso do processo de fermentação alcoólica depende da eficiência do microrganismo que realiza a produção de etanol, que pode ser influenciada por diversos fatores ambientais. Uma vez identificado um microrganismo capaz de realizar a produção de determinado metabólito de interesse, é importante que estes parâmetros sejam

estudados, já que podem variar de acordo com as características da espécie e do local de onde a linhagem foi isolada.

Além disso, cepas autóctonas presentes no processo de fermentação também podem influenciar a qualidade do produto final, muitas vezes de forma negativa. Assim, se faz necessário também o estudo dessas, de forma a controlar o seu desenvolvimento e metabolismo durante o processo.

A seguir é discutido alguns dos fatores ambientais que podem influenciar as leveduras fermentadoras de pentoses e, a seguir, o desafio de controlar cepas de *Dekkera/Brettanomyces* que possuem alta capacidade de adaptação ao ambiente industrial de fermentação alcoólica, causando sérios problemas de contaminação.

3.1. Fatores ambientais que influenciam a fermentação alcoólica de pentoses

Alguns fatores do processo de produção de etanol a partir de pentoses influenciam fortemente os rendimentos e produtividades de etanol durante a fermentação. Entre eles estão a quantidade de oxigênio disponível, pH, temperatura, concentração celular inicial e suplementação do meio de cultivo com nutrientes. Além disso, deve-se levar em consideração a presença de compostos que são gerados por algumas metodologias de processos de pré-tratamento para hidrólise do material lignocelulósico que são considerados inibidores do desempenho das leveduras em processo fermentativo (PARAJÓ et al., 1998). Muitos grupos de pesquisas vêm estudando a resposta das cepas de leveduras a esses fatores, abordando tanto leveduras que naturalmente fermentam pentoses quanto cepas modificadas geneticamente para tal função, conforme detalhado a seguir.

Dentre os parâmetros estudados, a variável de controle mais importante nesta bioconversão é o nível de aeração, que afeta as rotas bioquímicas envolvidas na metabolização de xilose, uma vez que o metabolismo de xilose em leveduras é parcialmente regulado pela disponibilidade de oxigênio (ROBERTO et al., 1999; HANLY; HENSON, 2013; BELLIDO et al., 2013).

Estudos com a utilização de inibidores respiratórios comprovam a necessidade de oxigênio na assimilação de xilose, enquanto a glicose é suficientemente assimilada pela via de fermentação alcoólica (LERTWATTANASAKUL et al., 2013). A enzima xilose redutase (XR) tem maior afinidade por NADPH do que por NADH, enquanto xilitol desidrogenase (XDH) utiliza somente NAD⁺, essa diferença de especificidade ao co-fator resulta em um desequilíbrio de reciclagem dos cofatores. A regeneração do co-fator

NADPH ocorre na via das Pentoses-Fosfato enquanto a regeneração de NAD^+ , a partir de NADH, ocorre na cadeia respiratória, tendo o oxigênio como aceptor final de elétrons. Assim, sob condições de anaerobiose, não há completa re-oxidação de NADH a NAD^+ , promovendo um desequilíbrio redox. A baixa concentração de NAD^+ diminui a oxidação do xilitol a xilulose, induzindo a excreção de xilitol ao meio de cultura (DU PREEZ et al., 1989; JEFFRIES, 2006; LIANG et al., 2013).

Sob condição de anaerobiose, muito pouco ou nenhum etanol é produzido, entretanto, a melhor produtividade de etanol é favorecida por condições intermediárias de aeração, uma vez que condições de total aerobiose favorecem a produção de biomassa (BELLIDO et al., 2013). Fromanger e colaboradores (2010), avaliando o efeito da limitação de oxigênio em *C. shehatae* para xilose e glicose, realizaram fermentação com fase aeróbia e micro-aeróbia com diferentes concentrações de oxigênio, e observaram que as fermentações de xilose e glicose são diferentes em termos de distribuição de carbono. O crescimento em glicose foi menor do que em xilose e o maior rendimento em etanol a partir de xilose foi com índice de captação de oxigênio que corresponde a 13% da captação máxima, enquanto o maior rendimento de produção a partir de glicose foi com o menor índice de captação de oxigênio.

Algumas pesquisas buscam estratégias para amenizar o desequilíbrio redox utilizando-se de ferramentas biotecnológicas, como a Engenharia Metabólica. Um estado redox indesejável pode ser explorado para conduzir reações metabólicas desejáveis, até mesmo melhorando a produtividade e rendimento de etanol, tal como o excesso de NADH, que pode ser utilizado para conduzir a redução do acetato em etanol (WEI et al., 2013).

Os rendimentos e produção de etanol também são influenciados pela concentração de açúcar no meio de cultivo. Análises de cinética da produção de etanol mostram que uma maior concentração de açúcar representa maior produção de etanol, porém os fatores de rendimento de g de etanol por g de substrato (Y_p/s) são maiores em quantidades de açúcares não tão altas. Na presença de altas quantidades de açúcares, uma parte maior do açúcar é destinada ao crescimento celular, diminuindo o Y_p/s para etanol. Nesse sentido, também é necessário buscar uma otimização entre concentração de açúcares e taxa de crescimento (UNREAN; NGUYEN, 2013; FARIAS et al., 2013).

Além da concentração total de açúcares, a proporção na mistura de glicose e xilose também influencia a produtividade de etanol, no geral, a assimilação da xilose é inibida pela presença da glicose, ocorrendo somente quando a glicose é exaurida do meio de cultivo (DU PREEZ, 1994; MATSUSHIKA; SAWAYAMA, 2013; DOS SANTOS et al., 2013).

A fonte de nitrogênio e sua quantidade também são fatores que podem aumentar a produção de etanol. Palnitkar e Lachke (1992) relataram que fontes orgânicas de nitrogênio, como ureia, aumentaram o rendimento de produção de etanol por *C. shehatae*, em comparação com fontes inorgânicas, ao passo que, entre as fontes inorgânicas, o sulfato de amônia, foi a que proporcionou o maior rendimento de etanol e a maior razão etanol: xilose. Por outro lado, Slininger et al. (2006) trabalhando com *S. stipitis*, observaram que o uso de uma proporção de 80% de ureia e 20% de aminoácidos (de um total de 0,15 mol.L⁻¹ de nitrogênio) promoveu maior crescimento e rendimento da fermentação quando comparado com ureia aplicada isoladamente ou uso de nutrientes minerais.

A suplementação do meio com nutrientes complexos também pode ser benéfica à produção de etanol. Estudos envolvendo experimentos com meios sintéticos ou hidrolisados lignocelulósicos enriquecidos com nutrientes complexos, tais como extrato de levedura e peptona, com frequência, relatam maior acúmulo de etanol (DU PREEZ, 1994; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; SILVA et al., 2010).

Outras formas de aumentar a utilização de xilose e produção de etanol por meio de suplementação nutricional também são encontradas. Park e colaboradores (2013) utilizando uma *S. cerevisiae* recombinante expressando xilose isomerase, relataram que a suplementação do meio de xilose com galactose, na proporção de 2:1, estimulou a utilização de xilose. Já Kim e colaboradores (2014) relataram aumento na produção de etanol por *S. stipitis* (de 10,92 a 14,5 g.L⁻¹) utilizando o ácido cítrico no pré-tratamento e, após neutralização, como única fonte de nitrogênio na subsequente fermentação.

Outra influência importante é a combinação entre temperatura e pH do ambiente de fermentação. Os microrganismos, que geralmente se encontram na condição unicelular, estão suscetíveis a drásticas variações ambientais e não conseguem manter constante suas temperaturas e pH internos. Desse modo, o crescimento de um microrganismo em temperatura ou pH fora da faixa considerada ótima para o espécime estudado leva a um estresse fisiológico.

Em temperaturas abaixo da ótima, o sistema de transporte, principalmente aquele associado a proteínas transportadoras, atua em velocidade aquém do ótimo reduzindo o fluxo de nutrientes para a célula. Além disso, a atividade enzimática é reduzida comprometendo todas as vias metabólicas. Por outro lado, quando em temperaturas muito acima da faixa de tolerância, as membranas citoplasmáticas entram em colapso e as enzimas podem ser desnaturadas. Porém, em temperaturas pouco acima do ótimo as células mantêm sua viabilidade e metabolismo funcionando às custas de adaptações nas

membranas e indução de proteínas mais termoestáveis, as quais requerem gastos energéticos (GOMES et al., 2007).

A condição unicelular também tem como consequência a alteração do pH intracelular dependendo do pH do meio externo. Para o equilíbrio iônico, a célula utiliza sistemas de transporte de H^+ (de dentro para fora ou fora para dentro) através de bombas H^+/K^+ que requerem gasto energético (MADIGAN et al., 2004).

Assim, a manutenção das condições ótimas de cultivo possibilita um melhor desempenho metabólico e rendimento nos processos fermentativos. Geralmente, as leveduras fermentadoras de pentoses são mesofílicas e fermentam em pH levemente ácido. As condições ótimas de produção de etanol para espécies de *Pichia* e *Candida*, encontram-se entre 30 a 32 °C e pH entre 4 e 6, sendo que esta faixa ótima de processo pode variar dependendo da cepa e dos componentes do substrato (DU PREEZ, 1994; OLIVEIRA, 2010).

Wilkins et al. (2008) analisaram os efeitos da temperatura (40 e 45 °C) e pH inicial (4,5, 5 e 5,5) na utilização anaeróbica de xilose por cepas termotolerantes de *Kluyveromyces marxianus*. Uma das cepas se destacou quanto à produção de etanol e xilitol e alcançou os maiores valores a 40 °C e pH inicial de 5,5. Porém, quando comparada às cepas de outros estudos, apresentou bom rendimento somente para produção de xilitol (0,54 g xilitol/g xilose), o rendimento de etanol foi de apenas 0,15 g etanol/g xilose.

Uma vez que a intensidade da toxicidade do ácido acético é pH-dependente, a maioria das fermentações realizadas com hidrolisado hemicelulósico catalisado por ácido, são conduzidas em valores de pH acima dos valores ótimos, a fim de minimizar o efeito inibitório do ácido acético (DU PREEZ, 1994; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Por fim, há que se levar em consideração os compostos capazes de inibir o crescimento e produção de etanol pela levedura. A liberação de açúcares monoméricos, por meio de certos métodos de pré-tratamento, é acompanhada pela geração de alguns compostos inibidores. Habitualmente, esses processos estão relacionados ao uso de reagentes químicos em condições drásticas de temperatura e/ou pressão e são mecanismos que tipicamente resultam em altos índices de rendimento de glicose em curto tempo de operação. Correspondem a tratamentos ácido, alcalino, hidrotérmico (*"liquid hot water"*-LHW) (GURGEL et al., 2014; YU et al., 2013; ROCHA et al., 2013), explosão a vapor (*"steam explosion"*-STEX) (OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014) e expansão da fibra por amônia (*"ammonia fiber explosion"*-AFEX) (LI et al., 2010; KRISHNAN et al., 2010). Os compostos inibidores produzidos, tais como ácido acético,

ácidos fórmicos e levulínicos, compostos fenólicos, e aldeídos furanos, principalmente furfural e 5- hidroximetilfurfural, afetam fortemente o desempenho da fermentação. O potencial de inibição destes compostos deve ser considerado em relação à sua concentração no hidrolisado, além disso, a sensibilidade do microrganismo ao hidrolisado varia com a linhagem e condições da fermentação, tais como temperatura, pH, aeração e fatores nutricionais (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; ALMEIDA et al., 2007).

O Ácido acético é formado pela hidrólise do grupo acetil presente na hemicelulose e ácidos fórmicos e levulínicos são produtos da degradação do açúcar. No citoplasma, dissocia-se em hidrônio e íons acetato, diminuindo o pH intracelular, resultando no aumento do consumo de ATP pela levedura. Nessas condições, parte do ATP que seria utilizado para crescimento ou fermentação é desviado para manutenção do pH interno (NARENDRANATH et al., 2001).

Furfural e 5-hidroximetilfurfural são formados pela degradação de pentoses e hexoses, respectivamente e afetam os microrganismos por reduzirem suas atividades enzimáticas e biológicas, alterando o DNA e inibindo a síntese de RNA e proteínas (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988; MODIG et al., 2002).

Compostos fenólicos são formados principalmente pela degradação parcial da lignina, podem inibir a bioconversão, inibindo a atividade enzimática, comprometendo a integridade da membrana e afetando as suas propriedades, como a barreira seletiva (HEIPIEPER et al., 1994). A toxicidade dos compostos fenólicos consiste na ação destes sobre as membranas biológicas. A presença destes compostos afeta a integridade da membrana plasmática e interfere na sua seletividade (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; DUARTE et al., 2005). Pereira et. al. (2011) avaliaram a ação inibitória do ácido ferúlico e seringaldeído sobre o metabolismo da levedura *Candida guilliermondii* durante a bioconversão de xilose em xilitol e demonstraram que estes compostos foram capazes de afetar o metabolismo e crescimento da levedura.

Diversos métodos de desintoxicação do hidrolisado lignocelulósico foram estudados a fim de aumentar a fermentabilidade, tais como adição de carbono ativado, extração com solventes orgânicos, troca iônica, exclusão iônica e peneiramento molecular, porém a desintoxicação aumenta o custo do processo, o ideal é que não seja necessário. Uma alternativa à desintoxicação é adaptar o microrganismo ao hidrolisado lignocelulósico, com repetidas reciclagens, aumentando a habilidade de crescer no hidrolisado e a produtividade de etanol (PAREKH et al., 1986; ROBERTO; LACK, 1991; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

É difícil estabelecer uma concentração máxima permissível de cada inibidor presente no meio, uma vez que esta é fortemente dependente de fatores como o microrganismo a ser utilizado e o seu grau de adaptação ao processo fermentativo empregado, além da presença simultânea de vários outros inibidores. Contudo, concentrações de furfural inferiores a 1 g.L⁻¹ têm sido descritas como, praticamente, inofensivas. O ácido acético apresenta toxicidade em concentrações superiores a 3 g.L⁻¹, enquanto os compostos fenólicos inibem os microrganismos da fermentação mesmo em quantidades baixas (menor que 1 g.L⁻¹) (ROBERTO; LACK, 1991; DELGENES et al., 1996; PARAJO et al., 1998).

O acúmulo de etanol também pode gerar múltiplos efeitos indesejáveis, incluindo diminuição da captação de nutrientes e inibição de enzimas-chave. Em muitos casos, a inibição proveniente da ação do etanol é exacerbada quando na presença de outros subprodutos da fermentação, como acetaldeído e acetato, e outros estresses, como temperatura e pH (BAI et al., 2008). Quando as células de leveduras são cultivadas em elevadas temperaturas, pode ocorrer queda na tolerância a etanol. Além disso, em cultivos com temperaturas acima de 37°C observa-se uma drástica diminuição na produtividade (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; GHINDEA et al., 2010).

Entre as possíveis estratégias para desenvolver estirpes mais robustas para produção de bioetanol e diminuir o problema de inibição desses compostos estão o engenheiramento do sistema redox (ASK et al., 2013), Engenharia Genética, mutação e Engenharia Evolutiva (ZUO et al., 2013; DEMEKE et al., 2013; LULU et al., 2013; SEHNEM et al., 2013; ZHA et al., 2014; SATO et al., 2014), expressão de transaldolase (TAL) e álcool desidrogenase (ADH) (ISHII et al., 2013; HASUNUMA et al., 2014), a utilização de compostos como CaO, resinas de troca iônica e enzimas como lacase a fim de desintoxicar o pré-tratado (TAKAHASHI et al., 2013; MORENO et al., 2013ab), e o desenvolvimento de cepas tolerantes a inibidores por meio de adaptação ao hidrolisado (FAN et al., 2013).

A adaptação de células é uma ferramenta que pode ser utilizada também para aumentar a tolerância das cepas ao próprio etanol. Liang e colaboradores (2013) utilizaram fermentação contínua com retenção de células e conseguiram com que cepas de *S. stipitis* aumentassem em 6 vezes a viabilidade durante cultivo em xilose e 60 g.L⁻¹ de etanol por 2 h.

Watanabe et al (2011), realizando mutação por radiação UV com *S. stipitis*, obtiveram linhagens que apresentaram tolerância a 7% de etanol sob condições aeróbias.

Já Parekh e Wayman (1986), trabalhando com *Candida shehatae*, relataram tolerância a etanol de até 100 g.L⁻¹.

Acredita-se que há uma ligação entre as três formas de resistência ao estresse (osmo-, termo- e etanol-tolerância), ou seja, se uma linhagem tem uma maior tolerância à temperatura quando comparada com outras linhagens do mesmo microrganismo, comparativamente, será também mais osmo- e termo-tolerante (LALUCE et al., 1993; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Diante do exposto, observa-se a importância do estudo das características das cepas, uma vez que esse conhecimento contribuiu tanto para o aumento do domínio acerca da fermentação de pentoses quanto permite a identificação de cepas promissoras ou com características diferenciadas e interessantes que possam ser utilizadas nesse ou outros processos industriais.

3.2. *Dekkera/Brettanomyces* como contaminantes do processo fermentação alcoólica.

Durante o processo industrial de fermentação alcoólica, microrganismos presentes na matéria-prima podem atuar de forma devastadora e representam um sério desafio para a indústria. No ambiente de vinicultura, as leveduras são os principais contaminantes e possuem a capacidade de afetar até mesmo vinhos que foram processados e embalados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação. Estas leveduras deteriorantes de vinhos incluem diversos gêneros, tais como *Hansenula*, *Candida*, *Pichia*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Saccharomyces*, sendo que as espécies *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Saccharomyces cerevisiae* são as responsáveis pela maior parte da deterioração de vinhos embalados ou em processo de envelhecimento, causando formação de filmes, sedimentos, nebulosidade, produção de gás, e/ou sabores indesejados que comprometem a qualidade do produto final (LOUREIRO; MALFEITO-FERREIRA, 2003).

Dekkera bruxellensis e *Brettanomyces bruxellensis* correspondem à mesma espécie, porém em fases reprodutivas diferentes. *Dekkera* é a fase teleomórfica, ou seja, a fase sexuada, produz esporos. Já *Brettanomyces* se trata da fase anamorfa, a fase assexuada. O controle de crescimento dessas leveduras têm sido um desafio para os produtores de vinho. Elas são responsáveis pela produção de sabores desagradáveis e aromas rançosos ao vinho, descritos como “suor a cavalo”, “estábulo” ou “animal” (OELOFSE et al., 2008). A produção desses aromas é realizada a partir da assimilação

dos ácidos hidroxicinâmicos ou ácidos fenólicos, que geralmente estão presentes na parede celular da uva como ester tartárico conjugado. Se encontram em concentrações de 20 a 50 mg/L e são liberados no suco de uva durante o esmagamento (BARANOWSKI et al., 1980; GOLDBERG et al., 1998; SHINOHARA et al., 2000).

No contexto da produção de bioetanol, *D. bruxellensis* é comumente citada como uma das leveduras contaminantes mais importantes, especialmente na indústria brasileira (DE SOUZA LIBERAL et al., 2005, 2007; BASÍLIO et al., 2008; PEREIRA et al., 2012). O método de reciclagem de células utilizado na indústria de etanol combustível, no Brasil, permite que haja contaminação mesmo com poucas células tendo acesso ao mosto, já que as células de *D. bruxellensis* acabam sendo recicladas juntamente com as células de *S. cerevisiae*, resultando em grandes perdas na produção de etanol quando em escala industrial (MENEZHIN et al., 2013).

Nos últimos anos, o número de estudos sobre a fisiologia das leveduras *D. bruxellensis* tem aumentado, devido ao seu papel importante como contaminante em processos fermentativos industriais, bem como seu potencial uso na produção de etanol a partir de hidrolisado de lignocelulose, visto sua notável capacidade de adaptação ao ambiente industrial (BLOMQUIST et al., 2010; PEREIRA et al., 2012; LEITE et al., 2013).

A presença de *Brettanomyces* em vinícolas se inicia principalmente a partir de abelhas e é espalhada em barris de vinho a granel a partir de outras vinícolas, o que estabelece populações onipresentes extremamente difíceis de erradicar. Sua estratégia de desenvolvimento é vagarosa e oportuna, ao invés de competir com *Saccharomyces* durante a fermentação primária, ela emerge depois, com o tempo. Além disso, *Brettanomyces* emprega uma estratégia contaminante parasitária, secundária, falta-lhe a capacidade genética para sintetizar a biotina, o ácido fólico e outros micronutrientes essenciais; dependendo que outros microrganismos liberem estes compostos durante a autólise (SMITH, 2013).

A metabolização dos diferentes ácidos hidroxicinâmicos (p-cumárico, ferúlico, caféico) por *Brettanomyces* é realizada por meio da ação de duas enzimas. Inicialmente a enzima hidroxicinamato descarboxilase transforma os ácidos hidroxicinâmicos em hidroxiestirenos, ou vinilfenóis, que serão reduzidos a derivados etil pela enzima vinilfenol redutase produzindo assim os etilfenóis. O ácido p-cumárico, por exemplo, é descarboxilado a 4-vinilfenol pela enzima hidroxicinamato descarboxilase e em seguida reduzido a 4-etilfenol por ação da enzima vinilfenol redutase (BENITO et al., 2009). A produção inicial de vinilfenóis não é exclusiva de *Brettanomyces*, os ácidos

hidroxicinâmicos também podem ser metabolizados por outras leveduras, tais como *S. cerevisiae* (CHATONNET et al., 1993; HUANG et al., 1993) e *P. guilliermondii* (BARATA et al., 2006), assim como bactérias, incluindo *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis* e *E. coli* (CAVIN et al., 1997; BARTHELMEBS et al., 2000; VAN BEEK; PRIEST, 2000). Entretanto poucos microrganismos podem produzir os derivados 4-etil, sendo que *Brettanomyces* é destaque na produção desses compostos e pode adicionalmente converter 4-vinilfenol livre em 4-etilfenol e, portanto, é apta a utilizar 4-vinilfenol produzido por outros microrganismos do vinho (DIAS et al., 2003; BARATA et al., 2006).

A fim de combater essas leveduras deteriorantes e alcançar uma estabilidade microbiológica nos vinhos, tratamentos químicos, físicos e térmicos podem ser utilizados. A adição de dióxido de enxofre ao vinho é o tratamento mais comum, porém, hoje em dia há uma tendência em reduzir seus níveis em vinhos. Pessoas portadoras de enxaqueca relatam o agravamento da crise após tomar vinhos, possivelmente devido à presença deste conservante, entretanto, não há conclusões definitivas sobre esse elemento ser o causador das dores.

O dióxido de enxofre, no vinho, pode ser encontrado na forma livre (molecular, sulfito e bissulfito) e combinado com componentes do vinho, tais como açúcar, ácidos urônico e cetônico e acetaldeído. A forma SO_2 livre é a fração que possui eficiente ação antilevedura e o convencional para controle de *Brettanomyces* é a manutenção de SO_2 livre a um nível de cerca de 30 ppm em pH relativamente baixo. Isso porque, na presença de íons H^+ , ocorre a reação destes com a forma HSO_3^- , produzindo SO_2 e H_2O , aumentando a concentração da forma SO_2 e, portanto, aumentando o efeito do dióxido de enxofre sobre as leveduras (SMITH, 2013).

A ação antileveduras, no caso do SO_2 , ocorre quando o composto entra na célula e quebra a atividade de enzimas. Forma ligações com aldeídos, cetonas, tiamina e cisteína presentes em resíduos de proteína. O sulfito forma ligações com NAD, nucleosídeos, nucleotídeos e lisa ligações dissulfetos em proteínas nativas, um processo chamado sulfitolise (“WHO Food Additives Series 21”). Além disso, o sulfito, foi apontado como capaz de realizar mudanças no perfil de transcrição na fase exponencial de *S. cerevisiae*, essas mudanças envolvem a supra-regulação de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e sub-regulação de genes com funções em biossíntese de proteínas e transcrição (PARK; HWANG, 2008).

Algumas estratégias de controle visam a manutenção de níveis baixos constantes das populações de *Brettanomyces*, já que quantidades pequenas de etilfenóis não só são

inofensivas como podem agregar resultados positivos na qualidade do vinho. Dessa forma, métodos para remoção ou inativação total das células, como tratamento térmico do vinho ou a filtração estéril, devem ser utilizados somente caso o número de *B. bruxellensis* aumente (BARATA et al., 2008a).

De fato, a quantidade de etilfenol capaz de produzir estragos no vinho é controversa, relata-se que a presença de concentrações tão baixas quanto 425 µg/L já podem impactar as propriedades sensoriais do vinho, porém a percepção desses compostos é dependente de outros componentes do vinho e da sensibilidade de quem o degusta (CHATONNET et al., 1992; SMITH, 2013). Baixas concentrações de 4-vinilfenol, 4-vinilguaiaicol e 4-vinilseringol também podem ter inofensivas ou mesmo desejáveis propriedades aromáticas, tais como apimentado, amadeirado e doce (HERESZTYN, 1986; VAN BEEK; PRIEST, 2000). No entanto, quando presentes em concentrações maiores que 725 µg/L, as contribuições para aroma e sabor são deletérias na qualidade do vinho. Maior concentração de 4-vinilfenol é comumente associada com aromas indesejáveis, como medicinal ou fenólico (CHATONNET et al., 1993).

Outro desafio no controle de *Brettanomyces* é que, muitas vezes, essa levedura não é detectada por meio de técnicas baseadas em cultivo, no entanto, alguns vinhos apresentam aromas associados aos compostos fenólicos produzidos por elas alguns meses ou anos depois do engarrafamento, um dilema que poderia potencialmente ser explicado pela habilidade de *Brettanomyces* entrar em um estado de “viável porém não cultivável” (VBNC - do inglês “*viable but non-culturable*”) (AGNOLUCCI et al., 2010; SERPAGGI et al., 2012). Este estado é caracterizado pela incapacidade de células se reproduzirem em meio de cultura mesmo estando vivas e mantendo a atividade metabólica. A síntese macromolecular e taxa de respiração diminuem quando a célula entra no estado de VBNC, por outro lado, os níveis de ATP e potencial de membrana geralmente permanecem altos (LINDBÄCK et al., 2009; LAI et al., 2009). Aliado a isso, alguns estudos sugerem que o principal efeito do SO₂ livre possa ser reduzir a culturabilidade ao invés de realmente matar as células, sugerindo que este composto induz as células ao estado de VBNC (DU TOIT et al., 2005; AGNOLUCCI et al., 2010).

Existe uma outra abordagem de ideias que busca o domínio de *Brettanomyces* aliado ao enriquecimento do produto, utilizando o controle da levedura pela ausência de nutrientes e pelo equilíbrio microbiano devido à presença de outras espécies microbianas, de forma a alcançar a integração aromática por meio de uma boa estrutura do vinho, obtida pela positiva interação de metabólitos produzidos pelas diferentes espécies. A ideia básica

é que em vinhos de boa estrutura, aromas microbianos que, isoladamente, apareceriam como elementos de deterioração, possam ser integrados, produzindo uma complexidade aromática positiva, de maneira que a interação de aromas varietais de legumes, carvalho e atividade microbiana produza uma estrutura fenólica adequada. De fato, a presença de outros microrganismos aparenta ser uma ferramenta útil no controle populacional. Quando *Brettanomyces* se encontra na presença de outras espécies microbianas normalmente presentes em vinhos, mantém-se em uma população de menos de 500 células.mL⁻¹. No entanto, quando a espécie é inoculada em vinhos esterilizados pode chegar a uma concentração de 10⁷ cels.mL⁻¹. (SMITH, 2013).

Além disso, alguns estudos indicam que *Brettanomyces* pode ser fortemente influenciada pelos fatores ambientais. Dias e colaboradores (2003) caracterizaram o efeito de uma variedade de fatores sobre a produção de 4-etilfenóis por *D. bruxellensis*, em meio sintético e sucos de uva, determinando a produção de fenóis voláteis em condições enológicas, como a influência da fonte de carbono e o teor de etanol. Já Chandra e colaboradores (2014) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para explicar como o padrão de crescimento de *D. bruxellensis* e a produção de 4-etilfenol foram afetados por dióxido de enxofre, etanol e glicose. Nenhuma interação entre glicose e dióxido de enxofre ou etanol foi observada no crescimento. No entanto, foi notada uma interação negativa do dióxido de enxofre com etanol na produção de 4-etilfenol. Além disso, demonstraram que os baixos níveis de glicose, utilizados em vinhos tintos para dar um paladar mais suave, nem sempre aumentam a susceptibilidade à deterioração do vinho por causa metabolismo da espécie. Por outro lado, Barata e colaboradores (2008b) demonstraram que *D. bruxellensis* não é mais resistente do que *S. cerevisiae* para os principais inibidores, como o etanol e dióxido de enxofre e sugeriram que, provavelmente, mecanismos subjacentes à capacidade de sobreviver em ambiente pobre em nutrientes são a chave para explicar a sua proliferação, quando o ambiente se torna menos estressante.

D. bruxellensis possui vantagem de utilizar nutrientes que *S. cerevisiae* não consegue, como por exemplo o nitrato, característica que é utilizada na taxonomia do gênero (BARNETT et al., 2002; DE BARROS PITA et al., 2011). A utilização de nitrato determina, nessa espécie, um padrão diferente de produtos de fermentação, em comparação com a utilização de amônio. A assimilação de nitrato suprime o Efeito Custer, que consiste na inibição da fermentação alcoólica sob condição anaeróbica (GALAFASSI et al., 2013). O efeito Custer é atribuído a um desbalanço redox causado pela redução de

NAD⁺ durante a oxidação de acetaldeído a ácido acético (Ciani & Ferraro, 1997). A via de assimilação de nitrato nessas leveduras é composta por transportadores de alta afinidade e duas enzimas redutases, a nitrato e a nitrito redutase. A redução da molécula de nitrato por essas enzimas resulta em amônia e reoxidação de 4 moléculas de NAD(P)H, aliviando o desequilíbrio redox que ocasiona o Efeito Cluster (SIVERIO, 2002).

A espécie *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* também possui características diferenciadas com relação a espécies não-*Saccharomyces*, como por exemplo a capacidade de utilizar compostos pouco comuns como fontes de carbono e nitrogênio, a tolerância a etanol e pH baixo, bem como a sua excelente adaptação ao ambiente industrial (JOLLY et al., 2006).

Estudar a fundo as características dessa espécie pode ser essencial para obter sucesso no controle dessa levedura contaminante, ou ainda pode possibilitar novas alternativas para utilização dessa espécie em favor da Biotecnologia. Assim, o presente trabalho buscou avaliar a fisiologia da cepa *B. bruxellensis* 2211 com relação a parâmetros fermentativos, visando controlar seu crescimento e produção de etilfenóis, para prevenir a contaminação de vinhos.

OBJETIVOS

1. Gerais

O presente trabalho teve por objetivos gerais o estudo do comportamento fisiológico de estirpes de leveduras frente a parâmetros fermentativos e influência de compostos do meio, visando processos de fermentação alcoólica.

2. Específicos

- desenvolver uma metodologia de triagem em diversas cepas de leveduras por meio da adaptação de um teste realizado em placas, de rápido resultado, para identificar aquelas capazes de produzir etanol a partir de xilose;

- diagnosticar as cepas promissoras em fermentação de xilose por meio desse processo de triagem;

- estudar essas estirpes promissoras com relação a tolerância a etanol, acidez e compostos conhecidos como inibidores do processo de fermentação, como furfurais e compostos fenólicos, comumente encontrados em hidrolisados de lignocelulósicos;

- avaliar o desempenho das leveduras promissoras durante processo de fermentação alcoólica, com xilose em meio semi-sintético, empregando diferentes condições de temperatura, pH, concentração celular inicial e concentração de nutrientes.

- analisar a fisiologia e crescimento da estirpe *Brettanomyces bruxellensis* ISA 2211 na variação de fatores nutricionais, etanol e SO₂, visando evitar o crescimento populacional e a produção de etilfenóis para prevenir a deterioração de vinhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDINIFAR, S.; KARIMI, K.; KHANAHMADI, M.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 828–833, 2009.
- AGNOLUCCI, M.; REA, F.; SBRANA, C.; et al. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 76–80, 2010.
- ALMEIDA, J. R.; TOBIAS MODIG, A. P.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND¹, G. L.; F, M. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, p. 1115–1121, 2007.
- ALMEIDA, M. N. DE; GUIMARÃES, V. M.; FALKOSKI, D. L.; et al. Direct ethanol production from glucose, xylose and sugarcane bagasse by the corn endophytic fungi *Fusarium verticillioides* and *Acremonium zeae*. **Journal of Biotechnology**, v. 168, p. 71–77, 2013.
- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba, Ed. Fermentec, 448p, 2005.
- ASK, M.; BETTIGA, M.; MAPELLI, V.; OLSSON, L. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 22–34, 2013.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89–105, 2008.
- BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1843–1848, 2004.
- BARANOWSKI, J. D.; DAVIDSON, P. M.; NAGEL, C. W.; BRANEN, A. L. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by natural occurring hydroxycinnamates. **Journal of Food Science**, v. 45, p. 592–594, 1980.
- BARATA, A.; CALDEIRA, J.; BOTELHO, R.; et al. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 201–207, 2008b.
- BARATA, A.; NOBRE, A.; CORREIA, P.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Growth and 4-ethylphenol production by the yeast *Pichia guilliermondii* in grape juices. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, p. 133–138, 2006.

BARATA, A.; PAGLIARA, D.; PICCININNO, T.; et al. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine.

FEMS Yeast Research, v. 8, p. 1097–102, 2008a.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge: Cambridge University Press, 1002p. 2002.

BARTHELMEBS, L.; DIVIES, C.; CAVIN, J. F. Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3368–75, 2000.

BASÍLIO, A. C. M.; ARAÚJO, P. R. L. DE; MORAIS, J. O. F. DE; et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, p. 322–326, 2008.

BELLIDO, C.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 51–58, 2013.

BENITO, S.; PALOMERO, F.; MORATA, A.; CALDERÓN, F.; SUÁREZ-LEPE, J. A. Factors affecting the hydroxycinnamate decarboxylase/vinylphenol reductase activity of *dekkera/brettanomyces*: Application for *dekkera/brettanomyces* control in red wine making. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. 15–22, 2009.

BLOMQUIST, J.; EBERHARD, T.; SCHNÜRER, J.; PASSOTH, V. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1487–1497, 2010.

BRUINENBERG, P. M.; DIJKEN, J. P. VAN; SCHEFFERS, W. A. A Theoretical Analysis of NADPH Production and Consumption in Yeasts. **Microbiology**, v. 129, p. 953–964, 1983.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J. E.; et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel (D)-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 421–431, 2013.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Ed. ArtMed, e. 3, cap. 12, p. 428-430, 2000.

CAVIN, J.-F.; BARTHELMEBS, L.; GUZZO, J.; et al. Purification and characterization of an inducible p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*. **Fems Microbiology Letters**, v. 147, p. 291–295, 1997.

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

CHANDRA, M.; BARATA, A.; FERREIRA-DIAS, S.; MALFEITO-FERREIRA, M.;

- LOUREIRO, V. A Response Surface Methodology study on the role of factors affecting growth and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis* ISA 2211 in wine. **Food Microbiology**, v. 42, p. 40–46, 2014.
- CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, p. 295–331, 1998.
- CHATONNET, P.; DUBOURDIE, D.; BOIDRON, J.; PONS, M. The origin of ethylphenols in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 60, p. 165–178, 1992.
- CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J.; LAVIGNE, V. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, p. 191–202, 1993.
- CHEN, T.; ZHU, N. e XIA, H. Aerobic production of succinate from arabinose by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. **Bioresource technology**, doi:10.1016/j.biortech.2013.10.017, 2013.
- CHENXI, Z.; WENJING, L.; HONGTAO, W.; XIANGLIANG, P. Simultaneous hydrogen and ethanol production from a mixture of glucose and xylose using extreme thermophiles I: Effect of substrate and pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, p. 9701–9706, 2013.
- CRESPO, C. F.; BADSHAH, M.; ALVAREZ, M. T.; MATTIASSON, B. Ethanol production by continuous fermentation of d-(+)-cellobiose, d-(+)-xylose and sugarcane bagasse hydrolysate using the thermoanaerobe *Caloramator boliviensis*. **Bioresource Technology**, v. 103, p. 186–191, 2012.
- CUNHA-PEREIRA, F. DA; HICKERT, L. R.; SEHNEM, N. T.; et al. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4218–4225, 2011.
- DE BARROS PITA, W.; LEITE, F. C. B.; DE SOUZA LIBERAL, A. T.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS, M. A. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.100, p. 99-107, 2011.
- DE SOUZA LIBERAL, A. T.; BASÍLIO, A. C. M.; DO MONTE RESENDE, A.; et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 538–547, 2007.
- DE SOUZA LIBERAL, A. T.; DA SILVA FILHO, E. A.; DE MORAIS, J. O. F.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS, M. A. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 19–23, 2005.
- DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*,

Zymomonas mobilis, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 220–225, 1996.

DEMEKE, M. M.; DIETZ, H.; LI, Y.; et al. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 89-112, 2013.

DIAS, L.; PEREIRA-DA-SILVA, S.; TAVARES, M.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. **Food Microbiology**, v. 20, p. 377–384, 2003.

DIEN, B. S.; KURTZMAN, C. P.; SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Screening for L-arabinose fermenting yeasts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57-58, p. 233–242, 1996.

DOS SANTOS, V. C.; BRAGANÇA, C. R. S.; PASSOS, F. J. V.; PASSOS, F. M. L. Kinetics of growth and ethanol formation from a mix of glucose/xylose substrate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 153–161, 2013.

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

DU PREEZ, J. C.; VAN DRIESSEL, B.; PRIOR, B. A. Effect of aerobiosis on fermentation and key enzyme levels during growth of *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* and *Candida tenuis* on D-xylose. **Archives of Microbiology**, v. 152, p. 143–147, 1989.

DU TOIT, W. J.; PRETORIUS, I. S.; LONVAUD-FUNEL, A. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 862–871, 2005.

DUARTE, L. C.; CARVALHEIRO, F.; NEVES, I.; GÍRIO, F. M. Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 413–425, 2005.

FAN, C.; QI, K.; XIA, X.-X.; ZHONG, J.-J. Efficient ethanol production from corncob residues by repeated fermentation of an adapted yeast. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 309–315, 2013.

FARIAS, D.; ANDRADE, R. R. DE; MAUGERI-FILHO, F. Kinetic Modeling of Ethanol Production by *Scheffersomyces stipitis* from Xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 361-379, 2013.

FROMANGER, R.; GUILLOUET, S. E.; URIBELARREA, J. L.; MOLINA-JOUE, C.; CAMELEYRE, X. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 437–445, 2010.

- GARCÍA MARTÍN, J. F.; CUEVAS, M.; BRAVO, V.; SÁNCHEZ, S. Ethanol production from olive prunings by autohydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*. **Renewable Energy**, v. 35, p. 1602–1608, 2010.
- GHINDEA, R.; CSUTAK, O.; STOICA, I.; TANASE, A. M.; VASSU, T. Production of xylitol by yeasts. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 15, p. 5217–5222, 2010.
- GOLDBERG, D. M.; TSANG, E.; KARUMANCHIRI, A.; SOLEAS, G. J. Quercetin and p-Coumaric Acid Concentrations in Commercial Wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 49, p. 142–151, 1998.
- GOMES, E.; ANDRÉS, M.; GUEZ, U.; MARTIN, N. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, p. 136–145, 2007.
- GONG, C. S.; CHEN, L. F.; FLICKINGER, M. C.; CHIANG, L. C.; TSAO, G. T. Production of Ethanol from d-Xylose by Using d-Xylose Isomerase and Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 430–436, 1981.
- GONG, C. S.; CLAYPOOL, T. A; MCCracken, L. D.; et al. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 85–102, 1983.
- GOTTUMUKKALA, L. D.; PARAMESWARAN, B. Growth and butanol production by *Clostridium sporogenes* BE01 in rice straw hydrolysate : kinetics of inhibition by organic acids and the strategies for their removal. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v.4, p. 277-283, 2014.
- GRABEK-LEJKO, D.; RYABOVA, O. B.; OKLEJEWICZ, B.; VORONOVSKY, A. Y.; SIBIRNY, A. A. Plate ethanol-screening assay for selection of the *Pichia stipitis* and *Hansenula polymorpha* yeast mutants with altered capability for xylose alcoholic fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 934–940, 2006.
- GUO, C.; JIANG, N. Physiological and enzymatic comparison between *Pichia stipitis* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on xylose fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 541–547, 2013.
- HANLY, T. J.; HENSON, M. A. Dynamic metabolic modeling of a microaerobic yeast co-culture: predicting and optimizing ethanol production from glucose/xylose mixtures. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 44-59, 2013.
- HASUNUMA, T.; ISMAIL, K. S. K.; NAMBU, Y.; KONDO, A. Co-expression of TAL1 and ADH1 in recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysates in the presence of furfural. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, p. 165–169, 2014.
- HE, Q.; LOKKEN, P. M.; CHEN, S.; ZHOU, J. Characterization of the impact of acetate and lactate on ethanolic fermentation by *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5955–5965, 2009.

- HECTOR, R. E.; DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; MERTENS, J. A. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-12, 2013.
- HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H.; BONT, J. A M. DE. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, v. 12, p. 409–415, 1994.
- HERESZTYN, T. Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. **Archives of Microbiology**, v. 146, p. 96–98, 1986.
- HICKERT, L. R.; CRUZ, M. M.; DILLON, A. J. P.; et al. Fermentation kinetics of acid–enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, and their co-cultivations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 61–67, 2014.
- HUANG, Z.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J. P. Microbial transformations of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2244–50, 1993.
- ISHII, J.; YOSHIMURA, K.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Reduction of furan derivatives by overexpressing NADH-dependent Adh1 improves ethanol fermentation using xylose as sole carbon source with *Saccharomyces cerevisiae* harboring XR-XDH pathway. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 2597–2607, 2013.
- JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 320–326, 2006.
- JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v. 27, p. 15–39, 2006.
- KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M. J. Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 653–658, 2006.
- KATO, H.; MATSUDA, F.; YAMADA, R.; et al. Cocktail δ -integration of xylose assimilation genes for efficient ethanol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, p. 333–336, 2013.
- KILIAN, S. G.; UDEN, N. VAN. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 545–548, 1988.
- KIM, I.; LEE, B.; PARK, J.-Y.; CHOI, S.-A.; HAN, J.-I. Effect of nitric acid on pretreatment and fermentation for enhancing ethanol production of rice straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 563–567, 2014.

LAI, C. J.; CHEN, S. Y.; LIN, I. H.; CHANG, C. H.; WONG, H. C. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*.

International journal of food microbiology, v. 135, p. 118–24, 2009.

LALUCE, C.; ABUD, C. L.; GREENHALF, W.; SANCHES PERES, M. F. Thermotolerance behavior in sugar cane syrup fermentations of wild type yeast strains selected under pressures of temperature, high sugar and added ethanol. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 851–856, 1993.

LEITE, F. C. B.; BASSO, T. O.; PITA, W. D. B.; et al. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, A major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 34–43, 2013.

LERTWATTANASAKUL, N.; SUPRAYOGI; MURATA, M.; et al. Essentiality of respiratory activity for pentose utilization in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 933–945, 2013.

LIANG, M.; DAMIANI, A.; HE, Q. P.; WANG, J. Elucidating Xylose Metabolism of *Scheffersomyces stipitis* for Lignocellulosic Ethanol Production. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, p. 38–48, 2014.

LIANG, M.; KIM, M. H.; HE, Q. P.; WANG, J. Impact of pseudo-continuous fermentation on the ethanol tolerance of *Scheffersomyces stipitis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, p. 319–326, 2013.

LINDBÄCK, T.; ROTTENBERG, M. E.; ROCHE, S. M.; RØRVIK, L. M. The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. **Veterinary Research**, v. 41, p. 08-17, 2009.

LINDEN, T.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulose hydrolysates with yeasts and xylose isomerase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 583–589, 1989.

LORLIAM, W.; AKARACHARANYA, A.; SUZUKI, M.; OHKUMA, M.; TANASUPAWAT, S. Diversity and Fermentation Products of Xylose-Utilizing Yeasts Isolated from Buffalo Feces in Thailand. **Microbes and Environments**, v. 28, p. 354–360, 2013.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 23–50, 2003.

LULU, L.; LING, Z.; DONGMEI, W.; et al. Identification of a xylitol dehydrogenase gene from *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. **Molecular Biotechnology**, v. 53, p. 159–69, 2013.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo, Ed.Pearson, Prentice Hall, ed 10, 624p. 2004.

MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S. Characterization of a Recombinant Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* Strain that Co-ferments Glucose and Xylose : I . Influence of the

Ratio of Glucose / Xylose on Ethanol Production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 169, p. 712–721, 2013.

MCMILLAN, J. D. **Xylose Fermentation to Ethanol: A Review**. Springfield: National Renewable Energy Laboratory, 1993.

MENEGHIN, M. C.; BASSI, A. P. G.; CODATO, C. B.; REIS, V. R.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Fermentative and growth performances of *Dekkera bruxellensis* in different batch systems and the effect of initial low cell counts in co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 30, p. 295–305, 2013.

MILLATI, R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M. J. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 294–300, 2005.

MODIG, T.; LIDÉN, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **The Biochemical Journal**, v. 363, p. 769–776, 2002.

MOON, J.; LEWIS LIU, Z.; MA, M.; SLININGER, P. J. New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 247–254, 2013.

MORAIS, C. G.; CADETE, R. M.; UETANABARO, A. P. T.; et al. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 19–28, 2013.

MORENO, A. D.; IBARRA, D.; BALLESTEROS, I.; FERNÁNDEZ, J. L.; BALLESTEROS, M. Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*—Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings. **Biochemical Engineering Journal**, v. 79, p. 94–103, 2013a.

MORENO, A. D.; TOMÁS-PEJÓ, E.; IBARRA, D.; BALLESTEROS, M.; OLSSON, L. In situ laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 337–343, 2013b.

MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Aguardente. In: **Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. (Venturini Filho, coord.). São Paulo, Ed. Edgard Blücher, p. 485-524, 2005.

NARENDRANATH, N. V; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 171-177, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 1328p. 2014.

- NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17–27, 2001.
- NIGAM, J. N.; IRELAND, R. S.; MARGARITIS, A.; LACHANCE, M. A. Isolation and screening of yeasts that ferment D-xylose directly to ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 1486–1489, 1985.
- NIJLAND, J. G.; SHIN, H. Y.; JONG, R. M. DE; et al. Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 168–178, 2014.
- OELOFSE, A.; PRETORIUS, I. S.; TOIT, M. DU. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 29, p. 128–144, 2008.
- OKAMOTO, K.; KANAWAKU, R.; MASUMOTO, M.; YANASE, H. Efficient xylose fermentation by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 96–100, 2012.
- OKAMOTO, K.; NITTA, Y.; MAEKAWA, N.; YANASE, H. Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 273–277, 2011.
- OLIVEIRA, F. P. **Avaliação da aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares**. 2010. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 312–331, 1996.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25–33, 2000.
- PALNITKAR, S.; LACHKE, A. Effect of nitrogen sources on oxidoreductive enzymes and ethanol production during D -xylose fermentation by *Candida shehatae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 258–260, 1992.
- PANAGIOTOU, G.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VILLAS-BOAS, S. G.; OLSSON, L. Fermentation performance and intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on a glucose-xylose mixture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 100–106, 2005.
- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 25–40, 1998.
- PAREKH, S.; YU, S.; WAYMAN, M. Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolysates for increased ethanol production. **Applied Microbiology and**

Biotechnology, v. 25, p. 300–304, 1986.

PARK, H.; HWANG, Y. S. Genome-wide transcriptional responses to sulfite in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Microbiology**, v. 46, p. 542–548, 2008.

PARK, J.-Y.; PARK, D. J.; CHUNG, B.-W.; MIN, J. Expression of bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae* under galactose supplemented condition. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, p. 528–532, 2013.

PEREIRA, L. F.; BASSI, A. P. G.; AVANSINI, S. H.; et al. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 529–539, 2012.

PEREIRA, R. S.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Inhibitory action of toxic compounds present in lignocellulosic hydrolysates on xylose to xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 71–78, 2011.

PHAFF, H. J., MILLER, M. W., MRAK, E. M. **The Life of Yeasts**. 2 ed, Harvard University Press, Cambridge (USA) and London, 1978.

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

RICHARD, P.; VERHO, R.; PUTKONEN, M.; LONDESBOROUGH, J.; PENTTILA, M. Production of ethanol from -arabinose by containing a fungal -arabinose pathway. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 185–189, 2003.

ROBERTO, I. C.; LACK, L. S. Utilization of Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Pichia stipitis* for the Production Ethanol. **Process Biochemistry**, v. 26, p. 15–21, 1991.

ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M. DE; SATO, S. Influence of k_La on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 505–508, 1999.

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

SATO, T. K.; LIU, T.; PARREIRAS, L. S.; et al. Harnessing Genetic Diversity in *Saccharomyces cerevisiae* for Improved Fermentation of Xylose in Hydrolysates of Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreated Biomass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 540–554, 2014.

SEHNEM, N. T.; MACHADO, A. D. S.; LEITE, F. C. B.; et al. 5-Hydroxymethylfurfural induces ADH7 and ARI1 expression in tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain P6H9 during bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 190–6, 2013.

- SERPAGGI, V.; REMIZE, F.; RECORBET, G.; et al. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. **Food Microbiology**, v. 30, p. 438–447, 2012.
- SHINOHARA, T.; KUBODERA, S.; YANAGIDA, F. Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, p. 90–97, 2000.
- SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1306–1315, 2010.
- SINGH, A.; BAJAR, S.; BISHNOI, N. R. Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture. **Fuel**, v. 116, p. 699–702, 2014.
- SIVERIO, J. M. Assimilation of nitrate by yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 277–284, 2002.
- SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; GORSICH, S. W.; LIU, Z. L. Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 1285–1296, 2006.
- SMITH, C. **Postmodern Winemaking**. University of California Press: Los Angeles, 368 p., 2013.
- SREENATH, H. K.; JEFFRIES, T. W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 72, p. 253–260, 2000.
- SUES, A.; MILLATI, R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M. J. Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 669–676, 2005.
- TAKAHASHI, S.; TANIFUJI, K.; SHIELL, K.; et al. Removal of Acetic Acid from Spent Sulfite Liquor Using Anion Exchange Resin for Effective Xylose Fermentation with *Pichia stipitis*. **Bioresources**, v. 8, p. 2417–2428, 2013.
- TOIVOLA, A.; YARROW, D.; BOSCH, E. VAN DEN. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, p. 1221–1223, 1984.
- TOMITAKA, M.; TAGUCHI, H.; FUKUDA, K.; AKAMATSU, T.; KIDA, K. Isolation and characterization of a mutant recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain with high efficiency xylose utilization. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 116, p. 706–715, 2013.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.; CASE, C.L. **Microbiologia**, 10 ed. Porto Alegre: ArtMed, 964 p., 2012.

- TYAGI, S. K. **Recent Advances in Bioenergy Research**. Kapurthala: Sadar Swaran Singh National Institute of Renewable Energy, 2013.
- UGLIANO, M.; HENSCHKE, P. A. Yeasts and wine flavor. In: **Wine Chemistry and Biochemistry**. (Moreno-Arribas e Polo, edit.). New York, Springer, p. 313-392, 2009.
- UNREAN, P.; NGUYEN, N. H. A. Optimized fed-batch fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 1895–1909, 2013.
- VAN BEEK, S.; PRIEST, F. G. Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5322–8, 2000.
- VAN VLEET, J. H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 300–306, 2009.
- VORONOVSKY, A. Y.; ROHULYA, O. V.; ABBAS, C. A.; SIBIRNY, A. A. Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan. **Metabolic Engineering**, v. 11, p. 234–242, 2009.
- WANG, C.; BAO, X.; LI, Y.; et al. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. **Metabolic Engineering**, v. 30, p. 79–88, 2015.
- WATANABE, T.; WATANABE, I.; YAMAMOTO, M.; ANDO, A.; NAKAMURA, T. A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1844–1848, 2011.
- WEI, N.; QUARTERMAN, J.; KIM, S. R.; CATE, J. H. D.; JIN, Y. S. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. **Nature communications**, v. 4, p. 2580, 2013.
- WHO Food Additives Series 21. .Disponível em:
<<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v21je15.htm>>. Acesso em: 29/9/2015.
- WILKINS, M. R.; MUELLER, M.; EICHLING, S.; BANAT, I. M. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 346–350, 2008.
- YE, L. et al. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. **Bioresource technology**, v. 132, p. 38–44, 2013.
- YOUNG, E. M.; COMER, A. D.; HUANG, H.; ALPER, H. S. A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, p. 401–411, 2012.
- ZHA, J.; SHEN, M.; HU, M.; SONG, H.; YUAN, Y. Enhanced expression of genes involved

in initial xylose metabolism and the oxidative pentose phosphate pathway in the improved xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p. 27–39, 2014.

ZHAO, C.; LU, W. e WANG, H. Simultaneous hydrogen and ethanol production from a mixture of glucose and xylose using extreme thermophiles II: Effect of hydraulic retention time. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 22, p. 9131–9136, 2013.

ZUO, Q.; ZHAO, X.; XIONG, L.; et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Fine-tuning of xylose metabolism in genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* by scattered integration of xylose assimilation genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 440, p. 241–244, 2013.

Capítulo 2

**TESTE RÁPIDO PARA SELEÇÃO DE LEVEDURAS
FERMENTADORAS DE XILOSE**

Resumo

Dentro da atual proposta de se aproveitar hexoses e pentoses presentes nos materiais lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração, esbarra-se na falta de linhagens ideais para fermentar pentoses, apesar dos avanços obtidos com estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* engenheiradas. A busca por novas cepas naturalmente fermentadoras de pentoses deve continuar, uma vez que se conhece muito pouco das habilidades e metabolismo de cepas não-*Saccharomyces*, além do que estirpes diferentes, mesmo pertencendo a uma mesma espécie, possuem comportamentos diferentes, que podem ser dependentes do ambiente do qual foram isoladas ou estão adaptadas. Com vista nessa proposta, este Capítulo apresenta a avaliação de um método para seleção de leveduras fermentadoras de xilose. Foram utilizadas leveduras isoladas de trabalhos anteriores do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LBMA) do IBILCE-UNESP/ São José Rio Preto e da coleção do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudo de Insetos Sociais (CEIS) do IB-UNESP/ Rio Claro. Foram estudadas 36 cepas das quais, 17 foram positivas para fermentação daquele açúcar. Após ensaios para quantificação do etanol por cromatografia gasosa, observou-se que as linhagens *Candida shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP e *Aureobasidium pullulans* LB3.1 destacaram-se na produção de etanol. Enquanto a maior parte das cepas apresentaram apenas traços de produção de etanol, essas apresentaram produção de etanol de 12 e 7 g.L⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: pentoses, fermentação alcoólica, bioetanol, *Candida shehatae*, *Aureobasidium pullulans*.

1. INTRODUÇÃO

Enquanto muitos microrganismos conseguem converter a glicose eficientemente em etanol e outros compostos desejados pela indústria, a utilização e bioconversão de pentoses permanece um desafio. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada na indústria em processos de fermentação alcoólica, não possui, em sua natureza, a capacidade de fermentar pentoses.

Durante as últimas décadas, vários estudos de isolamento e de seleção de leveduras relataram espécies com capacidade de fermentar xilose. Os gêneros mais frequentes são: *Brettanomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen*, *Pichia*, e *Schizosaccharomyces* (GONG et al., 1983; MCMILLAN, 1993; CHANDRAKANT; BISARIA, 1998), mas alguns gêneros menos comuns também são relatados, como *Aureobasidium*, *Citeromyces*, *Clavispora*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Issatchenkia*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Saccharomycopsis*, *Sporopachydermia*, *Torulaspora* e *Wingea*, produzindo desde traços de etanol a fatores de rendimento de xilose em etanol (Yp/s, g etanol/g xilose consumida) de 0,3 g/g (58% do máximo teórico), dependendo das condições experimentais (GONG et al., 1981; TOIVOLA et al., 1984; NIGAM et al., 1985; RAO et al., 2008).

A D-xilose é a pentose mais abundante no material lignocelulósico e, por isso, a maior parte das pesquisas de produção de etanol de segunda geração a partir de pentoses está relacionada a esse açúcar. Entretanto, a L-arabinose também está presente em concentrações significantes em muitas hemiceluloses como os resíduos da cana-de-açúcar ou espécies herbáceas e alguns estudos visam também o aproveitamento desse açúcar (BECKER; BOLES, 2003; KARHUMAA et al., 2006; KNOSHAUG et al., 2009; RICHARD et al., 2003).

Após o transporte, D-xilose é primeiro reduzida a xilitol por meio da enzima D-xilose redutase (aldose redutase EC 1.1.1.21) e subsequentemente oxidada a D-xilulose pela xilitol desidrogenase (D-xilose redutase, EC 1.1.1.9). Por meio da enzima D-xiluloquinase (EC 2.7.1.17.) a D-xilulose é convertida em D-xilulose-5-fosfato. Ribulose-fosfato-3-epimerase (EC 5.1.3.1) transaldolase (EC 2.2.1.2) e transcetolase (EC 2.2.1.1) sequencialmente convertem a D-xilose-5-fosfato em gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato por rearranjo não oxidativo levando à formação de etanol pela via Embden-Meyerhof (CHANDEL et al., 2011).

A enzima xilose redutase (XR), que catalisa a primeira reação é capaz de usar NADPH e NADH, sendo que utiliza o NADPH com maior frequência, já a enzima xilitol desidrogenase, que produz xilulose a partir do xilitol, é NAD⁺-dependente. Dependendo do balanço redox da célula (equilíbrio entre NADPH e NAD⁺), o xilitol pode ser secretado para o meio externo, resultando em baixo rendimento em etanol. Desse modo, o potencial redox da célula pode determinar o sucesso do processo fermentativo de xilose, devendo, por isso, ser considerado (LIANG et al., 2014).

Existem diversos estudos com as espécies *S. cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*, além de cepas de *Kluyveromyces marxianus* e *Candida tropicalis* visando o aprimoramento do processo de produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos, bem como o melhoramento das linhagens por mutação (WATANABE et al., 2011; TOMITAKA et al., 2013; WANG et al., 2015).

Recentemente, vários grupos de pesquisas têm se concentrado na Engenharia Genética da espécie *S. cerevisiae* para que esta seja capaz de produzir etanol a partir de pentoses, uma vez que esta levedura é muito bem adaptada ao processo de fermentação alcoólica, apresentando altos rendimentos. Entretanto ainda não se obteve a linhagem ideal para ser aplicada industrialmente, a produtividade e rendimento de etanol por essas cepas é semelhante à de algumas cepas naturais, aparentemente o problema dos baixos rendimentos está relacionado ao processo de metabolismo da xilose em si e não das características do microrganismo utilizado (GUO; JIANG, 2013; HECTOR et al., 2013; KATO et al., 2013; MOON et al., 2013).

É importante que a busca por novas cepas continue, principalmente porque este tipo de estudo leva ao conhecimento do metabolismo de pentoses das leveduras e serve como fonte de sistemas gênicos envolvidos (LORLIAM et al., 2013; CADETE et al., 2013; MORAIS et al., 2013). Estirpes pertencentes a uma coleção também podem ser estudadas no sentido de se buscar uma que seja promissora, para isso, uma metodologia que ajude a diferenciar, de forma rápida e eficiente, as cepas capazes de apenas assimilar xilose ou produzir etanol pode ser muito útil. Assim, uma adaptação a partir da metodologia de Grabek-Lejko e colaboradores (2006) foi avaliada para aplicação na seleção de linhagens de leveduras capazes de produzir etanol utilizando apenas xilose como fonte de carbono, por meio de teste em placas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

A **Tabela 1** mostra um total de 40 cepas de leveduras isoladas de trabalhos anteriores do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LBMA) do IBILCE – UNESP/São José do Rio Preto (BAFFI et al., 2011; BEZERRA-BUSSOLI et al., 2013) e outras pertencentes à coleção do do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do IB – UNESP/Rio Claro.

Tabela 1: Relação das cepas utilizadas

Cepa	Identificação	Cepa	Identificação
1A	<i>Aureobasidium pullulans</i>	N31	<i>Pichia kluyvery</i>
A11	<i>Trichosporon multisporum</i>	N36	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
A12	<i>Trichosporon multisporum</i>	N38	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
B2	<i>Debaryomyces sp</i>	N39	<i>Issatchenkia orientalis</i>
B3	<i>Debaryomyces sp</i>	N4	<i>Pichia sp.</i>
B8(1)	Sem identificação	N5	<i>Candida stellata</i>
B8(2)	Sem identificação	PT1-1BASP	<i>Candida shehatae</i> var. <i>shehatae</i>
BR6-2AI	<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i>	SIA32.1	Sem identificação
BR6-2AY	<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i>	SIA33.1	Sem identificação
CG8-8BY	<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i>	SIA4.2	Sem identificação
G1.2	<i>Pichia guilliermondii</i>	U18	<i>Cryptococcus flavescens</i>
G10.2	<i>Rodotorula sp.</i>	S54	<i>Issatchenkia terricola</i>
LB16	<i>Aureobasidium pullulans</i>	S59	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
LB3.1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	N17	<i>Candida quercitrusa</i>
LB34.1	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	N20	<i>Candida quercitrusa</i>
LB86	<i>Aureobasidium leucospermi</i>	U2	<i>Cryptococcus laurentii</i>
MAD2-LA	Sem identificação	U3	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>
N19	<i>Candida quercitrusa</i>	U12	<i>Picchia guilliermondii</i>
CG5-5AY	<i>Candida sp.</i>	FB1-1AY-a	<i>Candida silvae</i>
FB1-1CASP	<i>Candida silvae</i>	BR3-3BY	<i>Candida silvae</i>

As culturas foram mantidas em meio YEDP sólido (1% Extrato de Levedura, 2% Peptona, 2% Glicose e 1,5% Ágar) em geladeira e por estocagem em glicerol (15%) a -80°C. Para a estocagem em glicerol, pérolas de vidro foram lavadas com água e, em seguida, com água destilada adicionada de duas a três gotas de ácido nítrico e novamente com água destilada. Após esterilização em tubo de rosca, cerca de 400 µL de solução

glicerol a 15% foram colocados em frascos tipo Eppendorf esterilizados e, em seguida, adicionado de duas alças da cultura de levedura. As pérolas de vidro foram adicionadas a essa suspensão de leveduras, que foram mantidas, “overnight”, no freezer a -20°C e, então, transferidas para freezer a -80°C.

2.2. Teste para triagem de leveduras fermentadoras de xilose

Com a finalidade de identificar quais cepas das coleções eram produtoras de etanol a partir de xilose, foi utilizada a metodologia de “screening” descrita por Grabek-Lejko e colaboradores (2006), com algumas adaptações. Essa metodologia permite a identificação de cepas capazes de produzir etanol em meio com xilose como única fonte de carbono, pelo crescimento associado de outra cepa de levedura que não assimila xilose, mas que assimila etanol.

Para esse teste, as leveduras *Candida* sp. CG5-5AY, *Candida silvae* FB1-1AY-a e BR3-3BY e cepa FB1-1CASP que não assimilam xilose, mas crescem utilizando etanol como fonte de carbono, foram utilizadas visando a escolha da mais adequada para a aplicação nos ensaios de seleção das estirpes fermentadoras de xilose a etanol.

Após um cultivo de 24 h (30°C e 150 rpm de agitação) em meio líquido YNB (Yeast Nitrogen Base) contendo 0,5% de glicose, as células de *Candida* sp. CG5-5AY, *Candida silvae* FB1-1AY-a ou BR3-3BY ou cepa FB1-1CASP foram incorporadas ao meio de YNB, ágar (2%) e xilose (2, 4 e 6%) a uma densidade de 10^7 células/mL logo antes da solidificação do ágar, pelo método “pour-plate”. As diferentes concentrações de xilose (2, 4 e 6%) foram utilizadas a fim de avaliar se haveria algum efeito da concentração inicial do açúcar e, assim, definir a melhor concentração para aplicações futuras da metodologia.

Com as placas prontas, as leveduras utilizadoras de xilose (a serem testadas) foram plaqueadas na superfície do ágar e a levedura *Candida shehatae* var. *insectosa* CG8-8BY foi plaqueada em cada placa como controle positivo, uma vez que já é conhecido que esta cepa produz etanol a partir de xilose. Placas que não foram inoculadas com as leveduras a serem testadas também foram incubadas como controle negativo, para garantir que não haveria crescimento das leveduras assimiladoras de etanol na ausência das produtoras de etanol.

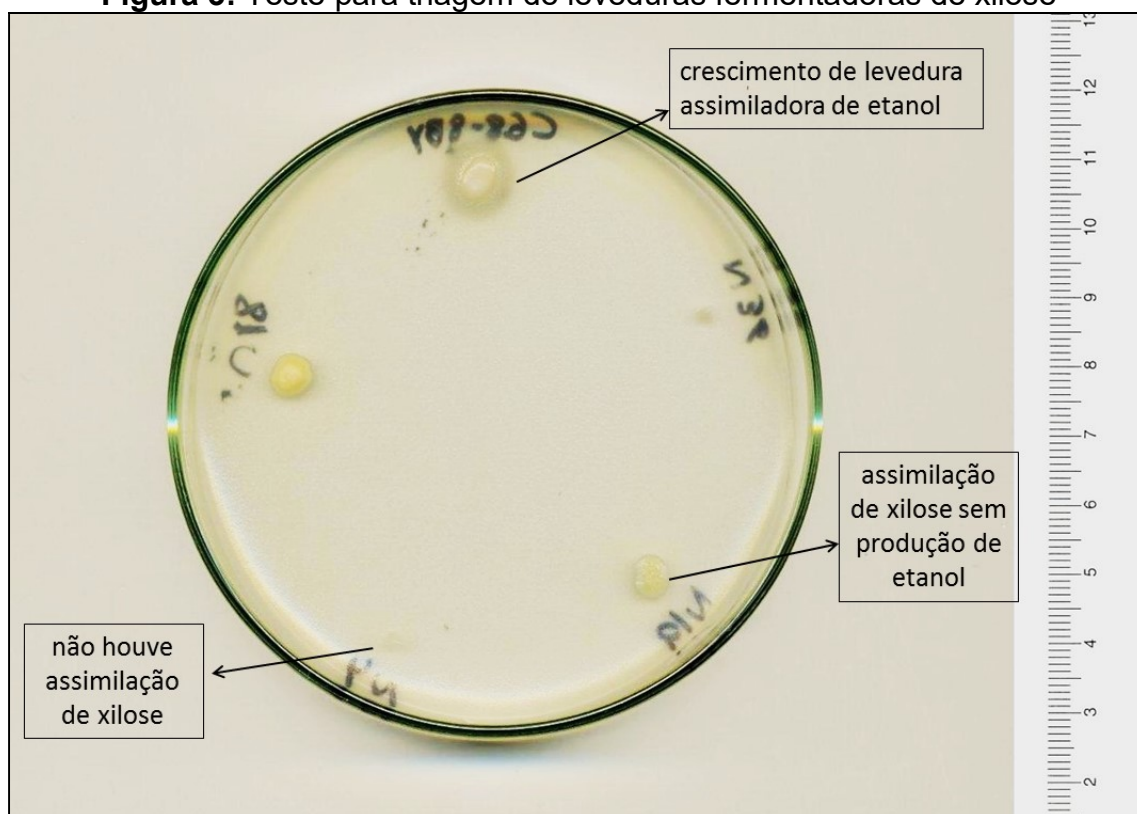
Após aproximadamente 10 dias de incubação (30°C), houve o aparecimento de zonas de crescimento (halos) da levedura assimiladora de etanol ao redor de cada colônia produtora de etanol a partir de xilose (**Figura 3**). Foi realizada a medição do diâmetro da colônia da levedura assimiladora de xilose e o raio do anel de crescimento da cepa

assimiladora de etanol, a fim de se verificar uma possível relação entre crescimento da colônia, quantidade de etanol produzido e o crescimento da cepa assimiladora de etanol.

Foram avaliadas 36 leveduras quanto à assimilação de xilose e produção de etanol, quatro cepas diferentes capazes de assimilar o etanol e três concentrações diferentes de xilose. Essas variáveis resultaram na realização de 12 testes para cada levedura, totalizando 432 ensaios.

Para verificação da eficácia do teste de triagem e avaliar se uma concentração mínima de etanol seria necessária para o crescimento das cepas assimiladoras foram feitos ensaios de crescimento em meio líquido contendo etanol em diferentes concentrações, conforme descrito a seguir.

Figura 3: Teste para triagem de leveduras fermentadoras de xilose



2.3. Determinação da concentração mínima de etanol para o crescimento das cepas assimiladoras de etanol

A avaliação da capacidade das cepas crescerem em etanol foi realizada utilizando método de diluição do composto em YNB em uma série de 12 tubos Falcon. A partir de uma concentração de etanol em YNB de 80 mmol.L⁻¹, diluiu-se uma alíquota dessa solução em YNB (1:1) a fim de obter a concentração de 40 mmol.L⁻¹. Após homogeneização uma

alíquota da solução de 40 mmol.L⁻¹ de etanol foi utilizada para diluição em YNB (1:1) a fim de obter a concentração de 20 mmol.L⁻¹ de etanol. Esse processo de homogeneização e diluições sucessivas foi repetido até obtenção da concentração de 0,6 mmol.L⁻¹ de etanol.

As cepas *Candida silvae* BR3-3BY, *Candida* sp CG5-5AY, FB1-1CASP e *Candida silvae* FB1-1AY-a foram suspendidas em solução de NaCl (0,9%) até atingir uma densidade óptica de 0,5 a 600 nm e 0,5 mL da suspensão de cada cepa foi utilizada para inocular 6 mL das diferentes concentrações de etanol. Estas foram incubadas a 30°C, sob agitação de 200 rpm, durante 96 h. Foram feitas leituras de densidade óptica do tempo inicial (tempo 0), em 20h e 96 h de cultivo. As leituras da densidade óptica foram realizadas a 600 nm em microplacas.

2.4. Padronização do inóculo nos experimentos de cultivo e fermentação

Após identificar as cepas positivas para fermentação de xilose, para cada cepa positiva foi realizado uma curva de regressão linear para padronização de inóculo.

Após cultivo por 24 h em meio YEPX (1% Extrato de levedura, 2% Peptona e 2% Xilose) a 30°C e agitação de 150 rpm, diversas diluições do cultivo foram realizadas e as absorbâncias determinadas a 600 nm. Paralelamente, as mesmas suspensões foram centrifugadas a 10000 x g, por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado, as células suspendidas em água destilada e centrifugadas novamente. O precipitado de células foi, então, levado à estufa a 60°C, em frascos tipo Eppendorf de peso conhecido, até peso constante. A partir desses dados, foi construída uma curva de calibração, plotando-se em gráfico os valores de absorbância representando a densidade celular e de peso seco correspondentes, obtendo-se uma equação de regressão linear. Esta equação foi utilizada para estimar a massa celular a ser utilizada como inóculo (4 g.L⁻¹).

2.5. Produção de etanol a partir de xilose

Para quantificar a produção de etanol a partir de xilose das cepas positivas no processo de triagem, foram realizados ensaios de fermentação alcoólica contendo xilose. As leveduras foram pré-cultivadas em meio YEPD, a 30°C e agitação de 150 rpm, por 24 h. Após este período, alíquotas foram centrifugadas a 10000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de células inoculado (em uma concentração celular final de 4,0 g.L⁻¹) em meio nutriente basal - composto por KH₂PO₄ (2,0 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (2,0 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (1,0 g.L⁻¹), ureia (0,3 g.L⁻¹), CaCl₂ (0,3 g.L⁻¹), solução de sais (1,0 g.L⁻¹), xilose (60,0 g.L⁻¹) e extrato de levedura (10,0 g.L⁻¹), com pH inicial 5.

Foram utilizados Erlenmeyers de 125 mL fechados com válvula própria para fermentação, a válvula foi preenchida com solução de metabissulfito de sódio a 1 g.L⁻¹. Quando misturado em água o metabissulfito de sódio libera dióxido de enxofre, que é agente antimicrobiano, e sulfito de sódio, que é um sequestrador de oxigênio ($2 \text{NaS}_2\text{O}_3 + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{Na}_2\text{SO}_4$), evitando, assim, a entrada de O₂ no frasco, mas permitindo a saída do CO₂ produzido pela levedura.

A fermentação foi realizada durante 48 h, a 30°C e sob agitação de 100 rpm. A quantificação do etanol foi realizada por cromatografia gasosa conforme metodologia descrita no item 2.8.

2.6. Avaliação de crescimento

Para a determinação da massa celular, amostras (2,0 mL) do cultivo foram tomadas periodicamente, transferidas para Eppendorfs de peso conhecido e centrifugadas a 6000 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para quantificação do consumo de açúcares e o precipitado de células foi, então, levado a estufa a 60 °C, no próprio Eppendorf até peso constante.

2.7. Avaliação de viabilidade celular e taxa de brotamento

A determinação da viabilidade celular e taxa de brotamento foram periodicamente acompanhadas através do método de coloração com eritrosina. Amostras de 200 µL foram transferidas para 200 µL da solução padrão eritrosina e homogeneizadas. Após 10 minutos, tempo necessário para que as células absorvam o corante, procedeu-se à contagem em câmara de Neubauer. As células viáveis apresentaram-se incolores, enquanto as inviáveis, vermelhas. Com a morte da célula, a membrana celular perde sua propriedade seletiva dos compostos que entram e saem da célula e, portanto, o corante consegue acessar o citoplasma.

A solução de eritrosina foi preparada diluindo-se 1 g de eritrosina em 100 mL de água destilada. Em seguida, 1 mL desta solução foi diluída em 50 mL de solução tampão (0,2 M de Na₂HPO₄ e 0,2 M de NH₂PO₄) e mantida a 7 °C.

A Viabilidade celular foi calculada por meio da equação:

$$\text{Viabilidade (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ de células vivas} / \text{n}^\circ \text{ de células vivas} + \text{n}^\circ \text{ de células não viáveis}) \times 100$$

A taxa de brotamento foi calculada por meio da equação:

$$\text{Brotamento (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ de células viáveis em brotamento} / \text{n}^\circ \text{ de células viáveis}) \times 100$$

2.8. Quantificação de etanol

A quantificação do etanol produzido foi realizada por cromatografia em fase gasosa com injeção por head-space utilizando-se 6 mL do fermentado acondicionado em tubos de penicilina com septo de borracha, lacrados e mantidos a 40°C, por 10 minutos. Com uma seringa do tipo gas-tight de 500 µL foram coletados 200 µL da fase gasosa e injetados no cromatógrafo. O cromatógrafo gasoso (Perkin Elmer - Clarus 480) foi equipado com uma coluna Carbowax 20M (30 m, 0,32 mm, 0,25 µm). O gás de arraste foi o nitrogênio, com fluxo de 30 mL/min. As temperaturas dos blocos de injeção e detecção foram de 200°C. A quantificação foi realizada com curva de calibração construída a partir de análises de soluções etanol: água em diferentes proporções (0,2; 0,5; 1; 2 e 5 % de etanol).

2.9. Quantificação de açúcares

A quantificação de açúcar redutor das fermentações em meio semissintético foi feita pelo método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS), adaptado a partir de Miller (1959). Em um tubo de ensaio, foram misturados 1,0 mL da amostra e 1,0 mL de DNS. A mistura foi levada a banho em ebulição por 10 minutos e, em seguida, a banho de gelo para resfriar. A esta mistura foram adicionados 8,0 mL de água destilada e a leitura da absorbância feita a 540 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em mg de açúcar redutor.mL⁻¹ pelas curvas padrão do açúcar utilizado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Triagem de leveduras fermentadoras de xilose

A adaptação a partir de Grabek-Lejko e colaboradores (2006) foi eficiente, as linhagens produtoras de etanol foram facilmente identificadas a partir do crescimento indireto da outra estirpe, a cepa assimiladora de etanol, que cresceu ao redor das cepas produtoras de etanol em todas as repetições do teste, de forma estável e facilmente reprodutível. De um total de 36 cepas testadas quanto à produção de etanol, 17 foram positivas quanto à capacidade de produzir etanol a partir de xilose. Outras 11 cepas não assimilaram a xilose presente no meio, e não cresceram e, por fim, 8 cepas assimilaram o açúcar mas não produziram etanol (teste negativo para crescimento das cepas assimiladoras de etanol).

Todas as cepas aplicadas como assimiladoras de etanol apresentaram crescimento semelhante nos ensaios referentes a uma mesma cepa produtora de etanol, o tamanho do halo de crescimento foi muito próximo. Entretanto, houve uma variação maior no tamanho do halo quando comparamos diferentes cepas produtoras de etanol, o que significa que o tamanho do halo da levedura assimiladora de etanol está mais relacionado à estirpe que produz o etanol do que à cepa assimiladora de etanol utilizada.

As **Tabelas 2, 3 e 4** apresentam o raio de crescimento das leveduras assimiladoras de etanol e a proporção entre o tamanho desses halos de crescimento e o diâmetro das colônias das leveduras fermentadoras de xilose a etanol e correspondem, respectivamente, aos testes em meios contendo 2%, 4% e 6% de xilose.

Observou-se também que a extensão do crescimento da levedura assimiladora de etanol foi independente da concentração de xilose do meio e não mostrou diferenças entre as cepas testadas na assimilação de etanol. Sendo assim, para aplicações futuras, optou-se por utilizar a menor concentração de xilose (2%) e a levedura *Candida silvae* BR3-3BY, por apresentar crescimento mais rápido e estável.

Nas placas controles (sem inóculo de leveduras produtoras de etanol) não houve crescimento das leveduras assimiladoras de etanol, o que confirma o crescimento destas a partir do etanol produzido pelas leveduras que fermentam xilose, mostrando a confiabilidade do método de triagem para leveduras produtoras de etanol.

Com exceção da diferença da levedura produtora de etanol utilizada, nenhuma outra variante foi capaz de modificar o tamanho da região de crescimento da assimiladora do composto, nem a quantidade de xilose, nem as diferentes leveduras assimiladoras de etanol utilizadas. O tamanho do halo de crescimento das estirpes utilizadas na assimilação do álcool está fortemente relacionado à cepa fermentadora.

Tabela 2: Produção de etanol e crescimento das leveduras em meio sólido contendo xilose a 2% em placas de Petri, crescimento das cepas assimiladoras de etanol (medida do raio de crescimento - R_a (cm)) e proporção entre o anel de crescimento da cepa assimiladora de etanol e o diâmetro de crescimento da colônia da cepa produtora de etanol ($P_{a/p}$).

Cepas	Presença de etanol*	BR3-3BY		CG5-5AY		FB1-1CASP		FB1-1AY-a	
		R_a	$P_{a/p}$	R_a	$P_{a/p}$	R_a	$P_{a/p}$	R_a	$P_{a/p}$
1A	+	0,59	0,33	0,56	0,28	0,52	0,37	0,48	0,23
A11	+	0,12	0,25	0,11	0,18	0,25	0,57	0,25	0,42
A12	na	...	...	...	...	...	...	...	...
B2	+	0,28	0,58	0,26	0,68	0,35	0,88	0,4	0,93
B3	-	...	...	...	...	...	...	...	...
B8.1	+	0,26	0,21	0,33	0,29	0,3	0,28	0,19	0,20
B8-2	+	0,53	0,96	0,75	1,32	0,57	0,70	0,27	0,31
BR6-2AI	+	0,62	1,27	0,6	1,26	0,59	1,22	0,64	1,28
BR6-2AY	+	0,73	1,40	0,78	1,44	0,56	0,98	0,52	0,98
CG8-8BY	+	0,79	1,22	0,99	1,55	0,67	1,16	0,64	1,12
G1.2	-	...	...	...	...	...	...	...	...
G10.2	-	...	...	...	...	...	...	...	...
LB16	+	0,7	1,08	0,96	2,53	0,6	1,15	0,88	1,29
LB3.1	+	0,33	0,77	0,29	0,58	0,29	0,45	0,46	0,81
LB34.1	na	...	...	...	...	...	...	...	...
LB86	+	0,36	0,57	0,46	0,78	0,45	0,47	0,26	0,35
MAD2-LA	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N19	+	0,2	0,25	0,24	0,19	0,18	0,23	0,17	0,27
N31	-	...	...	...	...	...	...	...	...
N36	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N38	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N39	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N4	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N5	na	...	...	...	...	...	...	...	...
PT1-1BASP	+	0,48	0,62	0,14	0,24	0,25	0,44	0,16	0,27
SIA32.1	+	0,44	1,11	0,34	1,55	0,38	1,58	0,49	1,14
SIA33.1	+	1,22	2,60	1,4	3,59	1,29	2,69	0,95	1,98
SIA4.2	na	...	...	...	...	...	...	...	...
U18	-	...	...	...	...	...	...	...	...
S54	na	...	...	...	...	...	...	...	...
S59	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N17	-	...	...	...	...	...	...	...	...
N20	-	...	...	...	...	...	...	...	...
U2	-	...	...	...	...	...	...	...	...
U3	+	1,07	2,02	1,52	3,71	1,51	3,15	1,12	2,73
U12	+	1,08	2,30	1,53	4,03	1,81	4,21	1,52	3,71

* (+) produção de etanol; (-) assimilação do açúcar e sem produção de etanol; (na) não assimilou o açúcar

Tabela 3: Produção de etanol e crescimento das leveduras em meio sólido contendo xilose a 4% em placas de Petri, crescimento das cepas assimiladoras de etanol (medida do raio de crescimento - R_a (cm)) e proporção entre o anel de crescimento da cepa assimiladora de etanol e o diâmetro de crescimento da colônia da cepa produtora de etanol ($P_{a/p}$).

Cepas	Presença de etanol*	BR3-3BY		CG5-5AY		FB1-1CASP		FB1-1AY-a	
		R_a	$P_{a/p}$	R_a	$P_{a/p}$	R_a	$P_{a/p}$	R_a	$P_{a/p}$
1A	+	0,69	0,17	0,26	0,20	0,22	0,14	0,43	0,28
A11	+	0,13	0,19	0,13	0,19	0,24	0,56	0,25	0,63
A12	na	...	...	...	...	...	...	...	...
B2	+	0,27	0,60	0,25	0,61	0,31	0,49	0,18	0,33
B3	-	...	...	...	...	...	...	...	...
B8.1	+	0,53	0,39	0,36	0,33	0,43	0,25	0,27	0,23
B8-2	+	0,33	0,62	0,48	1,04	0,24	0,39	0,28	0,32
BR6-2AI	+	0,61	1,03	0,69	1,07	0,61	1,00	0,64	1,05
BR6-2AY	+	0,8	1,57	0,66	0,85	0,73	1,38	0,29	0,66
CG8-8BY	+	0,66	0,93	0,92	1,35	0,45	0,54	0,57	0,77
G1.2	-	...	...	...	...	...	...	...	...
G10.2	-	...	...	...	...	...	...	...	...
LB16	+	0,5	0,66	0,5	0,66	0,34	0,41	0,42	0,52
LB3.1	+	0,17	0,29	0,26	0,43	0,23	0,41	0,28	0,45
LB34.1	na	...	...	...	...	...	...	...	...
LB86	+	0,28	0,31	0,34	0,47	0,42	0,54	0,34	0,44
MAD2-LA	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N19	+	0,23	0,46	0,19	0,4	0,25	0,40	0,25	0,47
N31	-	...	...	...	...	...	...	...	...
N36	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N38	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N39	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N4	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N5	na	...	...	...	...	...	...	...	...
PT1-1BASP	+	0,57	0,90	0,34	0,61	0,39	0,75	0,11	0,26
SIA32.1	+	0,61	1,64	0,26	0,88	0,25	0,86	0,61	1,65
SIA33.1	+	0,81	2,13	0,93	2,66	1,34	2,39	1,04	1,86
SIA4.2	na	...	...	...	...	...	...	...	...
U18	-	...	...	...	...	...	...	...	...
S54	na	...	...	...	...	...	...	...	...
S59	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N17	-	...	...	...	...	...	...	...	...
N20	-	...	...	...	...	...	...	...	...
U2	-	...	...	...	...	...	...	...	...
U3	+	1,03	2,40	1,57	3,20	0,68	2,27	1,26	3,50
U12	+	1,27	4,23	1,52	3,80	0,68	1,74	1,4	3,33

* (+) produção de etanol; (-) assimilação do açúcar e sem produção de etanol; (na) não assimilou o açúcar

Tabela 4: Produção de etanol e crescimento das leveduras em meio sólido contendo xilose a 6% em placas de Petri, crescimento das cepas assimiladoras de etanol (medida do raio de crescimento - R_a (cm)) e proporção entre o anel de crescimento da cepa assimiladora de etanol e o diâmetro de crescimento da colônia da cepa produtora de etanol ($P_{a/p}$).

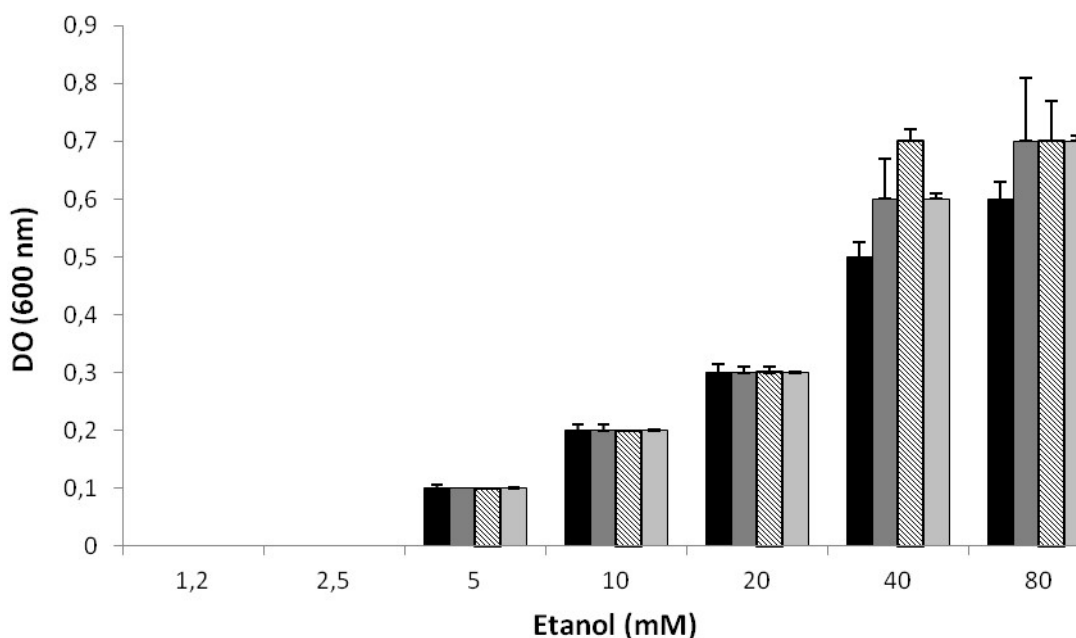
Cepas	Presença de etanol*	BR3-3BY		CG5-5AY		FB1-1CASP		FB1-1AY-a	
		R_a	$P_{a/p}$	R_a	$P_{a/p}$	R_a	$P_{a/p}$	R_a	$P_{a/p}$
1A	+	0,78	1,42	0,73	1,11	0,28	0,17	0,23	0,17
A11	+	0,16	0,26	0,16	0,26	0,22	0,49	0,22	0,48
A12	na	...	...	...	...	...	...	...	...
B2	+	0,26	0,68	0,13	0,33	0,14	0,30	0,08	0,21
B3	-	...	...	...	...	...	...	...	...
B8.1	+	0,27	0,26	0,31	0,31	0,33	0,24	0,3	0,23
B8-2	+	0,21	0,41	0,32	0,57	0,39	0,49	0,43	0,93
BR6-2AI	+	0,63	1,19	0,6	1,16	0,62	1,18	0,59	1,15
BR6-2AY	+	0,59	1,44	0,58	0,94	0,7	2,33	0,38	0,84
CG8-8BY	+	0,54	0,96	0,69	1,05	0,4	0,59	0,38	0,61
G1.2	-	...	...	...	...	...	...	...	...
G10.2	-	...	...	...	...	...	...	...	...
LB16	+	0,36	0,49	0,55	0,93	0,61	0,74	0,66	1,03
LB3.1	+	0,23	0,48	0,23	0,40	0,36	0,51	0,28	0,41
LB34.1	na	...	...	...	...	...	...	...	...
LB86	+	0,35	0,44	0,32	0,57	0,73	0,85	0,5	0,65
MAD2-LA	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N19	+	0,18	0,22	0,22	0,35	0,25	0,37	0,15	0,24
N31	-	...	...	...	...	...	...	...	...
N36	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N38	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N39	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N4	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N5	na	...	...	...	...	...	...	...	...
PT1-1BASP	+	0,44	0,83	0,31	0,61	0,17	0,35	0,14	0,28
SIA32.1	+	0,47	1,13	0,28	1,08	0,31	1,1	0,55	1,17
SIA33.1	+	0,58	1,38	0,51	1,13	0,86	1,87	0,65	1,51
SIA4.2	na	...	...	...	...	...	...	...	...
U18	-	...	...	...	...	...	...	...	...
S54	na	...	...	...	...	...	...	...	...
S59	na	...	...	...	...	...	...	...	...
N17	-	...	...	...	...	...	...	...	...
N20	-	...	...	...	...	...	...	...	...
U2	-	...	...	...	...	...	...	...	...
U3	+	0,44	1,26	0,84	1,95	0,45	1,26	1,17	4,18
U12	+	0,84	1,29	1,33	2,66	0,68	1,28	1,22	4,07

* (+) produção de etanol; (-) assimilação do açúcar e sem produção de etanol; (na) não assimilou o açúcar

Para identificar qual a quantidade mínima de etanol necessária para que ocorresse o crescimento das cepas assimiladoras de etanol, essas foram cultivadas em meio líquido contendo apenas etanol como fonte de carbono em diferentes concentrações. O crescimento foi avaliado, após cultivo de 96 h, por meio da densidade óptica a 660 nm e os resultados são mostrados na **Figura 4**. Observa-se por esses dados, que o crescimento ocorreu em meio com concentrações de etanol variando de 5 e 80 mmol.L⁻¹, sendo que abaixo de 5 mmol.L⁻¹ as leveduras não foram capazes de crescer.

Por esses ensaios em meio líquido pode-se concluir que, se as leveduras assimiladoras de etanol cresceram nas placas, ao redor das cepas produtoras, estas últimas devem ter produzido quantidades mínimas de 5 mmol.L⁻¹ e que, as cepas que foram consideradas negativas para a produção de etanol, podem ter produzido quantidades abaixo desse limiar de assimilação. Portanto, o teste é eficaz, porém, requer concentração mínima de etanol para detecção.

Figura 4: Variação da densidade óptica das leveduras assimiladoras de etanol em meio YNB líquido com diferentes concentrações do composto, por 96 h, a 30°C e 200 rpm.



Candida silvae BR3-3BY (■); *Candida sp.*CG5-5AY (■); *Candida silvae* FB1-1CASP (▨); *Candida silvae* FB1-1AY-a (■).

3.2. Produção de etanol a partir de xilose

As 17 cepas positivas dos testes de triagem passaram por ensaios de fermentação alcoólica para quantificação da produção de etanol. Uma vez que houve variação do tamanho da região de crescimento das cepas assimiladoras de etanol de acordo com a cepa produtora, a quantificação do produto objetivou verificar se havia correlação entre a quantidade do composto produzida e o tamanho do halo da cepa assimiladora do mesmo.

Os meios de cultivo de todas as leveduras apresentaram pico correspondente a etanol quando analisados em GC, porém alguns não corresponderam a concentrações suficientes para a quantificação (A11, B2, B8(1), B8(2), BR6-2AI, N19, SIA32.1, SIA33.1, U3 e U12). A **Tabela 5** mostra os resultados da produção de etanol e consumo de xilose durante a fermentação.

Pela comparação dos dados de produção de etanol das tabelas 4 e 5 é possível constatar que nem todos os dados corroboram entre si visto que a cepa SIA 33.1 mostrou maior crescimento que PT1-1BASP em meio sólido e, no entanto, essa cepa produziu apenas traços de etanol em meio líquido, enquanto PT1-1BASP foi a que mais se destacou na produção de etanol. Sendo assim, fica claro que o tamanho da região de crescimento das cepas assimiladoras de etanol durante o processo de triagem não corresponde à quantidade de etanol produzida.

O teste mostra alta confiabilidade quanto à detecção de cepas capazes de produzir o etanol, mas não diz nada sobre a quantidade de etanol produzido, é um teste útil no sentido qualitativo, porém não quantitativo. Inevitavelmente, após apontadas quais as linhagens capazes de produzir o etanol, é necessário que se façam ensaios de fermentação alcoólica para saber se entre as positivas há alguma cepa promissora para aplicação industrial.

Dentre as positivas do processo de triagem, a cepa *Candida shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP destacou-se de todas as outras produzindo cerca de 12 g.L⁻¹ de etanol (0,27 g/g, 53 % do máximo teórico) em 48 h de cultivo, seguida de *Aureobasidium pullulans* LB3.1 que produziu cerca de 7 g.L⁻¹ de etanol (0,16 g/g, 31 % do máximo teórico) e de *A. pullulans* 1A com 2 g.L⁻¹ (0,05 g/g). Cerca de 0,4 g.L⁻¹ de etanol foi a produção das cepas *C. shehatae* BR6-2AY (0,05 g/g) e CG8-8BY (0,03 g/g).

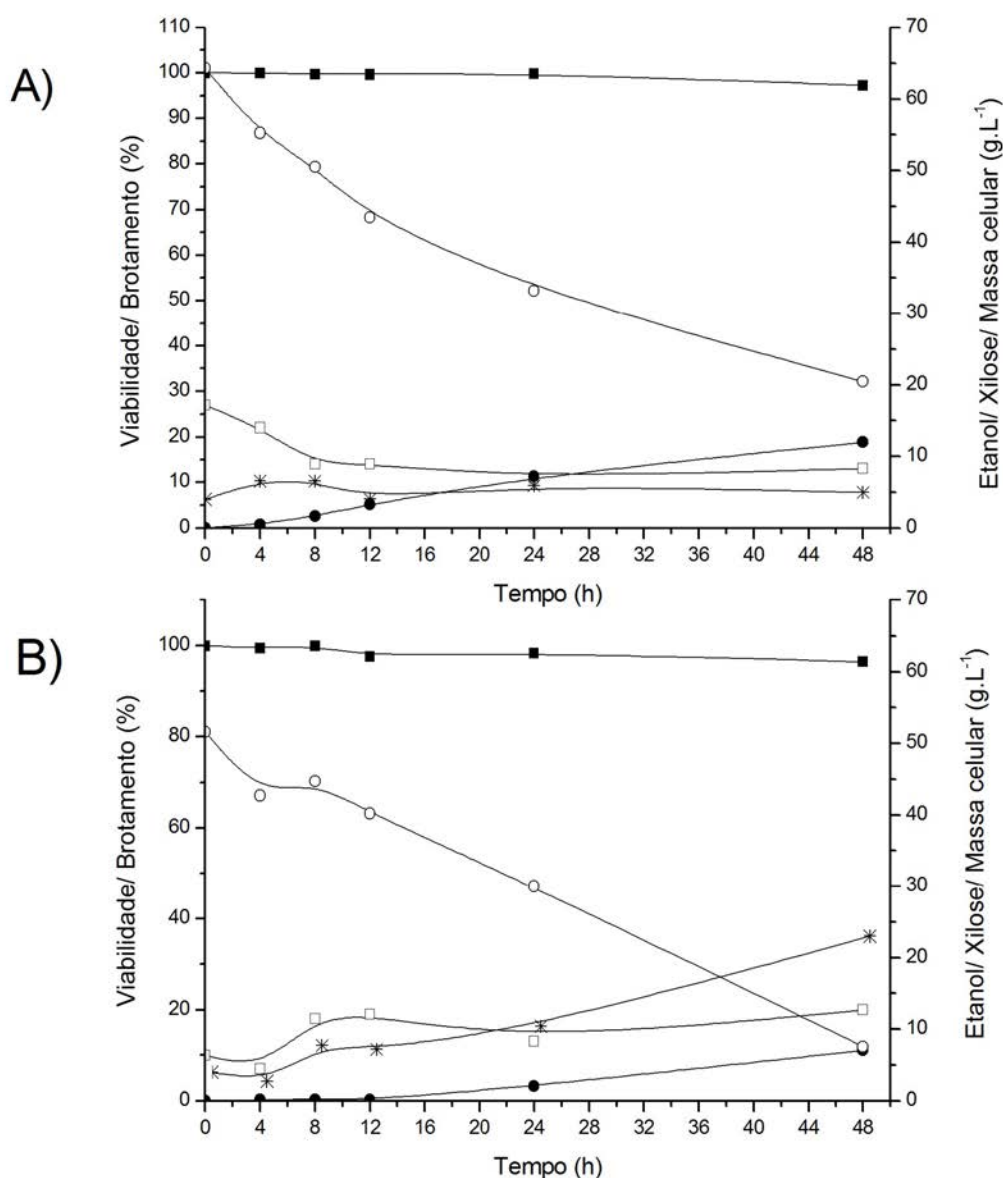
Tabela 5: Produção máxima de etanol, consumo de xilose, rendimento da produção de etanol, peso seco máximo e rendimento de crescimento durante fermentação por 48 h a 30°C e 100 rpm, utilizando meio líquido basal contendo 60 g.L⁻¹ de xilose e 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura.

Cepa de levedura	Etanol máximo (g.L ⁻¹)	Xilose consumida (g.L ⁻¹)	Rendimento etanol (g/g)*	Peso seco máximo (mg/mL)	Rendimento crescimento (g/g)**	Viabilidade em 48 h (%)
<i>Aureobasidium pullulans</i> 1A	1,98 (48 h)	39,09	0,05	14,4	0,37	96
<i>Trichosporum multisporum</i> A11	traços	18,78	-	15,5	0,83	98
<i>Debaryomyces</i> sp B2	traços	19,69	-	13,7	0,70	99
B8(1)	traços	22,6	-	13,15 (12 h)	0,60	97
B8(2)	traços	21,7	-	17,1	0,79	99
<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i> BR6-2AI	traços	14,8	-	9,95 (12 h)	0,67	0
<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i> BR6-2AY	0,45 (24 h)	9,79	0,05	8,65 (12 h)	0,88	0
<i>Candida shehatae</i> var. <i>insectosa</i> CG8-8BY	0,48 (24 h)	18,9	0,03	9,85 (12 h)	0,52	0
<i>Aureobasidium pullulans</i> LB3.1	7,0 (48 h)	44,08	0,16	23,0	0,52	96
<i>Aureobasidium pullulans</i> LB16	0,99 (48 h)	22,59	0,04	11,35	0,50	97
<i>Aureobasidium leucospermi</i> LB86	1,53 (48 h)	33,13	0,05	14,0	0,42	95
<i>Candida quercitrusa</i> N19	traços	19,84	-	9,65	0,49	99
<i>Candida shehateae</i> var. <i>shehatae</i> PT1-1BASP	11,9 (48 h)	43,81	0,27	5,9 (24 h)	0,13	97
SIA32.1	traços	29,89	-	11,1	0,37	93
SIA33.1	traços	21,35	-	11,3	0,53	49
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> U3	traços	19,71	-	12,4	0,63	45
<i>Picchia guilliermondii</i> U12	traços	16,07	-	11,4	0,71	42

*grama de etanol por grama de xilose consumida; **grama de peso seco por grama de xilose consumida

As cepas PT1-1BASP e LB3.1 foram as que mais consumiram o açúcar do meio, embora a *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP (**Figura 5a**) tenha apresentado crescimento menor que LB 3.1 (**Figura 5b**) sugerindo que a PT1-1BASP usou parte da xilose consumida para produção de etanol, conforme comprovado pelo maior rendimento fermentativo.

Figura 5: Perfil de produção de etanol, consumo de xilose, crescimento, viabilidade e taxa de brotamento das cepas



Candida shehatae var. *shehatae* PT1-1BASP (a) e *Aureobasidium pullulans* LB3.1 (b) durante fermentação; Taxa de brotamento (□); Taxa de viabilidade (■); Etanol (●); Xilose (○); Massa celular (—*—).

Pode-se observar também por esses resultados, uma grande variação no rendimento da fermentação alcoólica entre as cepas de *C. shehatae*. Diferentemente da cepa PT1-1BASP, as cepas *C. shehatae* var. *insectosa* BR6-2AI, BR6-2AY e CG8-8BY apresentaram baixa produção de etanol e baixa viabilidade durante a fermentação, estando todas as células mortas ao final de 48 h, sugerindo que a variedade da espécie pode implicar em processos metabólicos diferenciados. Essa inconsistência provavelmente deve-se as diferenças de requerimento de oxigênio pelas cepas quando seguem a via metabólica de assimilação de xilose. Tem sido demonstrado que os níveis de oxigenação requeridos para a assimilação e fermentação de pentoses por diferentes cepas de leveduras variam conforme a necessidade de cada uma na reconstituição dos potenciais redox envolvendo cofatores NAD(H) ou NADP(H) (LERTWATTANASAKUL et al., 2013).

A espécie *Candida shehatae* é frequentemente apontada na literatura como produtora de etanol (CHANDEL et al., 2007; SHUPE; LIU, 2012; GUAN et al., 2013; HICKERT et al., 2014; GUPTA et al., 2014), entretanto a espécie *A. pullulans* é pouco explorada nesse sentido. A maior parte dos trabalhos acerca de *A. pullulans*, visam a produção do exopolissacarídeo pululana e enzimas (SEO et al., 2004; MANITCHOTPISIT et al., 2009; WANG et al., 2014), apenas poucos trabalhos relacionam essa espécie à produção de etanol. Estas pesquisas apresentam rendimento de produção entre 0,2 e 0,26 g.g⁻¹, (produto/substrato consumido), seja o substrato xilose (NIGAM, J. N. et al., 1985; KOSSACZKÁ et al., 1991) ou sacarose (CAROLAN et al., 1976).

4. CONCLUSÕES

O teste se mostrou muito confiável no sentido de apontar estirpes de leveduras com capacidade de produzir etanol a partir da xilose, entretanto não permite ter ideia da quantidade de etanol que as linhagens são capazes de produzir. Sendo assim, pode ser muito útil no sentido de separar, em uma grande coleção, aquelas cepas que possuem essa propriedade, pois se trata de um teste simples e rápido e pode significar economia de tempo em um processo de triagem envolvendo muitas amostras. Contudo, a quantificação do etanol só poderia ser

realizada em uma segunda etapa, com ensaios de fermentação alcoólica das leveduras que se apresentaram positivas por meio do teste.

Uma vez que as cepas *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP e *A. pullulans* LB3.1 foram as mais promissoras quanto à produção de etanol a partir de xilose, elas foram as escolhidas para serem estudadas quanto às características que podem influenciar no processo de fermentação, tais como resistência a etanol, resistência a compostos inibidores presentes no mosto, bem como outras características que podem influenciar na produção de etanol durante o processo fermentativo, como pH, temperatura, concentração celular inicial, aeração e nutrientes (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Tais estudos são apresentados no capítulo seguinte.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAFFI, M. A.; SANTOS BEZERRA-BUSSOLI, C. DOS; ARÉVALO-VILLENA, M.; et al. Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 75–78, 2011.

BECKER, J.; BOLES, E. A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p. 4144-4150, 2003.

BEZERRA-BUSSOLI, C.; BAFFI, M. A.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Yeast diversity isolated from grape musts during spontaneous fermentation from a brazilian winery. **Current Microbiology**, v. 67, p. 356–361, 2013.

CADETE, R. M.; MELO, M. A; ZILLI, J. E.; et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel (D)-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 421–431, 2013.

CAROLAN, G.; CATLEY, B. J.; KELLY, P. J. Ethanol production during the growth cycle of *Aureobasidium pullulans*. **Biochemical Society Transactions**, v. 4, p. 1021–1022, 1976.

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

CHANDEL, A. K.; ES, C.; RUDRAVARAM, R.; et al. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies : an appraisal. **Biotechnology and**

Molecular Biology Review, v. 2, p. 14–32, 2007.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, p. 295–331, 1998.

GONG, C. S.; CHEN, L. F.; FLICKINGER, M. C.; CHIANG, L. C.; TSAO, G. T. Production of Ethanol from d-Xylose by Using d-Xylose Isomerase and Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 430–436, 1981.

GONG, C. S.; CLAYPOOL, T. A.; MCCracken, L. D.; et al. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 85–102, 1983.

GRABEK-LEJKO, D.; RYABOVA, O. B.; OKLEJEWICZ, B.; VORONOVSKY, A. Y.; SIBIRNY, A. A. Plate ethanol-screening assay for selection of the *Pichia stipitis* and *Hansenula polymorpha* yeast mutants with altered capability for xylose alcoholic fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 934–940, 2006.

GUAN, D.; LI, Y.; SHIROMA, R.; IKE, M.; TOKUYASU, K. Sequential incubation of *Candida shehatae* and ethanol-tolerant yeast cells for efficient ethanol production from a mixture of glucose, xylose and cellobiose. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 419–422, 2013.

GUO, C.; JIANG, N. Physiological and enzymatic comparison between *Pichia stipitis* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on xylose fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 541–547, 2013.

GUPTA, A.; DAS, S. P.; GHOSH, A.; et al. Bioethanol production from hemicellulose rich *Populus nigra* involving recombinant hemicellulases from *Clostridium thermocellum*. **Bioresource Technology**, v. 165, p. 205–213, 2014.

HECTOR, R. E.; DIEN, B. S.; COTTA, M. A.; MERTENS, J. A. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 1-12, 2013.

HICKERT, L. R.; CRUZ, M. M.; DILLON, A. J. P.; et al. Fermentation kinetics of acid–enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, and their co-cultivations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 61–67, 2014.

KARHUMAA, K.; WIEDEMANN, B.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BOLES, E.; GORWA-GRAUSLUND, M.-F. Co-utilization of L-arabinose and D-xylose by laboratory and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Microbial cell factories**, v. 5, p. 18-28, 2006.

KATO, H.; MATSUDA, F.; YAMADA, R.; et al. Cocktail δ -integration of xylose

- assimilation genes for efficient ethanol production from xylose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, p. 333–336, 2013.
- KNOSHAUG, E. P.; FRANDEN, M. A.; STAMBUK, B. U.; ZHANG, M.; SINGH, A. Utilization and transport of L-arabinose by non-*Saccharomyces* yeasts. **Cellulose**, v. 16, p. 729–741, 2009.
- KOSSACZKÁ, Z.; MACHOVÁ, E.; VOJTKOVÁ-LEPSIKOVÁ, A. Xylose metabolism in *Aureobasidium pullulans*: effects of aeration and vitamins. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 36, p. 375–378, 1991.
- LERTWATTANASAKUL, N.; SUPRAYOGI; MURATA, M.; et al. Essentiality of respiratory activity for pentose utilization in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 933–945, 2013.
- LIANG, M.; DAMIANI, A.; HE, Q. P.; WANG, J. Elucidating Xylose Metabolism of *Scheffersomyces stipitis* for Lignocellulosic Ethanol Production. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, p. 38–48, 2014.
- LORLIAM, W.; AKARACHARANYA, A.; SUZUKI, M.; OHKUMA, M.; TANASUPAWAT, S. Diversity and Fermentation Products of Xylose-Utilizing Yeasts Isolated from Buffalo Feces in Thailand. **Microbes and Environments**, v. 28, p. 354–360, 2013.
- MANITCHOTPISIT, P.; LEATHERS, T. D.; PETERSON, S. W.; et al. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Mycological Research**, v. 113, p. 1107–1120, 2009.
- MCMILLAN, J. D. **Xylose Fermentation to Ethanol: A Review**. Springfield: National Renewable Energy Laboratory, 1993.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.
- MOON, J.; LEWIS LIU, Z.; MA, M.; SLININGER, P. J. New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 247–254, 2013.
- MORAIS, C. G.; CADETE, R. M.; UETANABARO, A. P. T.; et al. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 19–28, 2013.
- NIGAM, J. N.; IRELAND, R. S.; MARGARITIS, A.; LACHANCE, M. A. Isolation and screening of yeasts that ferment D-xylose directly to ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 1486–1489, 1985.

- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25–33, 2000.
- RAO, R. S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 19–24, 2008.
- RICHARD, P.; VERHO, R.; PUTKONEN, M.; LONDESBOROUGH, J.; PENTTILÄ, M. Production of ethanol from L-arabinose by containing a fungal L-arabinose pathway. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 185–189, 2003.
- SEO, H.-P.; SON, C.-W.; CHUNG, C.-H.; et al. Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 293–299, 2004.
- SHUPE, A. M.; LIU, S. Ethanol fermentation from hydrolysed hot-water wood extracts by pentose fermenting yeasts. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 31–38, 2012.
- TOIVOLA, A.; YARROW, D.; BOSCH, E. VAN DEN. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, p. 1221–1223, 1984.
- TOMITAKA, M.; TAGUCHI, H.; FUKUDA, K.; AKAMATSU, T.; KIDA, K. Isolation and characterization of a mutant recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain with high efficiency xylose utilization. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 116, p. 706–715, 2013.
- WANG, C.; BAO, X.; LI, Y.; et al. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. **Metabolic Engineering**, v. 30, p. 79–88, 2015.
- WANG, D.; JU, X.; ZHOU, D.; WEI, G. Efficient production of pullulan using rice hull hydrolysate by adaptive laboratory evolution of *Aureobasidium pullulans*. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 12–19, 2014.
- WATANABE, T.; WATANABE, I.; YAMAMOTO, M.; ANDO, A.; NAKAMURA, T. A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1844–1848, 2011.

CAPÍTULO 3

**INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE XILOSE POR *Candida
shehatae* E *Aureobasidium pullulans***

RESUMO

A partir dos resultados obtidos no capítulo anterior, as cepas *Candida shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP e *Aureobasidium pullulans* LB3.1 foram escolhidas para serem avaliadas sob diversas condições de fermentação a fim de estudar seu comportamento e tentar encontrar as condições mais favoráveis para produção de etanol a partir de xilose. Assim, as cepas foram submetidas a testes de tolerância a ácidos, etanol e compostos inibidores que são liberados em alguns processos de tratamentos de materiais lignocelulósicos que precedem a hidrólise enzimática. Além disso, foi realizada a avaliação do desempenho das mesmas diante de parâmetros importantes em processos fermentativos como temperatura, pH, concentração celular inicial e concentração de nutrientes no meio. O conhecimento da influência desses parâmetros sobre cada cepa permitiu o delineamento de condições de fermentação que resultaram em maior consumo do açúcar e aumento da produtividade de etanol. As melhores condições de fermentação estabelecidas para *C. shehatae* foram 28°C, pH 4, concentração celular de 10 g.L⁻¹ e meio contendo 150 g.L⁻¹ de xilose com suplementação de 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 1 g.L⁻¹ de ureia, tendo-se alcançado 18,7 g.L⁻¹ de etanol. Para *A. pullulans*, essas condições foram 28°C, pH 4, concentração celular de 2 g.L⁻¹, e meio contendo 100 g.L⁻¹ de xilose com suplementação de 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura e ausência de ureia, que permitiram a obtenção de 17,5 g.L⁻¹ de etanol.

Palavras-chave: bioetanol, xilose, inibidores, ureia, extrato de levedura

1. INTRODUÇÃO

Entre as espécies de leveduras fermentadoras de pentoses, as que apresentam maior potencial estão *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* e *Kluyveromyces marxianus*. Sabe-se que alguns fatores do processo influenciam fortemente os rendimentos e produtividades de etanol durante a fermentação de pentoses por essas leveduras, entre eles estão a quantidade de oxigênio disponível, pH, temperatura, concentração celular inicial e suplementação do meio de cultivo com nutrientes. Além disso, há que se levar em consideração a presença de compostos que são gerados durante alguns processos de pré-tratamento para hidrólise do material lignocelulósico que são considerados inibidores do desempenho das leveduras em processo fermentativo. Muitos grupos de pesquisas vêm estudando a resposta das cepas de leveduras a esses fatores, abordando tanto leveduras que naturalmente fermentam pentoses quanto cepas modificadas geneticamente para tal função (MATSUSHIKA; SAWAYAMA, 2013; TAKAHASHI et al., 2013; ASK et al., 2013; UNREAN; NGUYEN, 2013; SEHNEM et al., 2013; DEMEKE et al., 2013; MORENO et al., 2013a; FARIAS et al., 2013).

Um dos principais fatores que influenciam a fermentação de pentoses é a oxigenação. Um nível de aeração se mostra necessário para atingir rendimentos satisfatórios de produção de etanol. A anaerobiose leva a quantidades insatisfatórias de etanol e acúmulo de xilitol devido ao desequilíbrio redox existente entre os cofatores NADH/NADPH (LIANG et al., 2013), enquanto a total aerobiose leva ao desenvolvimento de massa celular e pouca produção de etanol. Assim se faz necessário otimizar a disponibilidade de oxigênio em condições de microaerobiose (HANLY; HENSON, 2013; BELLIDO et al., 2013).

Os rendimentos e produção de etanol também são influenciados pela concentração de açúcar no meio de cultivo. Análises de cinética da produção de etanol mostram que maior concentração de açúcar representa maior produção de etanol, porém os rendimentos são maiores em presença de menores quantidades de açúcares. Nesse sentido, também é necessário buscar uma otimização entre concentração de açúcares e taxa de crescimento celular (UNREAN; NGUYEN, 2013; FARIAS et al., 2013).

A fonte de nitrogênio e sua quantidade também são fatores que podem aumentar a produção de etanol (PALNITKAR; LACHKE, 1992). Além disso, a suplementação do meio com nutrientes complexos também pode ser benéfica à produção de etanol. Estudos

envolvendo experimentos com meios sintéticos ou hidrolisados lignocelulósicos enriquecidos com nutrientes complexos, tais como extrato de levedura e peptona, com frequência, relatam maior acúmulo de etanol (DU PREEZ, 1994; OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; SILVA et al., 2010).

Além dos fatores comuns ao processo fermentativo, deve-se levar em consideração os compostos produzidos por meio de algumas metodologias da etapa de pré-tratamento envolvendo o uso de reagentes químicos em condições drásticas de temperatura e/ou pressão sobre o material lignocelulósico. Esses compostos inibem o desempenho das leveduras que fazem a fermentação alcoólica. Os inibidores mais citados e pesquisados são o furfural, o 5-hidroximetilfurfural (HMF) e o ácido acético. Furfural e 5-hidroximetilfurfural são formados pela degradação de pentoses e hexoses, respectivamente, e afetam os microrganismos por reduzirem suas atividades enzimáticas e biológicas, alterando o DNA e inibindo a síntese de RNA e proteínas (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988; MODING; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002). Já o ácido acético é formado pela hidrólise do grupo acetil presente na hemicelulose. A presença de ácidos orgânicos no meio fermentativo resulta em um aumento no consumo de ATP pela levedura. Nessas condições, parte do ATP que seria utilizado para crescimento ou fermentação é desviado para manutenção de seu pH interno (NARENDRANATH; THOMAS; INGLEDEW, 2001).

Entre as principais estratégias utilizadas por pesquisadores para superar as dificuldades metabólicas e a fim de desenvolver estirpes mais robustas para produção de bioetanol estão o engenheiramento do sistema redox (ASK et al., 2013), Engenharia Genética, mutação e Engenharia Evolutiva (ZUO et al., 2013; DEMEKE et al., 2013; LULU et al., 2013; SEHNEM et al., 2013; ZHA et al., 2014; SATO et al., 2014), co-expressão de transaldolase (TAL) e álcool desidrogenase (ADH) (ISHII et al., 2013; HASUNUMA et al., 2014), a utilização de compostos como CaO, resinas de troca iônica e enzimas como lacase a fim de desintoxicar o pré-tratado (TAKAHASHI et al., 2013; MORENO, et al., 2013ab), e o desenvolvimento de cepas tolerantes a inibidores por meio de adaptação ao hidrolisado (FAN et al., 2013).

Diante do exposto, fica clara a necessidade de se avaliar esses parâmetros para cepas recentemente isoladas e que apresentam potencial para fermentação, considerando as variações pertinentes ao gênero, espécie e até mesmo dentro da mesma espécie quando cepas diferentes são isoladas do ambiente. Assim, este Capítulo apresenta a avaliação das duas cepas de leveduras que mostraram potencial durante o processo de triagem de cepas fermentadoras de xilose, *Candida shehatae*, var. *shehatae* PT1-1BASP e

Aureobasidium pullulans LB3.1. As cepas foram avaliadas com relação à tolerância a compostos reconhecidos como inibidores do crescimento de leveduras, temperatura de incubação, pH inicial do mosto, concentração celular do inóculo e adição de nutrientes minerais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Teste de resistência a etanol e capacidade de utilizá-lo como fonte de carbono

Para esta fermentação, a fim de proporcionar um ambiente com limitação de oxigênio, foram utilizados tubos para coleta de sangue (16 x 100 mm), lavados e esterilizados, nos quais foi inserida, na região emborrachada da tampa, uma agulha de seringa estéril, contendo algodão na extremidade exposta ao ar, para que pudessem ocorrer trocas gasosas (**Figura 6**). Em cada tubo foram utilizados 2 mL de meio e foi utilizado um tubo para cada amostragem.



Figura 6: Tubos e agulhas utilizados em teste para avaliação da interferência de inibidores no desenvolvimento das cepas.

O inóculo foi feito por meio de uma suspensão de células em solução salina (NaCl 0,9%), de modo a atingir uma densidade óptica de 1 (leitura a 600 nm). Foram inoculados 100 µL da suspensão em cada tubo (0,05 de densidade óptica a 600 nm) contendo meio YEPD (1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose) com concentrações de etanol de 6, 10, 12 e 15%.

Os tubos foram incubados a 30°C e agitação de 100 rpm (permaneceram inclinados de modo a permitir a agitação do meio). Foram realizadas amostragens em 0, 24, 48 e 72 h para análise do crescimento celular, viabilidade e quantificação de açúcares redutores.

Além do experimento acima, também foi realizado um cultivo para avaliar a capacidade dessas leveduras de assimilar o etanol como fonte de carbono. As cepas foram incubadas em frascos Erlenmeyers vedados por 72 h em meio YNB contendo 4 g.L⁻¹ de etanol e foi feita a leitura da densidade óptica (OD) a 600 nm, em microplacas, a fim de avaliar o crescimento das mesmas.

2.2. Teste de resistência a acidez e tolerância a compostos aromáticos

Para avaliar a capacidade de crescimento das cepas selecionadas em presença de compostos reportados como inibidores de leveduras, realizou-se ensaios de fermentação alcoólica utilizando xilose como fonte de carbono e alguns desses compostos em diferentes concentrações. Estes compostos podem ser encontrados no hidrolisado dependendo da metodologia de pré-tratamento do material lignocelulósico. A **Tabela 6** apresenta os compostos analisados e a faixa de concentração testada.

Esses ensaios também foram realizados nos tubos de coletas de sangue com agulha inserida na região emborrachada da tampa. (metodologia descrita no item 2.1, Figura 6). Em cada tubo foi utilizado 1 mL de meio YNB contendo 2% de xilose e para cada cepa, foram utilizadas sete concentrações do composto teste e um controle (sem o inibidor). As concentrações do composto teste foram obtidas por diluições sucessivas (1:1), como descrito no capítulo 1, item 4.3.

O inóculo foi feito por meio de uma suspensão de células em solução salina (NaCl 0,9%), de modo a atingir uma densidade óptica de 0,6 (leitura a 600 nm). Foram inoculados 100 µL da suspensão em cada tubo (0,05 de densidade óptica a 600 nm) e incubados durante 48 h a 30°C e agitação de 100 rpm (permaneceram inclinados de modo a permitir a agitação do meio). Um tubo sem inóculo também foi incubado como controle da esterilidade do meio. Foi realizada a leitura da densidade óptica a 600 nm para avaliação do crescimento celular.

Tabela 6: Compostos inibidores analisados e a faixa de concentrações testadas

Composto inibidor	Concentrações (g.L ⁻¹)	Referência
Vanilina	0,03 a 2,0	DELGENES et al., (1996) KLINKE et al., (2004);
Ácido acético	0,2 a 15,0	TRAN; CHAMBERS, (1985) KLINKE et al., (2004);
Ácido fórmico	0,08 a 5,0	KLINKE et al., (2004); DELGENES et al., (1996)
Ácido levulínico	0,3 a 20,0	KLINKE et al., (2004);
Ácido láctico	0,8 a 50,0	MAIORELLA ET AL., (1983)
Ácido 4-hidroxibenzóico	0,08 a 5,0	KLINKE et al., (2004);
Furfural	0,03 a 2,0	DELGENES et al., (1996) KLINKE et al., (2004)
Hidroximetilfurfural (HMF)	0,08 a 5,0	DELGENES et al., (1996) KLINKE et al., (2004)

2.3. Estudo dos efeitos de parâmetros de cultivo sobre o potencial fermentativo

Foram realizados cultivos de fermentação alcoólica a fim de testar as características das cepas com relação aos diferentes parâmetros fermentativos. As leveduras foram pré-cultivadas em meio YEPD, a 30°C e agitação de 150 rpm, por 24 h. Após este período, alíquotas foram centrifugadas a 10000 x g por 15 minutos, separando-se a massa celular para ser inoculada. A fermentação foi feita em Erlenmeyers de 125 mL adaptados para fermentação alcoólica contendo 20 mL de meio basal - composto por KH₂PO₄ (2,0 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (2,0 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (1,0 g.L⁻¹), ureia (0,3 g.L⁻¹), CaCl₂ (0,3 g.L⁻¹), solução de sais (1,0 g.L⁻¹) xilose (60,0 g.L⁻¹) e extrato de levedura (10,0 g.L⁻¹) - sob agitação de 100 rpm durante 96 h. A cada amostragem um Erlenmeyer foi retirado para análise de crescimento e viabilidade celular, do consumo de açúcares e da produção de etanol. As condições de fermentação a serem avaliadas nesses ensaios foram:

Efeito da concentração celular: Para avaliar a influência da concentração inicial de células na produção de etanol, foram empregadas concentrações de massa celular de 2 g.L⁻¹, 5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹ (a temperatura de incubação foi de 30°C e o pH do meio foi 5).

Temperatura e pH: as leveduras foram incubadas em combinações de meio contendo pH inicial de 4,0, 5,0 e 6,0 e em temperaturas de 28, 32, 40 e 45°C. (o inóculo foi de 4 g.L⁻¹).

Efeito da concentração de nutrientes: Foram realizados testes em combinações de ureia em concentrações de 0,0, 0,3 e 1 g.L⁻¹, de extrato de levedura em concentrações

de 5 e 10 g.L⁻¹ e de xilose em concentrações de 50, 100 e 150 g.L⁻¹ (o inóculo foi de 4 g.L⁻¹ e a temperatura de incubação foi de 28°C e o pH do meio foi 4).

2.4. Métodos Analíticos

2.4.1. Avaliação de crescimento

Para a determinação da massa celular, amostras (2,0 mL) do cultivo foram tomadas, em intervalos de tempo definidos, transferidas para Eppendorfs de peso conhecido e centrifugadas a 6000 x g, por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para quantificação do consumo de açúcares e o precipitado de células foi, então, levado a estufa a 60 °C, no próprio Eppendorf até peso constante.

2.4.2. Avaliação de viabilidade celular e taxa de brotamento

A determinação da viabilidade celular e taxa de brotamento foram periodicamente acompanhadas através do método de coloração com eritrosina. Amostras de 200 µL foram transferidas para 200 µL da solução padrão eritrosina e homogeneizadas. Após 10 minutos, tempo necessário para que as células absorvam o corante, procedeu-se à contagem em câmara de Neubauer. As células viáveis apresentaram-se incolores, enquanto as inviáveis, vermelhas. Com a morte da célula, a membrana celular perde sua propriedade seletiva dos compostos que entram e saem da célula e, portanto, o corante consegue acessar o citoplasma.

A solução de eritrosina foi preparada diluindo-se 1 g de eritrosina em 100 mL de água destilada. Em seguida, 1 mL desta solução foi diluída em 50 mL de solução tampão (0,2 M de Na₂HPO₄ e 0,2 M de NH₂PO₄) e mantida a 7°C.

A Viabilidade celular foi calculada por meio da equação:

$$\text{Viabilidade (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ de células vivas} / \text{n}^\circ \text{ de células vivas} + \text{n}^\circ \text{ de células inviáveis}) \times 100$$

A taxa de brotamento foi calculada por meio da equação:

$$\text{Brotamento (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ de células viáveis em brotamento} / \text{n}^\circ \text{ de células viáveis}) \times 100$$

2.4.3. Quantificação de etanol

A quantificação do etanol produzido foi realizada por cromatografia em fase gasosa com injeção por head-space utilizando-se 6 mL do fermentado acondicionado em tubos de penicilina com septo de borracha, lacrado e mantido a 40°C por 10 minutos. Com uma seringa do tipo gas-tight de 500 µL foram coletados 200 µL da fase gasosa e injetados no cromatógrafo. O cromatógrafo gasoso (Perkin Elmer - Clarus 480) foi equipado com uma coluna Carbowax 20M (30m, 0.32mm, 0.25µm). O gás de arraste foi o nitrogênio com fluxo de 30 mL/min. As temperaturas dos blocos de injeção e detecção foram de 200°C. A quantificação foi realizada com curva de calibração construída a partir de análises de soluções etanol: água em diferentes proporções (0,1; 0,5; 1; 2 e 5% de etanol).

2.4.4. Quantificação de açúcares

A quantificação de açúcar redutor das fermentações em meio semissintético foi feita pelo método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS), adaptado a partir de Miller (1959). Em um tubo de ensaio, foram misturados 1,0 mL da amostra e 1,0 mL de DNS. A mistura foi levada a banho em ebulição por 10 minutos e, em seguida, a banho de gelo para resfriar. A esta mistura foi adicionado 8,0 mL de água destilada e a leitura da absorbância feita a 540 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em mg de açúcar redutor/mL pela curva padrão do açúcar utilizado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teste de resistência a etanol e capacidade de utilizá-lo como fonte de carbono

Uma das vantagens da utilização da levedura *S. cerevisiae* em fermentações alcoólicas é sua forte resistência ao etanol produzido, apresentando inibição a partir de 14% do composto (GUAREIB et al., 1988; JOLLY et al., 2006; JENSEN et al., 2009). Entre as propostas de rotas tecnológicas de processo de produção de etanol a partir de lignocelulósicos está a co-fermentação de hexoses e pentoses, utilizando uma levedura fermentadora de pentoses em co-cultivo com a *S. cerevisiae*, fermentadora de hexoses. Assim, a resistência ao etanol é uma característica necessária à cepa a ser aplicada em processo industrial de produção de etanol e deve ser levado em conta nos estudos de busca de uma cepa promissora (HICKERT et al., 2013).

A **Figura 7** apresenta as curvas de consumo de açúcar e taxa de viabilidade das cepas *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP e *A. pullulans* LB3.1, durante cultivo em

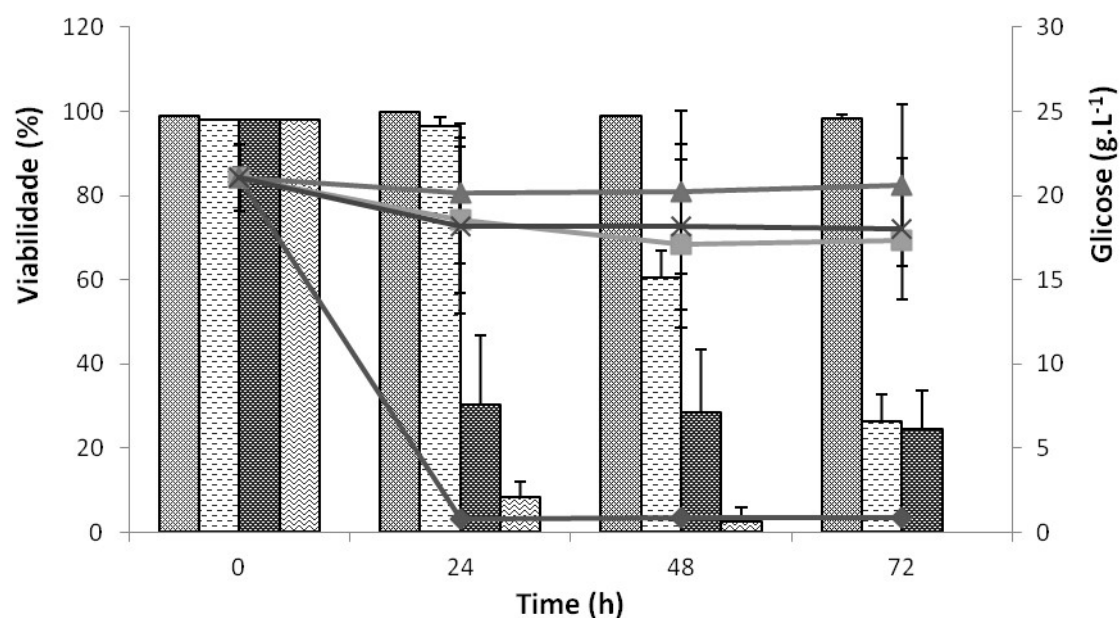
meio YEPD contendo etanol em diferentes concentrações, incluindo ausência de etanol como controle. Na ausência de etanol, as cepas consumiram o açúcar em 24 h de cultivo e mantiveram a viabilidade em cerca de 90%. E em meio contendo 6% de etanol, as cepas consumiram entre 3 e 4 g.L⁻¹ de açúcar e, no final do cultivo (72 h), mantiveram cerca de 27% de viabilidade. A cepa PT1-1BASP apresentou cerca de 25% de viabilidade na presença de 10 e 12% de etanol. A menor viabilidade foi observada para a cepa LB3.1 em 12% de etanol. No entanto, em 10% de etanol esta cepa apresentou 40% de viabilidade.

Houve forte inibição do consumo de açúcares redutores em presença de etanol em todas as concentrações testadas, mas a viabilidade conseguiu ser mantida em 40% ou mais em até 12% de etanol nas primeiras 24 h.

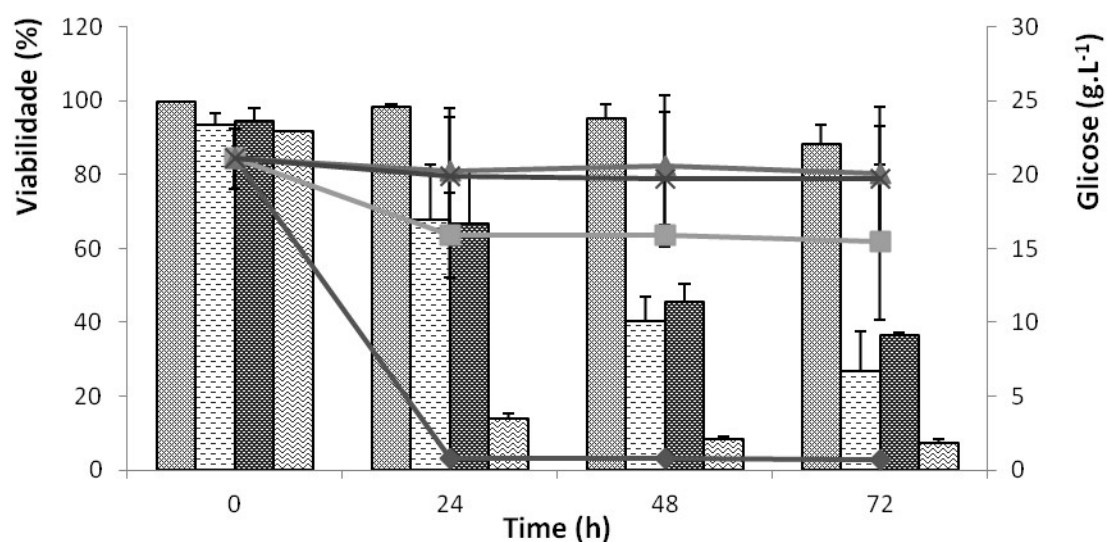
Uma fermentação alcoólica padrão utilizando *Saccharomyces cerevisiae* costuma ter entre 7 e 11% de etanol ao final do cultivo e esta cepa é com frequência apontada por ser fortemente adaptada a altas concentrações de etanol (CECCATO-ANTONINI, 2010). Dentro deste contexto, a inibição apresentada pelas cepas está dentro do esperado para uma célula microbiana considerando que soluções hidroalcoólicas interferem na integridade das membranas celulares e desnaturam proteínas. Essa inibição pode vir a ser um problema em caso cofermentação com *S. cerevisiae* para aproveitamento simultâneo de glicose e xilose de mosto lignocelulósico (CASTAÑÓN-RODRÍGUEZ et al., 2014), entretanto, em fermentação apenas com pentoses o teor alcoólico previsto pode ser fora da faixa de inibição das células. Slininger et al. (2011) mostraram que concentrações por volta de 15 a 50g.L⁻¹ de etanol reprimem, progressivamente, a indução das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, específicas do metabolismo de xilose, contudo, o transporte da xilose para dentro da célula não foi inibido.

Figura 7: Viabilidade e consumo de glicose em meio YEPD contendo diferentes concentrações de etanol: A) *Candida shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP, B) *Aureobasidium pullulans* LB3.1

A)



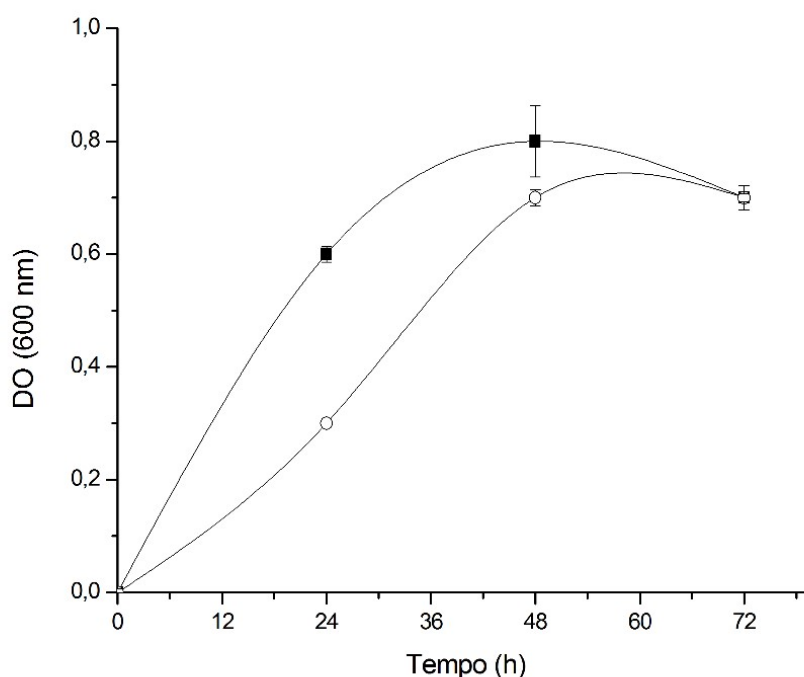
B)



Viabilidade: - 0% etanol; - 6% etanol; - 10% etanol; - 15% etanol. Consumo de glicose: - 0% etanol; - 6% etanol; - 10% etanol; - 15% etanol.

Um cultivo para avaliar a capacidade dessas leveduras de assimilar o etanol como fonte de carbono também foi realizado, uma vez que a assimilação de etanol não é interessante num processo que visa a produção do composto. As cepas foram capazes de assimilar o etanol, sendo que a cepa *Candida shehatae* PT1-1BASP apresentou-se um pouco mais rápida no crescimento a partir do composto, **Figura 8**.

Figura 8: Crescimento das cepas em meio contendo apenas etanol (4 g.L^{-1}) como fonte de carbono, a 28°C e 150 rpm de agitação.



Candida shehatae var. *shehatae* PT1-1BASP (■) e *Aureobasidium pullulans* LB3.1 (○)

A assimilação do etanol pelas cepas é uma desvantagem para a produção de etanol industrial e a maior parte das linhagens é apontada como capazes de assimilar o etanol a partir da exaustão da fonte de açúcar do meio fermentativo (DU PREEZ; VAN DER WALT, 1983; SCHÜLLER, 2003). Entretanto, Carolan, Catley e Kelly (1976) observaram o possível consumo de etanol por *A. pullulans* ao mesmo tempo em que a cepa produzia o composto.

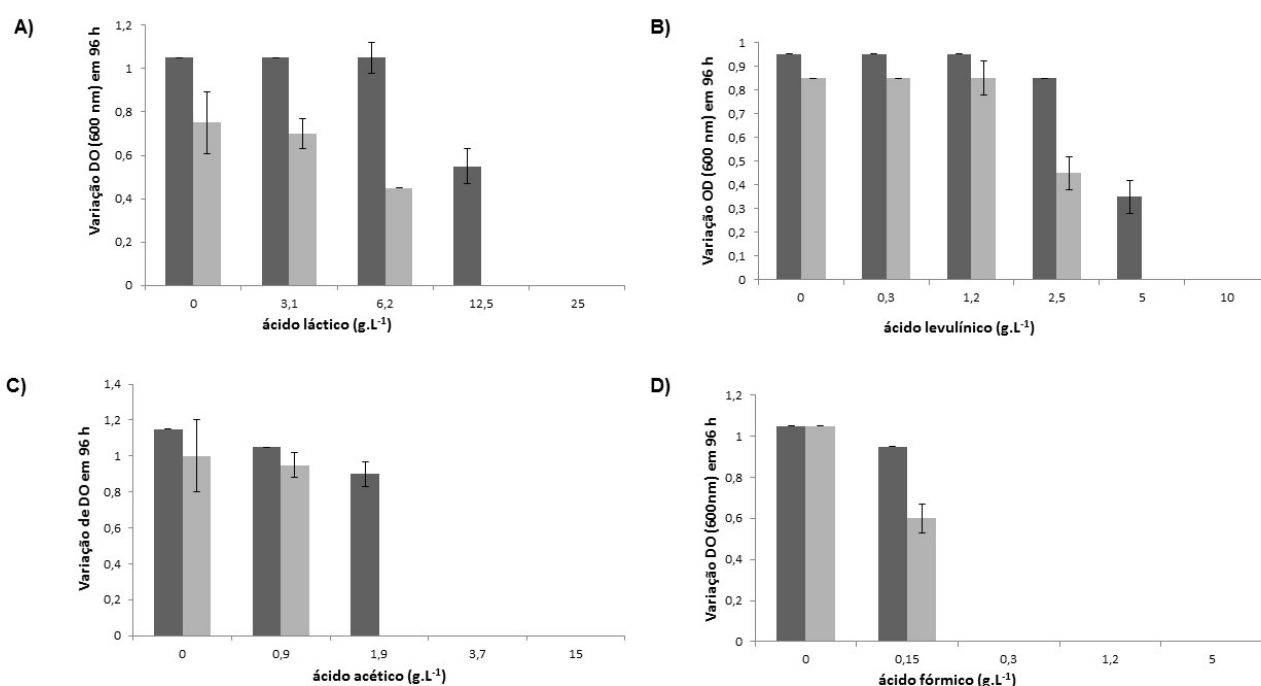
Algumas estratégias podem resolver o problema da assimilação de etanol. Lertwattanasakul e colaboradores (2013) utilizaram mutação para obter uma cepa de *Kluyveromyces marxianus* incapaz de crescer em fontes de carbonos não fermentescíveis,

tais como acetato e glicerol, o que levou ao aumento dos rendimentos e produção de etanol, provavelmente devido à não assimilação do etanol produzido.

3.2. Teste de resistência a acidez e tolerância a compostos aromáticos

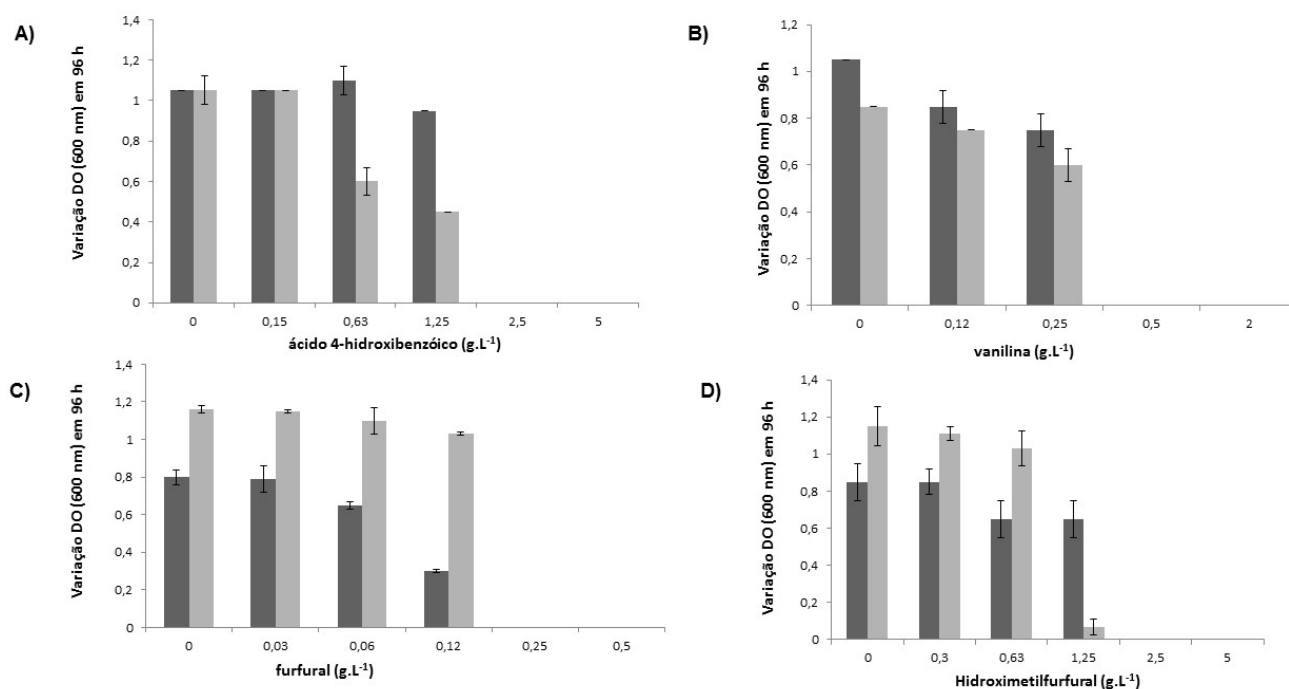
Dependendo da metodologia utilizada na etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico, pode acontecer a liberação de compostos que causam a inibição tanto do processo de sacarificação enzimática quanto da etapa de fermentação alcoólica. As cepas foram testadas quanto à capacidade de crescer na presença de alguns desses compostos e, de uma forma geral, a cepa *A. pullulans* LB3.1 apresentou maior inibição aos ácidos láctico, acético, levulínico e hidroxibenzóico do que a cepa *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP, Figuras 9 e 10.

Figura 9: Variação da densidade óptica em 96 h de cultivo das cepas na presença de diferentes concentrações de inibidores ácidos e utilizando xilose como fonte de carbono. A) ácido láctico; B) ácido levulínico; C) ácido acético; D) ácido fórmico.



Candida shehatae var. *shehatae* PT1-1BASP (■) e *Aureobasidium pullulans* LB3.1 (▒)

Figura 10: Variação da densidade óptica em 96 h de cultivo das cepas na presença de diferentes concentrações de inibidores fenólicos e utilizando xilose como fonte de carbono. A) ácido 4-hidroxibenzóico; B) vanilina; C) furfural; D) hidroximetilfurfural.



Candida shehatae var. *shehatae* PT1-1BASP (■) e *Aureobasidium pullulans* LB3.1 (▒)

A **Figura 9A** mostra a inibição total do crescimento das cepas de *C. shehatae* PT1-1BASP e *A. pullulans* LB3.1 com o uso de 25 g.L⁻¹ de ácido láctico. A cepa de *C. shehatae* foi mais resistente ao ácido levulínico, com forte inibição em 10 g.L⁻¹ do composto, já a cepa de *A. pullulans* apresentou inibição em 5 g.L⁻¹, **Figura 9B**. Com relação ao ácido acético, a estirpe de *C. shehatae* mostrou o dobro de resistência em relação a *A. pullulans*, apresentando total inibição em 3,7 g.L⁻¹ do ácido contra 1,9 g.L⁻¹ para a segunda levedura, **Figura 9C**.

Ambas as cepas foram inibidas com 2,5 g.L⁻¹ de ácido hidroxibenzóico e hidroximetilfurfural, **Figuras 10A e 10D**, respectivamente. Enquanto uma baixa resistência foi obtida para o ácido fórmico, a vanilina e o furfural, com 0,3, 0,5 e 0,25 g.L⁻¹, respectivamente, **Figuras 9D, 10B e 10C**.

Baseado nos dados da literatura, a inibição de crescimento de leveduras e/ou produção de etanol varia de acordo com o composto. Com relação aos ácidos orgânicos, as concentrações estão nos valores de 0,4 a 20 g.L⁻¹. A menor concentração refere-se ao ácido hidroxibenzóico, seguido de HMF com inibição em 2,5 g.L⁻¹. O início da inibição para

os ácidos acético e fórmico é de 5 g.L⁻¹. Com menor influência inibição estão o ácido levulínico, que ocorre em 20 g.L⁻¹ e o ácido láctico em 38 g.L⁻¹. Já os compostos vanilina e furfural são fortes inibidores do crescimento de leveduras em concentrações a partir de 1 g.L⁻¹ (TRAN; CHAMBERS, 1985; NISHIKAWA et al., 1988; DELGENES et al., 1996; KLINKE et al., 2004; ENDO et al., 2008).

As cepas apresentaram valores de tolerância para o ácido 4-hidroxibenzóico acima dos encontrados na literatura, enquanto a tolerância ao composto HMF foi semelhante ao encontrado nos outros trabalhos citados (TRAN; CHAMBERS, 1985; NISHIKAWA et al., 1988; DELGENES et al., 1996; KLINKE et al., 2004; ENDO et al., 2008). Para o restante dos compostos testados as cepas avaliadas apresentaram maior sensibilidade quando comparadas com esses dados de literatura, o que leva à necessidade de desintoxicação do hidrolisado de biomassa lignocelulósica antes do inóculo da levedura para a fermentação ou buscar métodos de hidrólise dessa biomassa com menor geração desses compostos.

3.3. Estudo dos efeitos de parâmetros de cultivo sobre o potencial fermentativo

Alguns parâmetros do processo fermentativo podem influenciar a produção de etanol de acordo com as características de cada levedura. Assim, algumas dessas características foram testadas visando melhorar o desempenho das cepas.

3.3.1. Efeito da concentração celular

A influência da concentração inicial de células na produção de etanol foi avaliada nas concentrações de massa celular de 2 g.L⁻¹, 5 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹. A cepa *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP se manteve como a mais eficiente produtora de etanol, apresentando melhor consumo de açúcar (91%) e melhor produção de etanol (15 g.L⁻¹), com uma concentração celular inicial de 10 g.L⁻¹ (**Figura 11a**) e alcançando rendimento de 0,28 g de etanol/g de xilose consumida, o que corresponde a 55% do valor teórico (0,51). O rendimento de produção de biomassa foi de 0,2 g/g e a produtividade volumétrica de etanol foi de 0,16 g.L⁻¹.h⁻¹. Além disso, a maior produção de biomassa pela cepa *C. shehatae* PT1-1BASP também foi em 10 g.L⁻¹ de inóculo, **Figura 11b**. Na mesma figura observa-se que a menor formação de biomassa foi encontrada utilizando 2 g.L⁻¹ de inóculo inicial. Nesta concentração ocorreu o menor consumo de açúcar em 24 e 96 h, **Figura 11a**.

Nas concentrações de 2 e 5 g.L⁻¹ pouca diferença foi observada no consumo de açúcar e produção de etanol. No mesmo período, mas com 2 g.L⁻¹, houve consumo de

76% de açúcar e produção de 11 g.L⁻¹ de etanol. Valores próximos a esses foram obtidos em 48 h, com 5 g.L⁻¹, sendo 79% de açúcar consumido e 12 g.L⁻¹ de etanol produzidos, **Figura 11a**. Em todas as concentrações de células, a cepa *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP apresentou baixo crescimento e alta viabilidade (**Figuras 11b e 12b**). A taxa de brotamento nas primeiras 24 h foi maior, com uma queda em 48 h para todas as concentrações, apresentando queda gradativa até 96 h em 2 e 5 g.L⁻¹. A estabilidade foi alcançada em 10 g.L⁻¹ entre 48-96 h, **Figura 12a**.

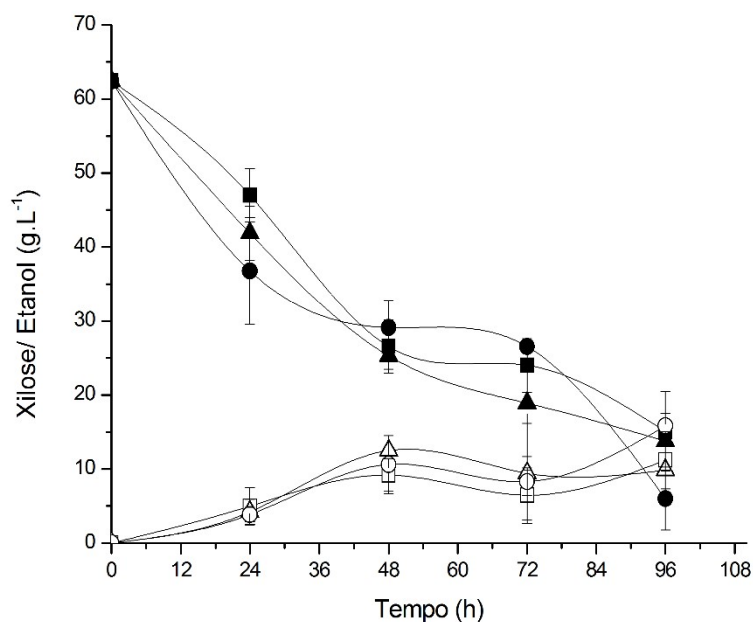
A **Figura 12b** mostra queda na viabilidade nas três concentrações testadas. Com 2 g.L⁻¹ a viabilidade caiu ligeiramente após 48 h, mantendo-se praticamente estável até o final. Já com 5 g.L⁻¹ a queda da viabilidade foi gradual entre 48 e 96 h.

Os resultados da literatura, relacionados à concentração celular inicial ideal para aplicação na fermentação de xilose, são variados. Slininger et al. (2011) utilizando *S. stipitis*, observou aumento da produtividade de etanol, a partir de uma mistura de glicose e xilose, quando utilizou baixa densidade de células. Agbogbo e colaboradores (2007), utilizando *S. stipitis* observaram que uma alta densidade de células inicial aumentou a taxa de utilização da xilose, formação de etanol e rendimento de etanol. O melhor resultado foi alcançado utilizando uma concentração de 6,5 g.L⁻¹. Já Matsushika et al. (2010), utilizando recombinante floculenta de *S. cerevisiae*, observaram que houve aumento de taxas, tanto de consumo de xilose quanto de produção de etanol e a maior taxa de consumo de xilose e produção de etanol foi atingida com uma concentração celular inicial de 13,1 g.L⁻¹, porém o aumento da densidade do inóculo não teve efeito positivo na concentração máxima e rendimento de etanol. Além disso, ambos os trabalhos relataram maior produção de subprodutos, como o xilitol, com o aumento da quantidade do inóculo.

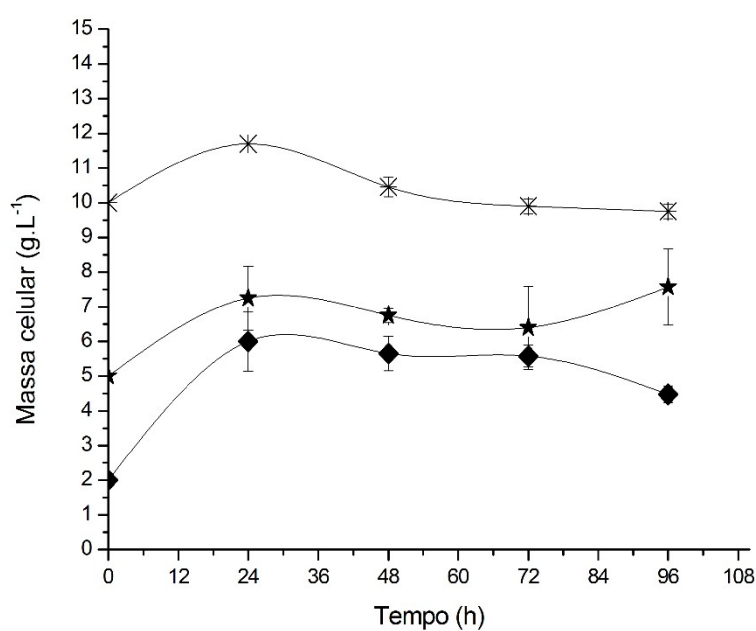
Trabalhos que visam a produção de xilitol confirmam que o aumento da densidade celular aumenta a produção de xilitol. Alguns autores atribuem esse aumento à consequência da diminuição do oxigênio pelo aumento da população, o que favorece o acúmulo de xilitol (PARAJÓ et al., 1996; SAMPAIO et al., 2005 FINKELSTEIN; DAVISON, 2012). Por outro lado, Cao e colaboradores (1994), não observaram aumento de produção de xilitol, mas conseguiram diminuir o tempo de fermentação com o aumento do inóculo. Enquanto Roberto et al. (1996), trabalhando com *C. guilliermondii*, aumentaram a densidade celular de 0,67 a 2,4 g/L e, consequentemente observaram queda na formação de biomassa, utilização de xilose e acúmulo de xilitol.

Figura 11: Ensaios de fermentação alcoólica da cepa *Candida shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP, empregando diferentes concentrações iniciais de células e utilizando meio basal contendo xilose (60 g.L^{-1}). A) consumo de xilose e produção de etanol; B) crescimento microbiano.

A)



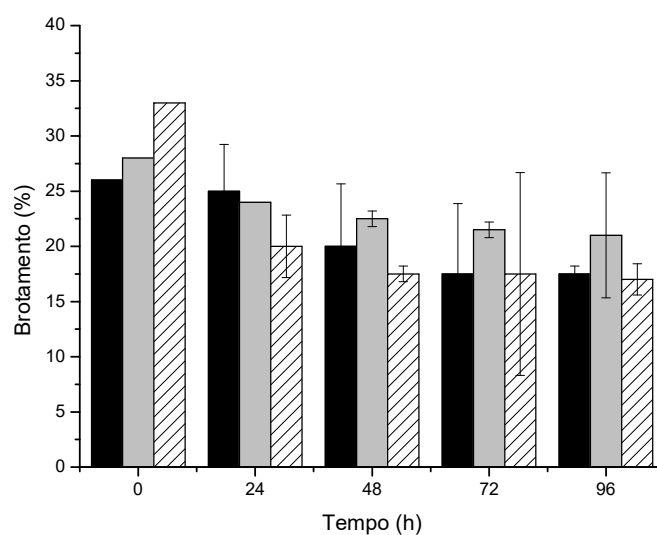
B)



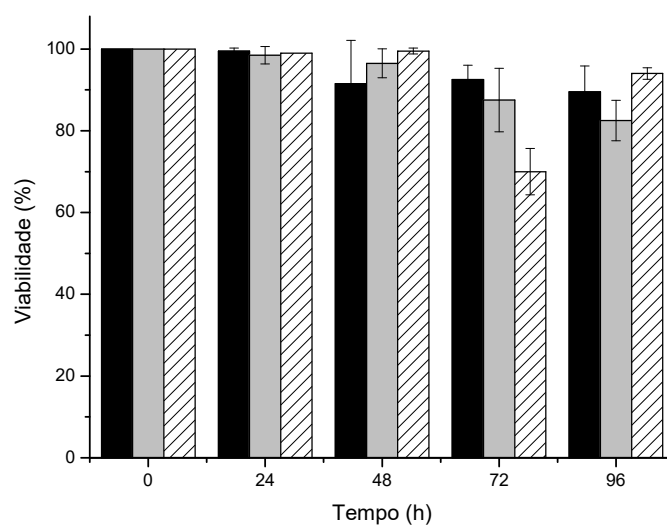
A) Símbolos abertos correspondem à produção de etanol e símbolos fechados correspondem ao consumo de xilose, 2 g.L^{-1} (—■—, —□—), 5 g.L^{-1} (—▲—, —△—), 10 g.L^{-1} (—●—, —○—). B) 2 g.L^{-1} (—◆—), 5 g.L^{-1} (—★—), 10 g.L^{-1} (—✱—).

Figura 12: Ensaios de fermentação alcoólica da cepa *Candida shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP, empregando diferentes concentrações iniciais de células e utilizando meio basal contendo xilose (60 g.L⁻¹). A) taxa de brotamento; B) taxa de viabilidade.

A)



B)



Inóculo inicial: 2 g.L⁻¹ (■), 5 g.L⁻¹ (■), 10 g.L⁻¹ (▨).

A levedura *A. pullulans* LB3.1 apresentou melhores resultados de consumo de açúcar e produção de etanol com concentração celular inicial de 2 g.L⁻¹ (**Figura 13**). A cepa utilizou grande parte de açúcar para produção de biomassa (0,7 g/g) e alcançou rendimento de produção de etanol de 0,23 g/g, correspondendo a 45% do valor teórico e a produtividade volumétrica de etanol foi de 0,11 g.L⁻¹.h⁻¹.

O consumo de açúcar mais rápido e a maior produção de biomassa pela cepa *A. pullulans* LB3.1 foram alcançados com 5 g.L⁻¹ de inóculo inicial. Com 10 g.L⁻¹ de inóculo a cepa apresentou o menor crescimento, com um máximo de 29 g.L⁻¹ de massa celular, e menor consumo de açúcar, 23 g.L⁻¹.

Ao contrário da cepa *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP, a *A. pullulans* LB3.1 apresentou melhores resultados do consumo do açúcar, 96%, e produção de etanol, 11 g.L⁻¹, com 2 g.L⁻¹ de inóculo inicial em 96 h. Apesar do seu consumo de açúcar ter sido maior, 99,7%, em 5 g.L⁻¹, a obtenção de etanol máxima foi de 7 g.L⁻¹ em 72 h. Com 10 g.L⁻¹ obteve-se os menores valores de consumo de açúcar, 56%, e 6 g.L⁻¹ de etanol.

Um declínio gradativo foi observado no crescimento, **Figura 13b**, brotamento e viabilidade (**Figura 14ab**) com 10 g.L⁻¹ de inóculo. No entanto, não houve brotamento em 96 h.

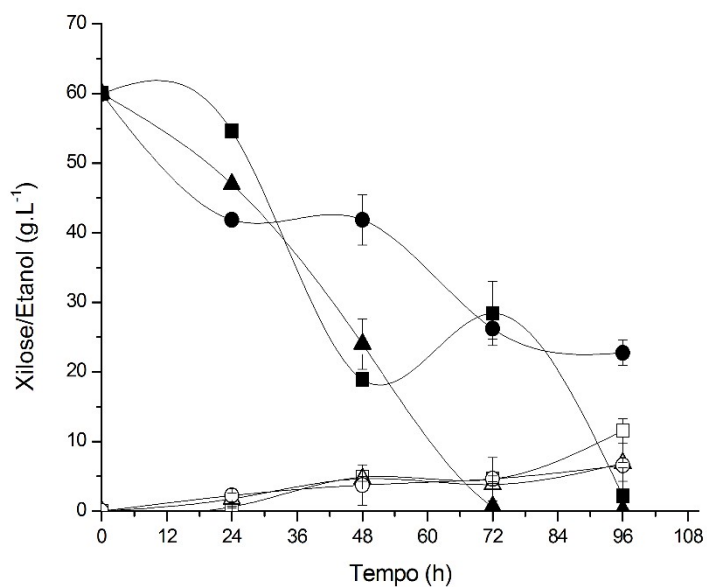
A taxa de brotamento diminuiu a partir de 48 h com o uso de 2 e 5 g.L⁻¹ de inóculo, com posterior estabilidade com 2 g.L⁻¹. Já em 5 g.L⁻¹ a queda persistiu até 96 h. Os dados na **Figura 14b** indicam a viabilidade diminuiu para o inóculo inicial de 2 g.L⁻¹ em 72 h de cultivo, com aumento em 96 h. Com inóculo inicial de 5 g.L⁻¹ houve estabilização da viabilidade entre 48-96 h.

Ao que parece, a quantidade de concentração celular inicial é relativo e depende da espécie ou mesmo da linhagem aplicada. A grande diferença de resultados entre as duas cepas estudadas neste trabalho e a diversificação dos dados encontrados na literatura fortalece a ideia da necessidade do estudo individual de cada estirpe.

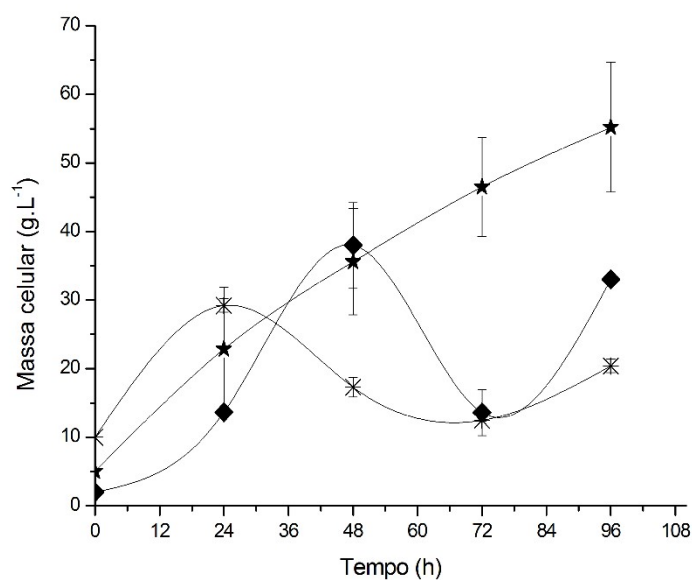
A cepa *Aureobasidium pullulans* LB3.1 apresentou maior necessidade de crescimento unido à produção de etanol do que a cepa *Candida shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP, que em ensaios de fermentação alcoólica apresenta baixo crescimento. Talvez essa diferença de comportamento seja devido ao desequilíbrio redox, que seria mais acentuado na cepa *Aureobasidium pullulans* LB3.1, fazendo com que a cepa necessite do processo de crescimento e respiração para amenizar o desequilíbrio entre os cofatores NADPH/NAD⁺ (LIANG et al., 2013).

Figura 13: Ensaios de fermentação alcoólica da cepa *Aureobasidium pullulans* LB3.1, empregando diferentes concentrações iniciais de células e utilizando meio basal contendo xilose (60 g.L^{-1}). A) consumo de xilose e produção de etanol; B) crescimento microbiano.

A)



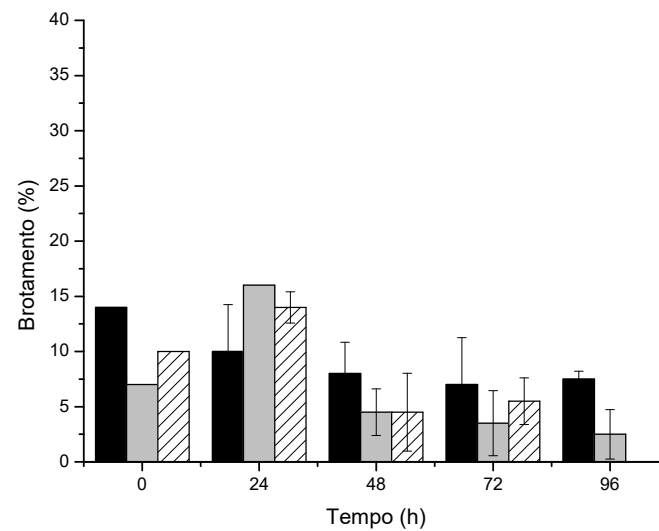
B)



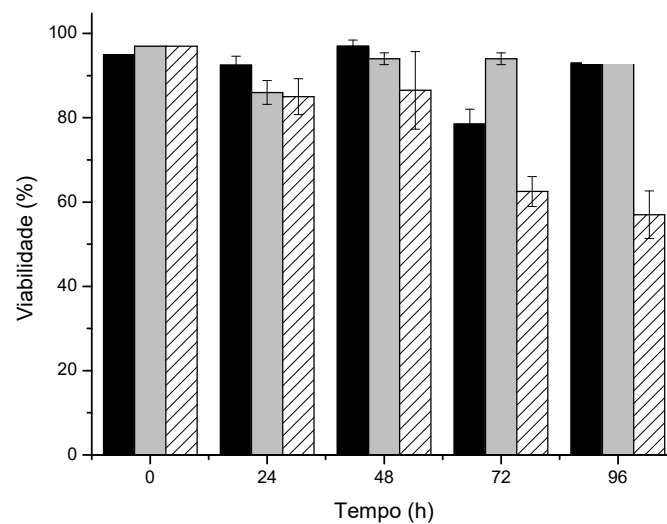
A) Símbolos abertos correspondem à produção de etanol e símbolos fechados correspondem ao consumo de xilose; 2 g.L^{-1} ($\blacksquare$, $\square$), 5 g.L^{-1} ($\blacktriangle$, $\triangle$), 10 g.L^{-1} ($\bullet$, $\circ$); B) 2 g.L^{-1} ($\blacklozenge$), 5 g.L^{-1} ($\blackstar$), 10 g.L^{-1} ($\times$).

Figura 14: Ensaio de fermentação alcoólica da cepa *Aureobasidium pullulans* LB3.1, empregando diferentes concentrações iniciais de células e utilizando meio basal contendo xilose (60 g.L^{-1}). A) taxa de brotamento; B) taxa de viabilidade

A)



B)



Inóculo inicial: 2 g.L⁻¹ (■), 5 g.L⁻¹ (■), 10 g.L⁻¹ (▨)

A cepa de *C. shehatae* apresenta vantagem sobre *A. pullulans* considerando tanto o fato da menor necessidade de oxigênio e crescimento durante a produção de etanol, quanto a maior produção de etanol apresentada. Além disso, a espécie *C. shehatae* é muito relatada na literatura como promissora na fermentação de xilose, enquanto a espécie de *A. pullulans* apresenta apenas relatos de baixíssimas produções de etanol, a alta produção de etanol apresentada por esta cepa LB3.1 desperta curiosidade.

3.3.2. Efeito de Temperatura e pH

Para avaliar o efeito do pH e temperatura na produção de etanol, as leveduras foram incubadas em combinações de meio contendo pH inicial de 4,0, 5,0 e 6,0 e em temperaturas de 28, 32 e 40°C.

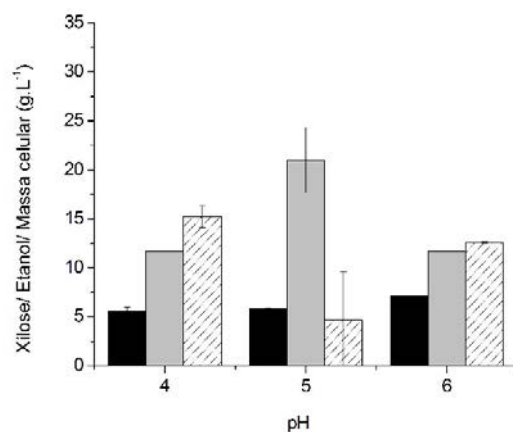
Na **Figura 15**, a produção de etanol da cepa *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP variou entre 0 g.L⁻¹ (pH 4 e 6, a 32°C) e 15 g.L⁻¹ (pH 4, a 28°C), enquanto a produção de etanol da cepa *A. pullulans* LB3.1 variou de 0 g.L⁻¹ (pH 4, 5 e 6 a 40°C) a 15 g.L⁻¹ (pH 4 a 28°C), **Figura 17**.

Para a cepa *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP a variação da temperatura teve maior influência no consumo de açúcar (**Figura 15**) e a viabilidade das cepas (**Figura 16**) do que a variação do pH. No caso da cepa *A. pullulans* LB3.1, a temperatura também influenciou fortemente o consumo do açúcar, crescimento (**Figura 17**) e a viabilidade (**Figura 18**), além disso, a 28°C, percebe-se uma preferência para o pH 4 quando analisamos o consumo da xilose e produção de etanol (**Figura 17**).

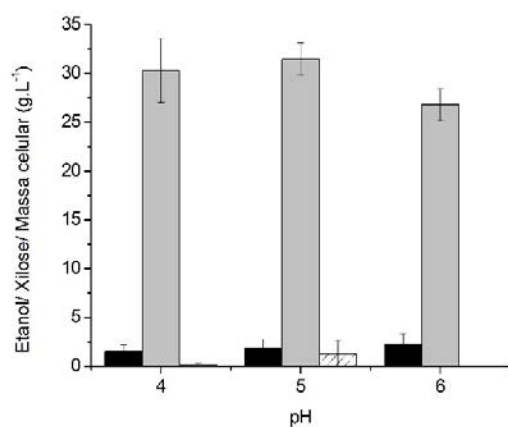
A definição das condições de melhor temperatura e pH levou a cepa *A. pullulans* LB3.1 a alcançar a cepa *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP em quantidade de produção de etanol, bem como permitiu às cepas aumentar rendimentos e eficiência de conversão quando comparadas aos experimentos anteriores. Os rendimentos alcançados pelas cepas *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP e *A. pullulans* LB3.1 foram de 0,32 e 0,28 g de etanol/ g de xilose, respectivamente. A eficiência de conversão foi de 63% para *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP e 55% para *A. pullulans* LB3.1 e a produtividade volumétrica foi de 0,16 g.L⁻¹.h para ambas as cepas.

Figura 15: Peso seco, teores de xilose e etanol no meio de fermentação usando *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP, durante 96 h para 28 °C (A) e 32 °C (B) e 72 h para 40 °C (C), aplicando diferentes temperaturas e pH.

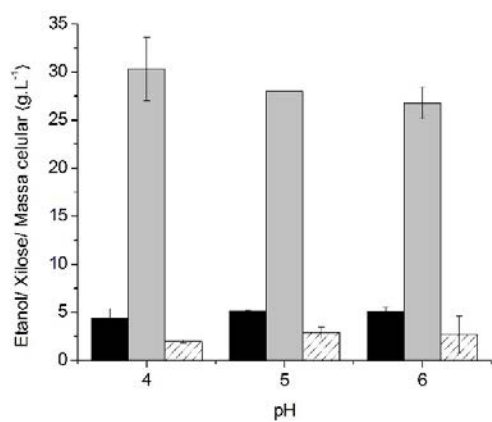
A)



B)



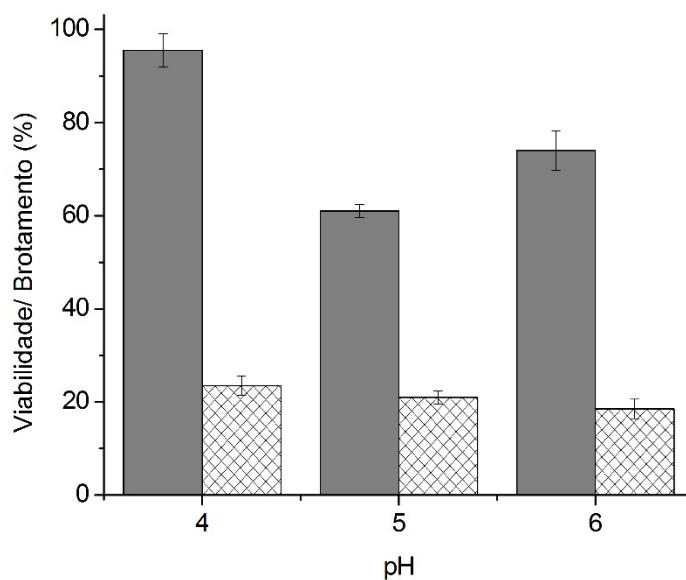
C)



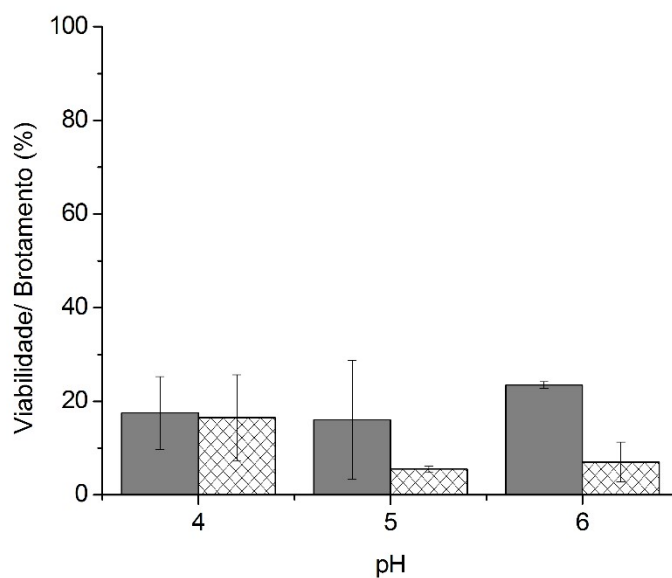
Massa celular (■), Xilose (□), Etanol (▨)

Figura 16: Taxa de viabilidade e brotamento em fermentação alcoólica de *Candida shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP, durante 96 h, aplicando diferentes temperaturas e pH. A) 28°C; B) 32°C.

A)



B)

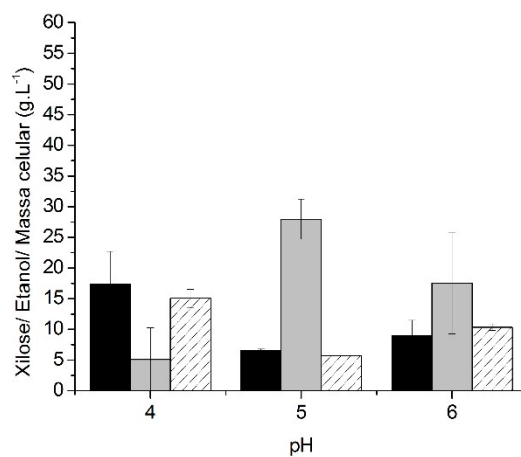


Taxa de viabilidade (■) e brotamento (▨)

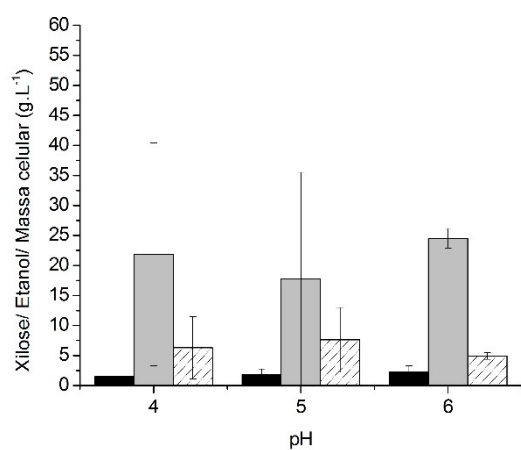
Obs.: na fermentação a 40°C as leveduras estavam todas inviáveis em 72 h de fermentação.

Figura 17: Massa celular, quantidade de xilose e etanol em fermentação alcóolica de *Aureobasidium pullulans* LB3.1, durante 96 h para 28 (A) e 32°C (B) e 24 h para 40°C (C), aplicando diferentes temperaturas e pH.

A)



B)



C)

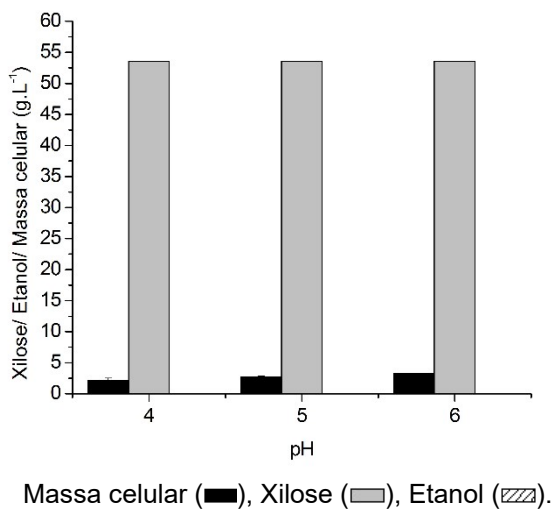
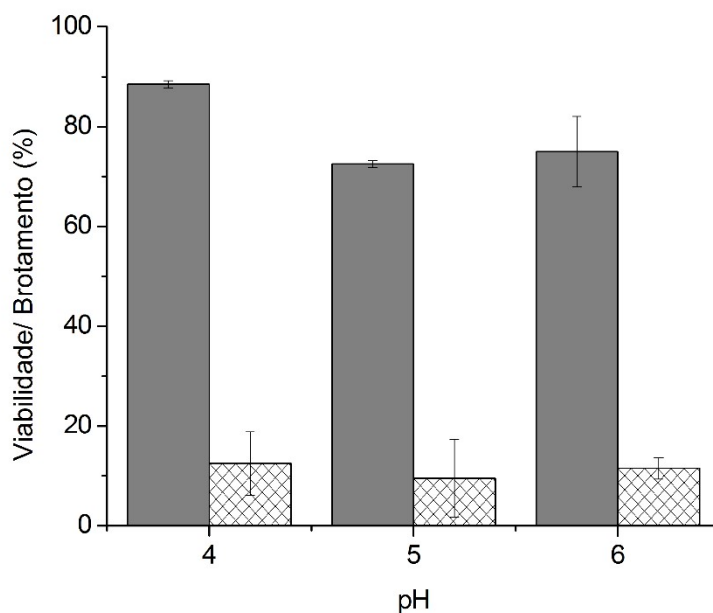
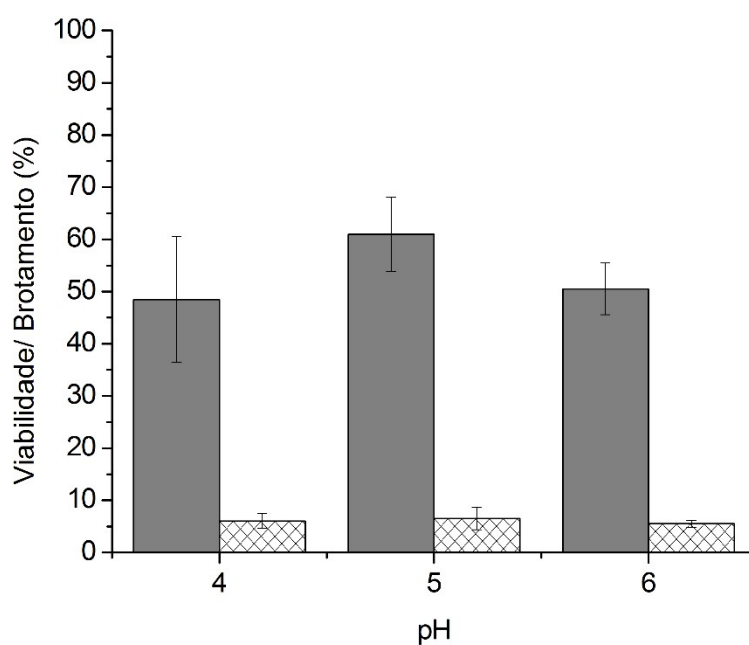


Figura 18: Taxa de viabilidade e brotamento em fermentação alcoólica de *Aureobasidium pullulans* LB3.1, durante 96 h, aplicando diferentes temperaturas e pH.

A)



B)



Taxa de viabilidade (■) e brotamento (▨)

Obs.: na fermentação a 40°C as leveduras estavam todas inviáveis em 24 h de fermentação.

Outros trabalhos realizados com *Candida shehatae* e *Aureobasidium pullulans* com relação à variação de pH na produção de etanol, conseguiram sua melhor produção de etanol em pH 4,5. Madi, McNeil e Harvey (1996), realizaram fermentação com *A. pullulans* utilizando 30 g.L⁻¹ de sacarose em meio basal, a 28°C e atingiram produção de 8 g.L⁻¹ de etanol e rendimento de 0,26 g/g. Enquanto Sánchez e colaboradores (1997) realizaram fermentação com *C. shehatae* utilizando 30 g.L⁻¹ de xilose em meio contendo sais, extrato de levedura e peptona a 30°C, atingindo rendimento de 0,41 g/g.

A queda no consumo de açúcar pelas cepas em alta temperatura pode ser devido à regulação de componentes celulares diante de um estresse térmico. Para lidar com o estresse, as células induzem as proteínas de transporte de hexoses e de choque térmico em conjunto com os genes de proteínas ubiquitina-dependentes para proteger proteínas e funções celulares contra os efeitos nocivos do calor, além disso, proteínas ribossomais podem ser infra-reguladas para fins de economia de energia (ISMAIL et al., 2013).

3.3.3. Efeito da concentração de nutrientes

Foram realizados testes em combinações de ureia em concentrações de 0,0, 0,3 e 1,0 g.L⁻¹, de extrato de levedura em concentrações de 5 e 10 g.L⁻¹ e de xilose em concentrações de 50, 100 e 150 g.L⁻¹. Para cada concentração de ureia (0,0, 0,3 e 1,0 g.L⁻¹) foram utilizados os tratamentos apresentados na **Tabela 7**.

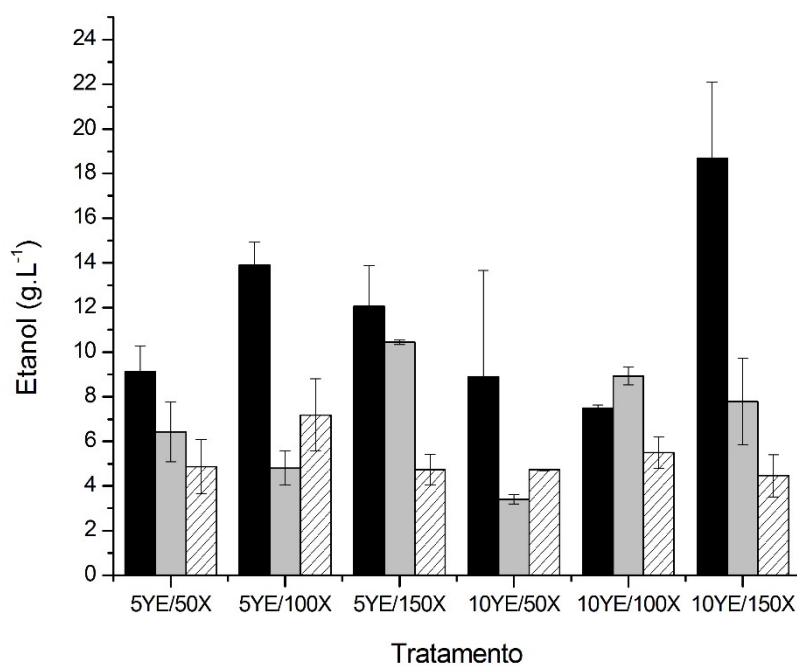
Tabela 7: Tratamentos adicionados ao meio basal utilizados para avaliação do efeito de nutrientes na produção de etanol.

Tratamento	Composição
5YE/50X	5 g.L ⁻¹ de extrato de levedura e 50 g.L ⁻¹ de xilose
5YE/100X	5 g.L ⁻¹ de extrato de levedura e 100 g.L ⁻¹ de xilose
5YE/150X	5 g.L ⁻¹ de extrato de levedura e 150 g.L ⁻¹ de xilose
10YE/50X	10 g.L ⁻¹ de extrato de levedura e 50 g.L ⁻¹ de xilose
10YE/100X	10 g.L ⁻¹ de extrato de levedura e 100 g.L ⁻¹ de xilose
10YE/150X	10 g.L ⁻¹ de extrato de levedura e 150 g.L ⁻¹ de xilose

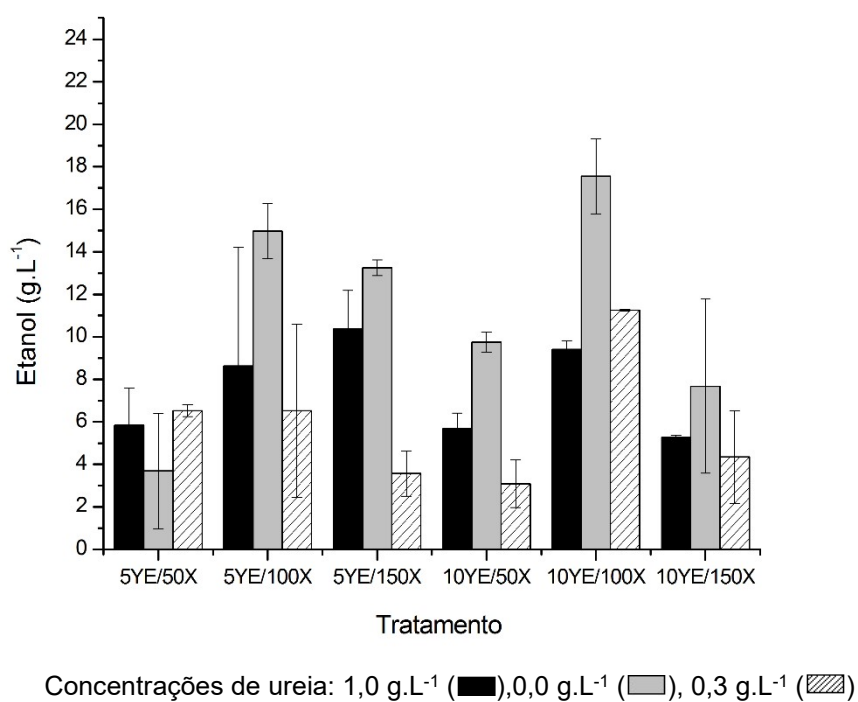
Para a cepa *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP, em quase todos os tratamentos, a melhor produção de etanol ocorreu com 1 g.L⁻¹ de ureia, com exceção do tratamento 10YE/100X (**Figura 19a**). Por outro lado, para *A. pullulans* LB3.1 (**Figura 19b**), a ausência de ureia favoreceu a produção de etanol, com exceção do tratamento 5YE/50X.

Figura 19: Produção de etanol em 96 h de cultivo das cepas *Candida shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP (A) e *Aureobasidium pullulans* LB3.1 (B) a partir de diferentes concentrações de ureia, extrato de levedura e xilose.

A)



B)



A melhor produção de etanol por *C. shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP foi em meio com 1 g.L⁻¹ de ureia, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 150 g.L⁻¹ de xilose, alcançando uma concentração de 18,7 g.L⁻¹ de etanol, com rendimento de 0,14 g/g (**Tabela 8**), o que corresponde a 27% do rendimento teórico, e uma produtividade volumétrica de 0,19 g.L⁻¹.h⁻¹.

A mesma cepa apresentou um consumo da xilose durante as fermentações, entre 80 e 99% do açúcar presente no meio, sendo que na maior parte consumiu acima de 87% do açúcar. A produção de biomassa celular variou entre 4 e 12 g.L⁻¹.

A suplementação com 0,3 g.L⁻¹ de ureia pode ter favorecido o crescimento celular da cepa, enquanto que com 1 g.L⁻¹ de ureia os rendimentos de etanol foram maiores, ainda que baixos quando comparados com as fermentações anteriores.

Tabela 8: Avaliação da viabilidade, taxa de brotamento, massa celular, consumo de xilose e rendimento de produção de etanol sob diferentes condições nutricionais durante fermentação alcoólica de 96 h da cepa *Candida shehatae* var. *shehatae* PT1-1BASP.

Ureia (g.L ⁻¹)	Tratamento**	Viabilidade (%)	Brotamento (%)	Massa celular (g.L ⁻¹)	Consumo xilose (%)	Y _{e/s} * (g/g)
0	5YE/50X	86	15	6,6	99,4	0,13
0	5YE/100X	29	6	7,5	87,3	0,06
0	5YE/150X	90	15	6,9	84,3	0,08
0	10YE/50X	65	12	6,7	99,7	0,07
0	10YE/100X	94	18	3,8	92,1	0,10
0	10YE/150X	60	14	5,4	83,5	0,06
0,3	5YE/50X	81	17	9,1	99,3	0,10
0,3	5YE/100X	65	16	9,0	90,7	0,08
0,3	5YE/150X	23	9	9,5	81,0	0,04
0,3	10YE/50X	70	13	10,4	99,3	0,10
0,3	10YE/100X	73	12	9,9	87,3	0,06
0,3	10YE/150X	84	18	11,9	80,2	0,04
1	5YE/50X	83	17	8,5	99,9	0,18
1	5YE/100X	80	18	8,9	98,0	0,14
1	5YE/150X	0	0	7,9	87,5	0,09
1	10YE/50X	39	8	7,9	99,7	0,18
1	10YE/100X	0	0	7,9	88,5	0,08
1	10YE/150X	75	16	10,6	88,3	0,14

* Rendimento de etanol: gramas de xilose consumida por grama de substrato; ** composição em Tabela 5

A cepa *A. pullulans* LB3.1, apresentou a melhor produção de etanol com ausência de ureia, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 100 g.L⁻¹ de xilose, obtendo 17,5 g.L⁻¹ de etanol, com rendimento de 0,18 g/g (**Tabela 9**), o que corresponde a 35 % do rendimento teórico, e produtividade volumétrica de 0,18 g.L⁻¹.h⁻¹.

O consumo de xilose desta cepa foi entre 76 e 100% do açúcar, sendo a maior parte acima de 90%. Com alto consumo de açúcar a cepa também apresentou alta massa celular, variando entre 8,8 e 16,3 g.L⁻¹. Aparentemente, a ausência de ureia proporcionou maior taxa de brotamento e, conseqüentemente, maior crescimento celular, além disso, a viabilidade da cepa também se apresentou maior na ausência de ureia.

A **Figura 20** mostra os cromatogramas da maior quantificação de etanol de cada cepa, ou seja, em meio contendo 1 g.L⁻¹ de ureia, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 150 g.L⁻¹ de xilose para *C. shehatae* e de em meio contendo ausência de ureia, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 100 g.L⁻¹ de xilose para *A. pullulans*.

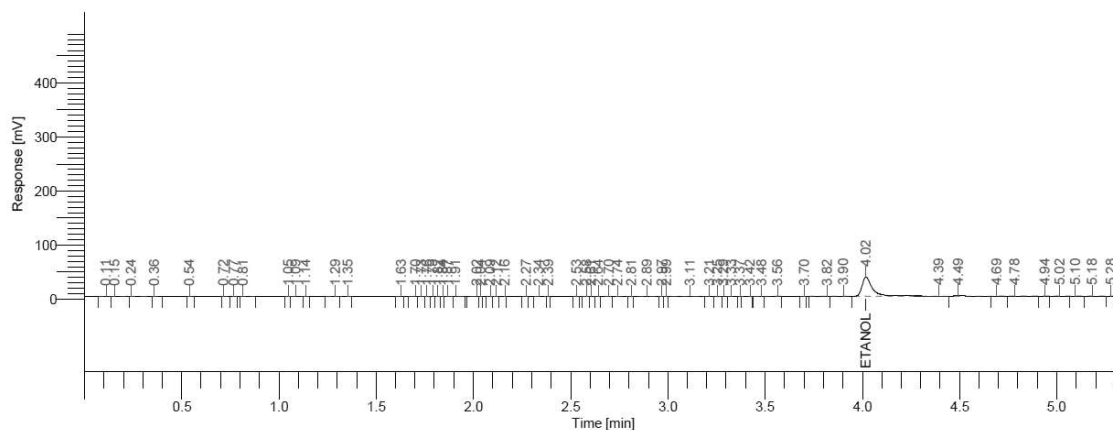
Tabela 9: Avaliação da viabilidade, taxa de brotamento, massa celular, consumo de xilose e rendimento de produção de etanol sob diferentes condições nutricionais durante fermentação alcoólica de 96 h da cepa *Aureobasidium pullulans* LB3.1.

Ureia (g.L ⁻¹)	Tratamento**	Viabilidade (%)	Brotamento (%)	Massa celular (g.L ⁻¹)	Consumo xilose (%)	Y _{e/s} * (g/g)
0	5YE/50X	89,5	20,5	14,45	98,7	0,07
0	5YE/100X	74,5	17,5	14,85	96,4	0,16
0	5YE/150X	79	6,5	12,95	85,1	0,10
0	10YE/50X	90	12,5	11	100,0	0,20
0	10YE/100X	79,5	14	16,3	99,9	0,18
0	10YE/150X	39	4,5	8,9	79,4	0,06
0,3	5YE/50X	69	4	9,3	98,7	0,13
0,3	5YE/100X	55,5	4	12,7	99,3	0,07
0,3	5YE/150X	55	5,5	12,75	79,4	0,03
0,3	10YE/50X	41	9,5	8,9	98,6	0,06
0,3	10YE/100X	69	7,5	16,05	99,5	0,11
0,3	10YE/150X	28	1,5	9,55	76,2	0,04
1	5YE/50X	31,5	1,5	10,7	99,8	0,12
1	5YE/100X	33,5	2	10,05	90,0	0,10
1	5YE/150X	44	0	9	97,6	0,07
1	10YE/50X	24,5	0,5	10,95	99,0	0,11
1	10YE/100X	40,5	3	8,8	99,1	0,09
1	10YE/150X	16,5	0	9,45	97,1	0,04

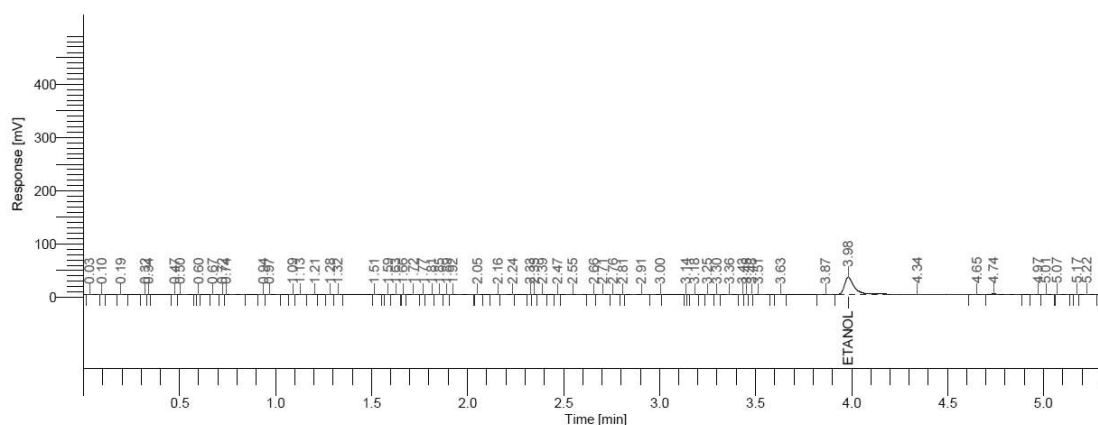
* Rendimento de etanol: gramas de xilose consumida por grama de substrato; **composição em Tabela 5

Figura 20: Cromatogramas da quantificação de etanol produzido durante fermentação alcoólica. A) Produção por cepa de *C. shehatae* em meio contendo 1 g.L⁻¹ de ureia, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 150 g.L⁻¹ de xilose. B) Produção por cepa de *A. pullulans* em meio contendo ausência de ureia, 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 100 g.L⁻¹ de xilose.

A)



B)



4. CONCLUSÕES

Comparando esta fermentação com a primeira (Capítulo 2), *C. shehatae* aumentou o consumo do açúcar, enquanto antes teve um consumo de 0,91 g.L⁻¹.h⁻¹, nesta ultima fermentação consumiu 1,37 g.L⁻¹.h⁻¹, porém manteve sua característica de não aumentar a massa celular. Contudo, apesar do aumento da produção de etanol, o rendimento de etanol diminuiu de 0,27 g.g⁻¹ para 0,14 g.g⁻¹, talvez haja consumo de etanol ou produção de xilitol ou outro metabólito a partir da xilose. Já a cepa de *A. pullulans* aumentou o

consumo de açúcar de 0,92 g.L⁻¹.h⁻¹ para 1,04 g.L⁻¹.h⁻¹, aumentou o rendimento de etanol de 0,16 g.g⁻¹ para 0,18 g.g⁻¹ e diminuiu a produção de massa celular de 0,39 g.L⁻¹.h⁻¹ para 0,14 g.L⁻¹.h⁻¹.

Ambas as cepas mostraram resultados interessantes com a otimização dos parâmetros fermentativos, entretanto, o oxigênio é um fator de extrema importância na fermentação de xilose e não foi abordado neste trabalho. Com a boa assimilação de xilose que as cepas têm mostrado é interessante que o oxigênio também seja avaliado, no caso da cepa de *C. shehatae* pode ser benéfico, principalmente se estiver ocorrendo acúmulo de xilitol.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOGBO, F.; COWARD-KELLY, G. TORRY-SMITH, M.; WENGER, K., The effect of initial cell concentration on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 137, p. 653-662, 2007.

ASK, M.; BETTIGA, M.; MAPELLI, V.; OLSSON, L. The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 22-34, 2013.

BELLIDO, C.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 51–58, 2013.

CAO, N. J.; TANG, R.; GONG, C. S.; CHEN, L. F. The effect of cell density on the production of xylitol from D-xylose by yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 46, p. 515–519, 1994.

CAROLAN, G.; CATLEY, B. J.; KELLY, P. J. Ethanol production during the growth cycle of *Aureobasidium pullulans*. **Biochemical Society Transactions**, v. 4, p. 1021–1022, 1976.

CASTAÑÓN-RODRÍGUEZ, J. F.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, J. M.; ORTÍZ-MUÑIZ, B.; et al. Continuous multi-step versus fed-batch production of ethanol and xylitol in a simulated medium of sugarcane bagasse hydrolyzates. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, p. 96–107, 2014.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias**. São Carlos: EdUFSCAR, 105 p., 2010.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 220–225, 1996.

- DEMEKE, M. M.; DIETZ, H.; LI, Y.; et al. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 89-112, 2013.
- DU PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 944–956, 1994.
- DU PREEZ, J. C.; VAN DER WALT, J. P. Fermentation of D-Xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 362, p. 357–362, 1983.
- ENDO, A.; NAKAMURA, T.; ANDO, A.; TOKUYASU, K.; SHIMA, J. Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, p. 3-8, 2008.
- FAN, C.; QI, K.; XIA, X.-X.; ZHONG, J.-J. Efficient ethanol production from corncob residues by repeated fermentation of an adapted yeast. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 309–315, 2013.
- FARIAS, D.; ANDRADE, R. R. DE; MAUGERI-FILHO, F. Kinetic Modeling of Ethanol Production by *Scheffersomyces stipitis* from Xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 361-379, 2013.
- FINKELSTEIN, M.; DAVISON, B. H. Biotechnology for Fuels and Chemicals: Proceedings of Nineteenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4-8, 1997, at Colorado Springs, Colorado. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. WALT, R. D. (Editor Executivo). Springer Science & Business Media, v. 70-72, 1015 p. 2012.
- GHAREIB, M.; YOUSSEF, K. A.; KHALIL, A. A. Ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and its relationship to lipid content and composition. **Folia Microbiologica**. v.33, p. 447-452, 1988.
- HANLY, T. J.; HENSON, M. A. Dynamic metabolic modeling of a microaerobic yeast co-culture: predicting and optimizing ethanol production from glucose/xylose mixtures. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 44-59, 2013.
- HASUNUMA, T.; ISMAIL, K. S. K.; NAMBU, Y.; KONDO, A. Co-expression of TAL1 and ADH1 in recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysates in the presence of furfural. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, p. 165–169, 2014.
- ISHII, J.; YOSHIMURA, K.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Reduction of furan derivatives by overexpressing NADH-dependent Adh1 improves ethanol fermentation using xylose as sole carbon source with *Saccharomyces cerevisiae* harboring XR-XDH pathway. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 2597–2607, 2013.
- ISMAIL, K. S. K.; SAKAMOTO, T.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Time-based comparative

transcriptomics in engineered xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* identifies temperature-responsive genes during ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 40, p. 1039–1050, 2013.

JENSEN, S. L.; UMIKER, N. L.; ARNEBORG, N.; EDWARDS, C. G. Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa*, and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines. **Food Microbiology**, v 26, p. 915-921, 2009.

JOLLY, N.P.; AUGUSTYN, O.P.H.; PRETORIUS, I.S. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v. 27, p. 15–39, 2006.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 10–26, 2004.

LERTWATTANASAKUL, N.; SUPRAYOGI; MURATA, M.; et al. Essentiality of respiratory activity for pentose utilization in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 933–945, 2013.

LIANG, M.; KIM, M. H.; HE, Q. P.; WANG, J. Impact of pseudo-continuous fermentation on the ethanol tolerance of *Scheffersomyces stipitis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, p. 319–326, 2013.

LULU, L.; LING, Z.; DONGMEI, W.; et al. Identification of a xylitol dehydrogenase gene from *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. **Molecular Biotechnology**, v. 53, p. 159–69, 2013.

MADI, N. S.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Influence of Culture pH and Aeration on Ethanol Production and Pullulan Molecular Weight by *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 343–350, 1996.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 103–121, 1983.

MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S. Characterization of a Recombinant Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* Strain that Co-ferments Glucose and Xylose : I . Influence of the Ratio of Glucose / Xylose on Ethanol Production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 169, p. 712–721, 2013.

MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S. Effect of initial cell concentration on ethanol production by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* with xylose-fermenting ability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 1952-1960, 2010.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1959.

- MORENO, A. D.; IBARRA, D.; BALLESTEROS, I.; FERNÁNDEZ, J. L.; BALLESTEROS, M. Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*—Effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings. **Biochemical Engineering Journal**, v. 79, p. 94–103, 2013.
- MORENO, A. D.; TOMÁS-PEJÓ, E.; IBARRA, D.; BALLESTEROS, M.; OLSSON, L. In situ laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 337–343, 2013.
- NISHIKAWA, N. K.; SUTCLIFFE, R.; SADDLER, J. N. The influence of lignin degradation products on xylose fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 549–552, 1988.
- OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 312–331, 1996.
- PALNITKAR, S.; LACHKE, A. Effect of nitrogen sources on oxidoreductive enzymes and ethanol production during D -xylose fermentation by *Candida shehatae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 258–260, 1992.
- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: Effect of the initial cell concentration. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 593–598, 1996.
- ROBERTO, I. C.; SATO, S.; MANCILHA, I. M. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *C. guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, p. 348–350, 1996.
- SAMPAIO, F. C.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. J. V.; MORAES, C. A.; CONVERTI, A.; PASSOS, F. M. L. Bioconversion of D-xylose to xylitol by *Debaryomyces hansenii* UFV-170: Product formation versus growth. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3600–3606, 2005.
- SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V.; CASTRO, E.; MOYA, A. J.; CAMACHO, F. The influence of pH and aeration rate on the fermentation of D-xylose by *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 355–360, 1997.
- SATO, T. K.; LIU, T.; PARREIRAS, L. S.; et al. Harnessing Genetic Diversity in *Saccharomyces cerevisiae* for Improved Fermentation of Xylose in Hydrolysates of Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreated Biomass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 540–554, 2014.
- SCHÜLLER, H.-J. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 43, p. 139–160, 2003.
- SEHNEM, N. T.; MACHADO, A. D. S.; LEITE, F. C. B.; et al. 5-Hydroxymethylfurfural induces ADH7 and ARI1 expression in tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain P6H9 during bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 190–6, 2013.

SILVA, J. P. A; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1306–1315, 2010.

SLININGER, P. J.; THOMPSON, S. R.; WEBER, S.; LIU, Z. L. Repression of xylose-specific enzymes by ethanol in *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* and utility of repitching xylose-grown populations to eliminate diauxic lag. **Biotechnology Bioengineering**. v. 108, p.1801–1815, 2011.

TAKAHASHI, S.; TANIFUJI, K.; SHIELL, K.; et al. Removal of Acetic Acid from Spent Sulfite Liquor Using Anion Exchange Resin for Effective Xylose Fermentation with *Pichia stipitis*. **Bioresources**, v. 8, p. 2417–2428, 2013.

TRAN, A. V.; CHAMBERS, R. P. Red Oak Wood Derived Inhibitors in the Ethanol Fermentation of Xylose by *Pichia stipitis* CBS 5776. **Biotechnology Letters**, v. 7, p. 841–845, 1985.

UNREAN, P.; NGUYEN, N. H. A. Optimized fed-batch fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 1895–1909, 2013.

ZHA, J.; SHEN, M.; HU, M.; SONG, H.; YUAN, Y. Enhanced expression of genes involved in initial xylose metabolism and the oxidative pentose phosphate pathway in the improved xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p. 27–39, 2014.

ZUO, Q.; ZHAO, X.; XIONG, L.; et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Fine-tuning of xylose metabolism in genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* by scattered integration of xylose assimilation genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 440, p. 241–244, 2013.

CAPÍTULO 4

**INFLUÊNCIA DE COMPONENTES DO MEIO NA
TOLERÂNCIA A SO₂ E NA FISIOLOGIA DA CEPA
Brettanomyces bruxelensis ISA 2211**

RESUMO

A espécie *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* é a principal levedura contaminante de vinho, além de ser relatada também como contaminante do processo de produção de etanol combustível. Na tentativa de encontrar formas de controle populacional alternativas ao SO₂, foram realizados estudos da influência de componentes do meio, com e sem presença de SO₂, no desenvolvimento populacional e viabilidade da cepa *B. bruxellensis* ISA 2211. A cepa foi submetida a cultivos na presença e ausência de compostos como vitaminas, extrato de levedura, etanol, ácidos hidroxicinâmicos e SO₂ em diferentes combinações. Além disso, foi testada a capacidade da estirpe em utilizar o ácido p-cumárico como fonte de carbono. A levedura mostrou-se suscetível aos fatores ambientais. A utilização de vitaminas e extrato de levedura ajudaram na resistência ao SO₂, enquanto o etanol apresentou uma associação negativa com o dióxido de enxofre, aumentando a inibição do crescimento. Contudo, em alguns experimentos, houve recuperação do desenvolvimento populacional, verificou-se que a taxa de brotamento aumenta durante o restabelecimento da população, porém não foi verificado se o motivo dessa retomada de crescimento foi por células adaptadas que se desenvolveram ou se as células tolerantes conseguiram se desenvolver pela diminuição da condição de estresse, ou seja, a concentração de SO₂. A cepa foi capaz de assimilar o ácido p-cumárico e o desenvolvimento populacional também foi dependente da concentração do composto no meio, a partir de 5 mmol.L⁻¹ do ácido houve inibição do crescimento.

Palavras-chave: *Dekkera bruxellensis*, dióxido de enxofre, ácido p-cumárico, leveduras contaminantes de vinho.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* é a principal levedura contaminante de vinhos, é responsável pela produção de sabores desagradáveis e aromas rançosos no vinho, descritos como: “suor de cavalo”, “estábulo” ou “plástico queimado” (OELOFSE et al., 2008). A produção desses aromas é realizada por meio da ação de duas enzimas que atuam utilizando os ácidos hidroxicinâmicos (p-cumárico, ferrúlico ou caféico) como substrato. Inicialmente a enzima hidroxicinamato descarboxilase transforma os ácidos hidroxicinâmicos em hidroxiestirenos, ou vinilfenóis, que serão reduzidos a derivados etil pela enzima vinilfenol redutase produzindo assim os etilfenóis. No caso do ácido p-cumárico, a hidroxicinamato descarboxilase o descaboxiliza a 4-vinilfenol, que em seguida é reduzido a 4-etilfenol por ação da enzima vinilfenol redutase (BENITO et al., 2009).

Tratamentos químicos, físicos e térmicos podem ser utilizados para combater essas leveduras deteriorantes. O dióxido de enxofre é o conservante químico mais comum, porém hoje em dia há uma tendência de reduzir seus níveis em vinhos. Pessoas portadoras de enxaqueca relatam o agravamento da crise após tomar vinhos, que pode ser causada por este conservante. Contudo, não há conclusões definitivas sobre esse elemento ser o causador das dores. Algumas estratégias visam a manutenção de níveis baixos constantes das populações de *D. bruxellensis*, uma vez que quantidades pequenas de etilfenóis podem ter resultados positivos na qualidade do vinho (BARATA et al., 2008a).

Na busca por alternativas ao SO₂, a susceptibilidade de *Brettanomyces* a fatores ambientais foi abordada em alguns estudos. Dias e colaboradores (2003) caracterizaram o efeito de uma variedade de fatores sobre a produção de 4-etilfenóis por *D. bruxellensis*, em meio sintético e sucos de uva, determinando a produção de fenóis voláteis em condições enológicas, como a influência da fonte de carbono e o teor de etanol. Já Chandra e colaboradores (2014) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para explicar como o padrão de crescimento de *D. bruxellensis* e a produção de 4-etilfenol foram afetados por dióxido de enxofre, etanol e glicose. Nenhuma interação entre glicose e dióxido de enxofre ou etanol foi observada no crescimento. No entanto, foi notada uma interação negativa do dióxido de enxofre com etanol na produção de 4-etilfenol.

Além disso, demonstraram que os baixos níveis de glicose, utilizados em vinhos tintos, para dar um paladar mais suave, nem sempre aumentam a susceptibilidade à deterioração do vinho. Por outro lado, Barata e colaboradores (2008b) demonstraram que *D. bruxellensis* não é mais resistente do que *S. cerevisiae* para os principais inibidores, como o etanol e dióxido de enxofre e sugeriram que os mecanismos subjacentes à capacidade de sobreviver em ambiente pobre em nutrientes são a chave para explicar a sua proliferação, quando o ambiente se torna menos estressante.

D. bruxellensis também é relatada como contaminante do processo de produção de etanol combustível e, nos últimos anos, o número de estudos sobre a fisiologia dessa espécie tem aumentado. O interesse pela espécie aumentou devido ao seu papel importante tanto como contaminante quanto como levedura potencial para uso na produção de etanol a partir da cana ou hidrolisado de lignocelulose, principalmente por sua notável capacidade de se adaptar ao ambiente industrial (BLOMQVIST et al, 2010; PEREIRA et al, 2012, LEITE et al., 2012).

Assim, o conhecimento dos aspectos fisiológicos dessas leveduras deteriorantes é interessante para os mais diversos segmentos industriais que envolvem o emprego de fermentação alcoólica, seja na produção de bebidas e alimentos ou na produção de etanol combustível, por se tratar de uma levedura de grande importância e com grande habilidade de se adaptar ao ambiente industrial. Assim, este capítulo aborda estudos da fisiologia e crescimento da cepa *Brettanomyces bruxellensis* ISA 2211 na variação de fatores nutricionais, etanol e SO₂, visando evitar o crescimento populacional e a produção de etilfenóis para prevenir a deterioração de vinhos. Esses experimentos foram realizados durante estágio no laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa sob orientação do Prof. Dr. Manuel Malfeito-Ferreira.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1. Origem e manutenção da cepa

A cepa *B. bruxellensis* ISA 2211 foi isolada de vinho tinto contaminado em trabalhos anteriores do laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa (BARATA et al., 2008). A estirpe foi

mantida em meio GYP sólido (20 g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de peptona, 20 g.L⁻¹ de agar, pH 6,0) a 4 °C.

2.1.2. Influência de nutrientes na tolerância a SO₂

Para avaliar a influência de fatores nutricionais na resistência a SO₂ a cepa foi pré-cultivada por 48 h em meio GYP, a 25 °C, 120 rpm, atingindo população de 10⁷ células/mL. Após centrifugação a 3200 rpm, por 10 min., a cepa foi inoculada a 10⁵ células.mL⁻¹ em meio basal SWM ("Sintetic Wine Media", composição abaixo) na ausência e presença de 30 mg.L⁻¹ de K₂S₂O₅ (para adição de SO₂ ao meio); meio basal SWM adicionado de 1 g.L⁻¹ de extrato de levedura na ausência e presença de 30 mg.L⁻¹ de K₂S₂O₅; meio basal SWM adicionado de 0,5 mL.L⁻¹ de solução de vitaminas (composição abaixo) na ausência e presença de 30 mg.L⁻¹ de K₂S₂O₅. A fermentação foi realizada a 25 °C e sem agitação. Amostras foram retiradas periodicamente para contagem de células viáveis.

O meio basal SWM foi composto por glicose (1,5 g.L⁻¹); frutose (1,5 g.L⁻¹); D-L ácido málico (3 g.L⁻¹); ácido acético (0,01%); sulfato de potássio (0,1 g.L⁻¹); Sulfato de magnésio (0,025 g.L⁻¹); sulfato de amônio (2 g.L⁻¹); etanol (10%); ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido caféico (10 mg/L cada, dissolvidos anteriormente no etanol), pH 3,5 e esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm. A solução de vitaminas foi composta por biotina (0,01 g.L⁻¹); pantotenato de cálcio (0,8 g.L⁻¹); inositol (40 g.L⁻¹); niacina (1,6 g.L⁻¹); piridoxina (HCl) (1,6 g.L⁻¹); tiamina (1,6 g.L⁻¹), esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm e estocado a 4 °C.

2.1.3. Avaliação da inibição do crescimento e produção de fenóis voláteis sob diferentes concentrações de SO₂

Inicialmente foram preparados 25 mL de pré-inóculo em meio SWM adicionado de 1g.L⁻¹ de extrato de levedura até atingir 10⁷⁻⁸ cels.mL⁻¹ para inocular 1L (2 frascos de 500 mL) do mesmo meio. Foi incubado por 3 dias a 25 °C sem agitação (população de 10⁶ células.mL⁻¹). O meio foi dividido em 8 Erlenmeyers de 100 mL, dos quais cada dois continham concentrações de de K₂S₂O₅ de 0, 25, 50 e 75 mg.L⁻¹ e o restante do meio foi utilizado para análises relativas ao tempo inicial do experimento.

Os frascos foram tampados com rolhas de borracha com uma agulha de seringa inserida, para permitir trocas gasosas, foram incubados a 25 °C, sem agitação. Periodicamente, cada cultivo de diferente concentração de K₂S₂O₅ foi avaliada com relação à densidade ótica, contagem de células em Câmara de Neubauer e contagem de UFC (unidades formadoras de colônias) em placas com meio GYP sólido. Amostras em 0, 120 e 288 h foram avaliadas quanto a produção de fenóis voláteis.

2.1.4. Influência da presença de ácidos hidroxicinâmicos e etanol na tolerância a SO₂

Para verificar a influência dos ácidos hidroxicinâmicos e etanol na resistência a SO₂ realizou-se fermentações em meio YNB com glicose (2 g.L⁻¹) e pH 3,5 contendo variações desses compostos, **Tabela 10**. Os HCAs utilizados foram ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido caféico, sendo aplicado 10 mg/L de cada e dissolvidos no etanol anteriormente à adição ao meio. A princípio foi feito pré- inóculo no mesmo meio de forma a iniciar o experimento com 10⁵ células.mL⁻¹. A fermentação foi realizada a 25 °C, sem agitação e foram feitas amostragens para contagem de células em Câmara de Neubauer e contagem de UFC em placas com meio GYP sólido.

Tabela 10: Variação de etanol, ácidos hidroxicinâmicos e K₂S₂O₅ aplicados na fermentação em meio YNB com glicose a 2 g.L⁻¹ e pH 3,5.

Tratamentos	Etanol (%)	HCA (mg.L ⁻¹)	K ₂ S ₂ O ₅ (mg.L ⁻¹)
Controle	0	0	0
Somente SO ₂	0	0	50
Etanol e SO ₂	10	0	50
Etanol, HCAs e SO ₂	10	10	50
Etanol e HCAs	10	10	0

2.1.5. Capacidade de recuperação da viabilidade na presença de SO₂

Alguns experimentos mostraram que a cepa *B. bruxellensis* ISA 2211 foi capaz de recuperar o crescimento populacional dias após um diagnóstico de inviabilidade de todas as células, pela coloração com azul de metileno. Para

entender melhor a recuperação da população, uma fermentação foi avaliada com relação à viabilidade e taxa de brotamento.

A fermentação foi realizada utilizando meio K adicionado de 60 mg.L⁻¹ de K₂S₂O₅, a 25 °C, sem agitação. O pré-inóculo foi feito também em meio K, a 25 °C, com agitação de 120 rpm e o inóculo no experimento foi de 10⁵ células. mL⁻¹.

O meio K é composto por CaCl₂.2H₂O (0,15 g/L); (NH₄)₂SO₄ (5 g/L); KH₂PO₄ (5 g/L); MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L); glicose (20 g/L); solução de vitaminas (0,5 mL.L⁻¹) e solução de oligoelementos (0,5 mL.L⁻¹). A solução de vitaminas é composta por biotina (0,01 g.L⁻¹); pantotenato de cálcio (0,8 g.L⁻¹); inositol (40 g.L⁻¹); niacina (1,6 g.L⁻¹); piridoxina (HCl) (1,6 g.L⁻¹) tiamina (1,6 g.L⁻¹). A solução de oligoelementos é composta por ácido bórico (1 g.L⁻¹); iodeto de potássio (0,2 g.L⁻¹); molibdato de sódio (0,4 g.L⁻¹); sulfato de cobre (0,08 g.L⁻¹); Cloreto de Ferro (0,4 g.L⁻¹); sulfato de manganês (0,8 g.L⁻¹); sulfato de zinco (0,8 g.L⁻¹); HCl (20 mL.L⁻¹).

2.1.6. Capacidade de assimilação de ácido p-cumárico

Para avaliar a capacidade da cepa em utilizar o ácido p-cumárico como fonte de carbono foi realizado cultivo utilizando-se meio YNB e variações de glicose e ácido p-cumárico (**Tabela 11**), pH 3,5, sem agitação, a 25°C. O pré inóculo foi feito com meio YNB e glicose a 2 g.L⁻¹, centrifugado, re-suspendido no meio do experimento e inoculado em concentração de 10⁵ células.mL⁻¹.

Tabela 11: Tratamentos utilizados para avaliação da capacidade de assimilação de ácido p-cumárico

Tratamentos	Ácido p-cumárico (mmol.L ⁻¹)	Glicose (g.L ⁻¹)
YNB	0,0	0,0
YG	0,0	2,0
Y01A	0,1	0,0
YG01A	0,1	2,0
Y1A	1,0	0,0
YG1A	1,0	2,0

2.1.7. Utilização de ácido p-cumárico como fonte de carbono em variadas concentrações.

Após a constatação da capacidade da cepa em utilizar o ácido p-cumárico como fonte de carbono, foi avaliado a influência da concentração desse ácido na assimilação do mesmo. Foi utilizado meio K, com excessão da glicose (composição descrita no item 3.1.5). Como fonte de carbono utilizou-se a comparação entre Glicose (2 g.L⁻¹) e ácido p-cumárico em concentrações de 1, 2, 5 e 10 mmol.L⁻¹. Foi necessário adicionar etanol a 1,5 % uma vez que maiores quantidades do ácido precisaram ser dissolvidas em etanol antes de adicionar ao meio, assim padronizou-se 1,5% de etanol e essa quantidade foi adicionada em todos os tratamentos. Todos os tratamentos tiveram o pH ajustado a 3,5.

O pré inóculo foi feito com meio YNB e glicose a 2 g.L⁻¹, centrifugado, re-suspendido no meio do experimento e inoculado em concentração de 10⁶ células.mL⁻¹. A fermentação foi realizada a 25 °C, sem agitação e foram retiradas amostras periódicas para quantificação da densidade óptica a 640 nm, contagem em câmara de Neubauer e contagem de UFC em placas com meio GYP sólido.

2.1.8. Métodos analíticos

A quantificação de 4-etilfenol, 4-vinilfenol e 4-etilguaiacol foi feita por cromatografia gasosa de acordo com metodologia descrita em Chandra e colaboradores (2014).

A contagem em câmara de Neubauer, taxa de brotamento e taxa de viabilidade foi realizada como descrita anteriormente (Capítulo 2, item 2.7) com a diferença da utilização do corante azul de metileno no lugar de eritrosina.

A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foi feita inoculando-se 25 µL da amostra, em diferentes diluições, em placas de Petri com meio GYP sólido. As placas foram incubadas a 25 °C e, ao crescimento das colônias, estas eram contadas na gota com diluição apropriada, ou seja, com colônias diferenciáveis. O cálculo de UFC.mL⁻¹ era realizado de acordo com a fórmula seguinte:

$$\text{UFC.mL}^{-1} = \frac{(\text{N}^{\circ} \text{ de colônias contadas}) \times 1000}{25} \times (\text{fator de diluição})$$

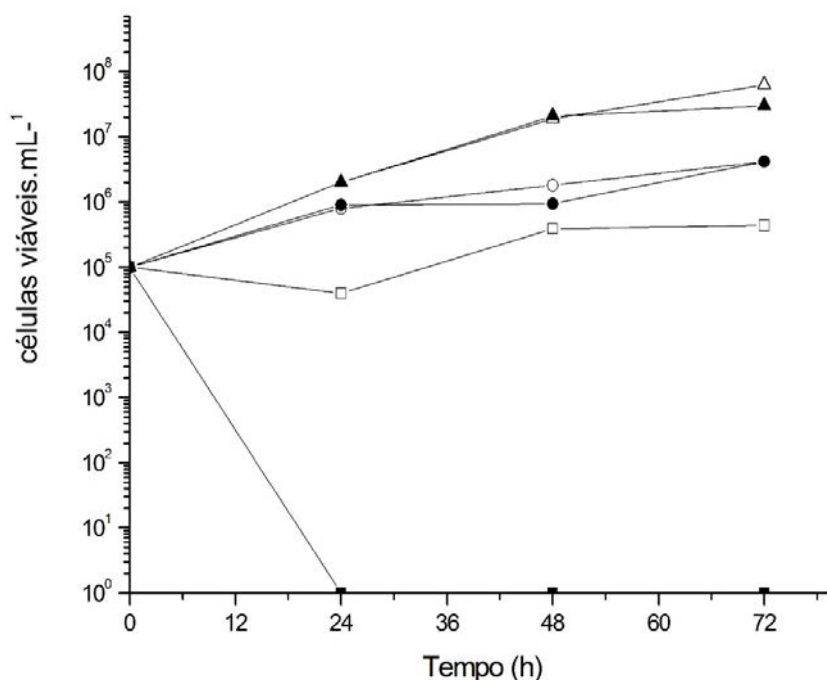
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento da espécie *B. bruxellensis* e sua inibição por SO_2 tem se mostrado dependente de fatores do meio, como a presença de vitaminas, determinadas fontes de carbono incomuns a outras espécies e a presença de outros microrganismos. Os experimentos desse trabalho confirmam algumas dessas influências, além disso, características interessantes de adaptação dessa espécie, como a utilização de fontes alternativas de carbono são relatadas.

3.1.1. Influência de nutrientes na tolerância a SO_2

A **Figura 21** mostra a variação na tolerância da cepa ao SO_2 na presença e ausência de vitaminas e extrato de levedura. Observa-se claramente que a composição do meio influencia na inibição da cepa. Na ausência do extrato de levedura, da solução de vitaminas e dióxido de enxofre a levedura não apresentou crescimento, contudo manteve sua viabilidade, enquanto a adição do inibidor na ausência das vitaminas e extrato de levedura levaram a cepa à morte.

Figura 21: Influência de nutrientes na tolerância a 30 mg.L^{-1} de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$.



Ausência de vitaminas, extrato de levedura e SO_2 (□); Ausência de vitaminas, extrato de levedura e com SO_2 (■); Utilização de extrato de levedura e sem SO_2 (△); Utilização de extrato de levedura e com SO_2 (▲); Utilização de solução de vitaminas e sem SO_2 (○); Utilização de solução de vitaminas e com SO_2 (●).

Na presença do extrato de levedura e da solução de vitaminas a estirpe não apresentou inibição, alcançou o mesmo crescimento na ausência ou presença do inibidor. O crescimento na presença de vitaminas foi um pouco maior do que na ausência destas, de fato essa espécie é descrita como dependente de tiamina para crescer, e as cepas podem sofrer variação quanto à auxotrofia para tiamina, biotina e várias outras vitaminas (CONTERNO et al., 2006; BLOMQVIST, 2011). A utilização do extrato de levedura permitiu o maior crescimento da levedura, o que é natural, uma vez que possui fontes de carbono.

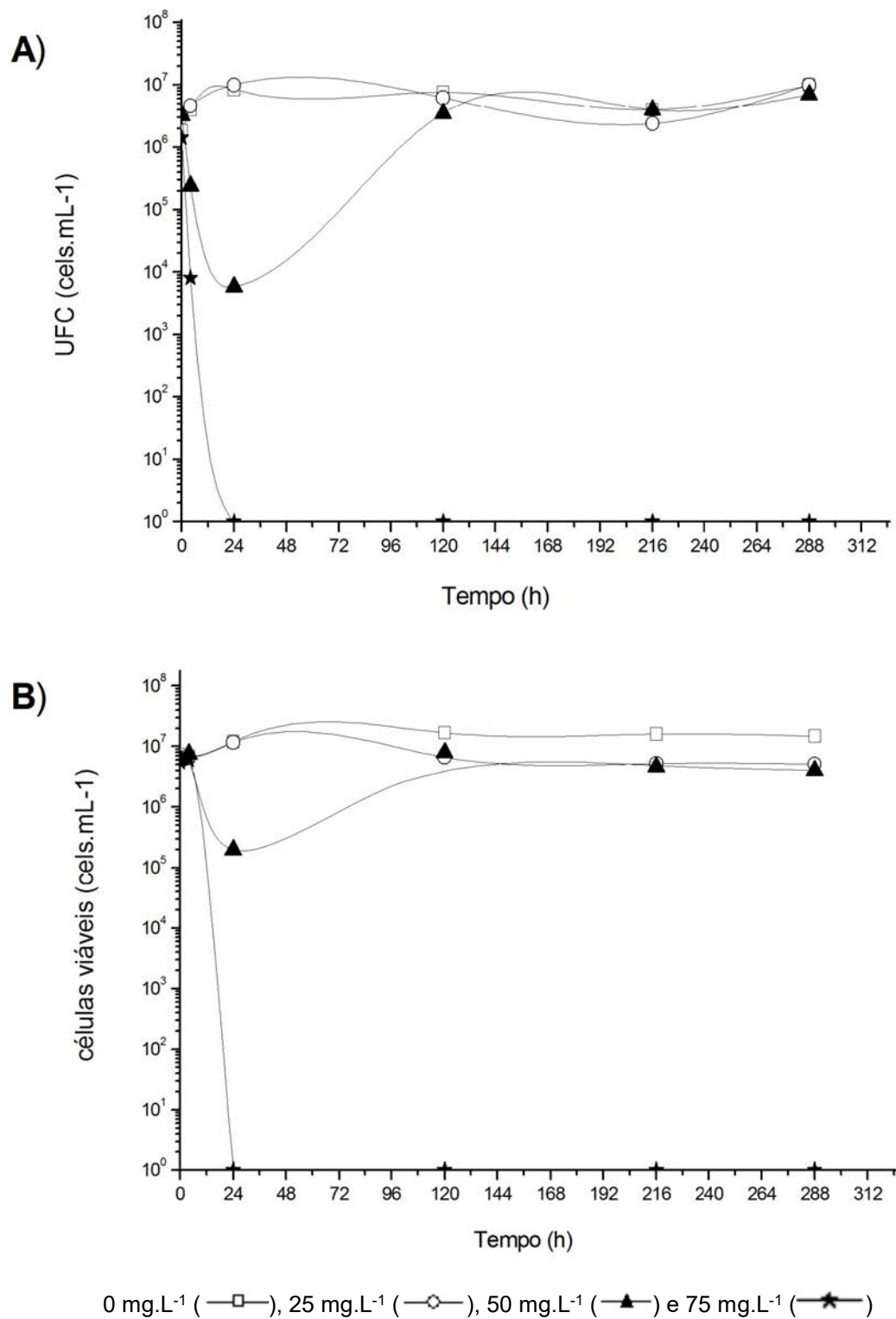
Na ausência de vitaminas e extrato de levedura, uma baixa quantidade de SO₂ foi capaz de inviabilizar a cepa, entretanto a quantidade de SO₂ não foi suficiente para inibição da cepa na presença de meio com maior riqueza em nutrientes, seria necessário a aplicação de quantidades maiores de metabissulfito de potássio para conseguir inibição do crescimento da levedura. A fim de identificar a quantidade capaz de inibir a cepa na presença do extrato de levedura foi realizada fermentação com diferentes concentrações de metabissulfito de potássio, cujos resultados podem ser observados no item a seguir.

1.1.1. Avaliação da inibição do crescimento e produção de fenóis voláteis sob diferentes concentrações de SO₂

Na presença de extrato de levedura, no mesmo meio do experimento anterior, a cepa foi totalmente inibida apenas na concentração de 75 mg.L⁻¹, **Figura 22**. Com 50 mg.L⁻¹ houve uma queda inicial na viabilidade, que foi recuperada posteriormente.

A contagem em câmara de Neubauer e unidades formadoras de colônias apresentaram o mesmo perfil, com uma pequena diferença no ponto de queda em 50 mg.L⁻¹, que pode ser atribuído à característica da espécie em desenvolver o estado de “viável porém não cultivável” na presença de SO₂ (AGNOLUCCI et al., 2010).

Figura 22: Inibição do crescimento segundo variação da concentração de metabissulfito de potássio. A) Contagem de unidade formadora de colônias. B) Contagem de células viáveis em câmara de Neubauer.



A inibição a 75 mg.L⁻¹ de metabissulfito de potássio está em acordo ao que é relatado na literatura relacionada a vinhos. Em termos práticos origina-se 50% do peso do K₂S₂O₅ em SO₂ e a literatura indica inibição de cepas a partir de 30 mg.L⁻¹ de SO₂ em pH relativamente baixo (CONTERNO et al., 2006; SMITH, 2013). É importante lembrar que esse valor de inibição está relacionado ao pH baixo dos vinhos, uma vez que na presença de íons H⁺, ocorre a reação destes com a forma HSO₃⁻, produzindo SO₂ e H₂O, aumentando a concentração da forma SO₂ e, portanto, aumentando o efeito do dióxido de enxofre sobre as leveduras (SMITH, 2013). Dessa forma, a quantidade de SO₂ para inibir meios de cultivo que tenham pH mais alto, como no caso de produção de etanol combustível, deverá ser maior.

A **Tabela 12** apresenta a quantificação de fenóis voláteis produzidos pela cepa a partir dos ácidos hidrocínâmicos. Existe relação clara entre o perfil de produção dos fenóis e a inibição da viabilidade, assim, não houve inibição da produção em 25 mg.L⁻¹ de K₂S₂O₅, quando comparado com o tratamento com ausência de K₂S₂O₅. Com 50 mg.L⁻¹ de K₂S₂O₅ percebe-se uma produção mais lenta, talvez devido à queda de viabilidade inicial, enquanto que com 75 mg.L⁻¹ de K₂S₂O₅ não percebe-se aumento da produção com relação ao tempo inicial.

Vale ressaltar que a quantidade de fenóis encontradas no tempo inicial corresponde à produção realizada durante o cultivo para desenvolvimento populacional antes da adição do metabissulfito de potássio. Neste experimento, o tempo de 0 h corresponde ao momento da adição das diferentes concentrações de K₂S₂O₅ ao meio.

O 4-vinilfenol é o composto intermediário entre a produção de derivados 4-etil a partir dos ácidos hidroxicinâmicos, isso explica a diminuição da sua concentração com o decorrer do tempo de cultivo.

Tabela 12: Quantificação de 4-etilfenol (EP), 4-etilguaiaicol (EG), e 4-vinilfenol (VP) durante fermentação em meio SWM e diferentes concentrações de metabissulfito de potássio.

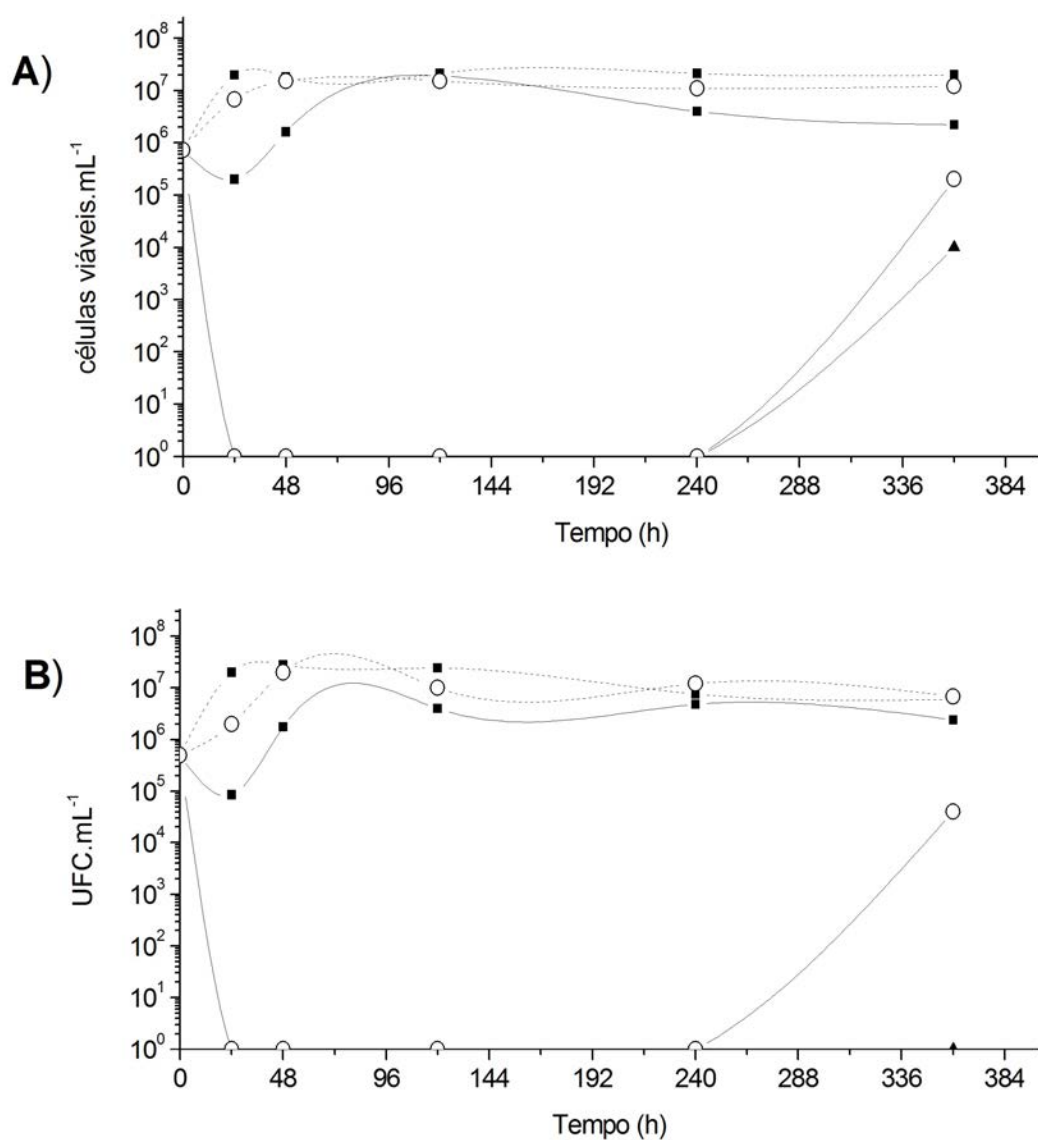
Tempo (h)	0			120			288		
Fenóis voláteis (μ/L)	EP	EG	VP	EP	EG	VP	EP	EG	VP
0 mg.L ⁻¹ de K ₂ S ₂ O ₅	128	510	343	3378	4301	0	3391	4550	0
25 mg.L ⁻¹ de K ₂ S ₂ O ₅	128	510	343	3240	4223	126	3752	4852	0
50 mg.L ⁻¹ de K ₂ S ₂ O ₅	128	510	343	684	1333	392	2902	3982	287
75 mg.L ⁻¹ de K ₂ S ₂ O ₅	128	510	343	155	595	396	180	544	386

1.1.2. Influência da presença de ácidos hidroxicinâmicos e etanol na tolerância a SO₂

A presença do etanol diminuiu a tolerância da cepa a SO₂, na **Figura 23** observa-se que a combinação de etanol com SO₂, na presença ou ausência de HCAs provocou a morte das células. Por outro lado, na ausência do etanol e presença de SO₂, ou presença de etanol e ausência de SO₂, a cepa manteve a viabilidade, apenas com leve queda no início do tratamento com SO₂ e sem etanol, como observado anteriormente. A influência do etanol no aumento da inibição por SO₂ corroboram os dados de Chandra e colaboradores (2014), que detectaram uma interação negativa entre etanol e SO₂ por meio de metodologia de superfície de resposta.

Contudo, ao longo do tempo os tratamentos com etanol e SO₂ combinados recuperaram o desenvolvimento e a viabilidade, enquanto na ausência de HCAs não recuperaram a culturabilidade. Um dos problemas de contaminação de vinhos por *B. bruxellensis* é exatamente o desenvolvimento da população após meses de engarrafamento. Alguns autores atribuem isso à teoria de que o SO₂ apenas induz o estado de VBNC das células ao invés de matá-las (SERPAGGI et al., 2012). Agnollucci et al. (2010) relataram a capacidade de várias cepas de *Brettanomyces* em entrar no estado VBNC após tratamento com SO₂ em concentrações de 0,2 a 1 mg.L⁻¹ e eles mencionaram o potencial de recuperação da culturabilidade após a remoção do estresse. Entretanto, neste experimento, a morte celular é observada pela coloração das células com azul de metileno, o que poderia indicar o desenvolvimento de poucas células adaptadas ou que células tolerantes conseguiram voltar a multiplicar-se com a diminuição de estresse, como poderia ser em caso de volatilização do SO₂ ao longo do experimento.

Figura 23: Influência da presença de HCAs e etanol na tolerância a SO_2 . A) contagem de células viáveis. B) Contagem de unidades formadoras de colônias.



Linhas pontilhadas correspondem à ausência de SO_2 e linhas sólidas a 50 mg.L⁻¹ de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Sem etanol e sem HCAs (—■—, - -■- -); 10% etanol e 10 mg.L⁻¹ de HCAs (—○—, - -○- -); 10% etanol e ausência de HCAs (—▲—). A) contagem de células viáveis por mL de meio; B) Contagem de unidades formadoras de colônias por mL de meio

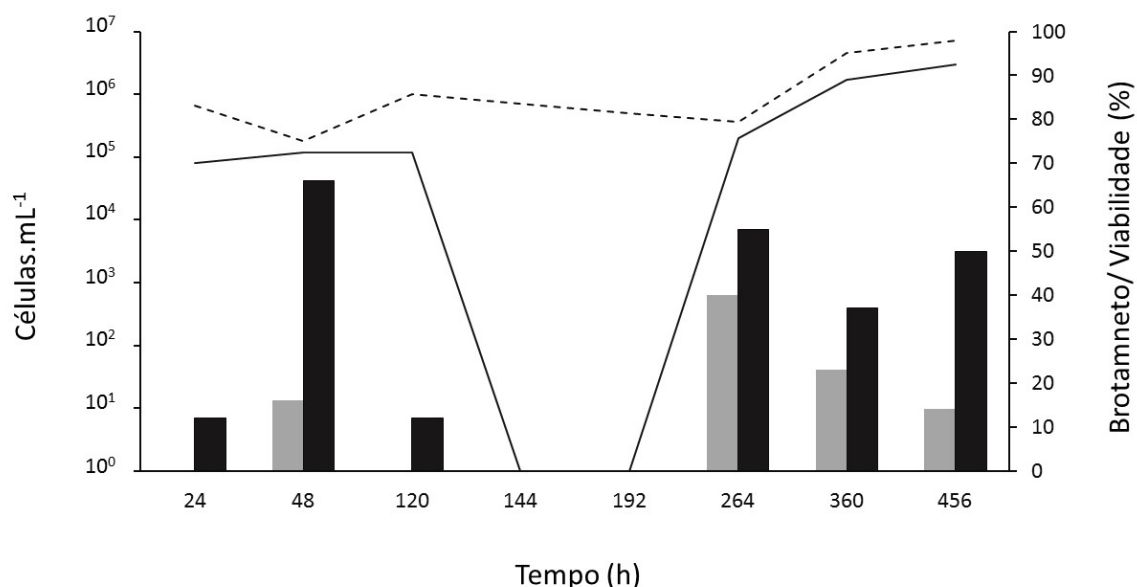
1.1.3. Capacidade de recuperação da viabilidade na presença de SO₂

Na fermentação da cepa com meio K e 60 mg.L⁻¹ de K₂S₂O₅ observou-se morte celular em 144 e 192 h de cultivo com posterior recuperação da viabilidade, **Figura 24**.

Em 24 h não houve taxa de brotamento e a viabilidade foi baixa, provocando queda populacional em 48 h, entretanto aparecem células em brotamento e o número de células vivas se mantém, o que faz com que a taxa de viabilidade seja maior.

Durante o processo de recuperação da viabilidade populacional, em 264 h a taxa de brotamento é alta, indicando que o retorno do desenvolvimento populacional se dê à multiplicação de poucas células que permaneceram viáveis no meio e que não foram detectadas durante a amostragem em 144 e 192 h devido ao baixo número de células viáveis.

Figura 24: Taxa de brotamento, taxa de viabilidade, população celular e número de células viáveis durante fermentação em meio K com 60 mg.L⁻¹ de metabissulfito de potássio.



Taxa de brotamento (■), taxa de viabilidade (■), população celular (---) e número de células viáveis (—)

Os dados não permitem saber se essa recuperação populacional se deve à diminuição de condições de estresse no meio por perda de SO₂ ou se são fruto do desenvolvimento de células adaptadas às condições de cultivo. Uma alternativa de obter respostas seria realizar a quantificação do SO₂ ao decorrer do experimento a fim de observar se esse composto é perdido com o tempo.

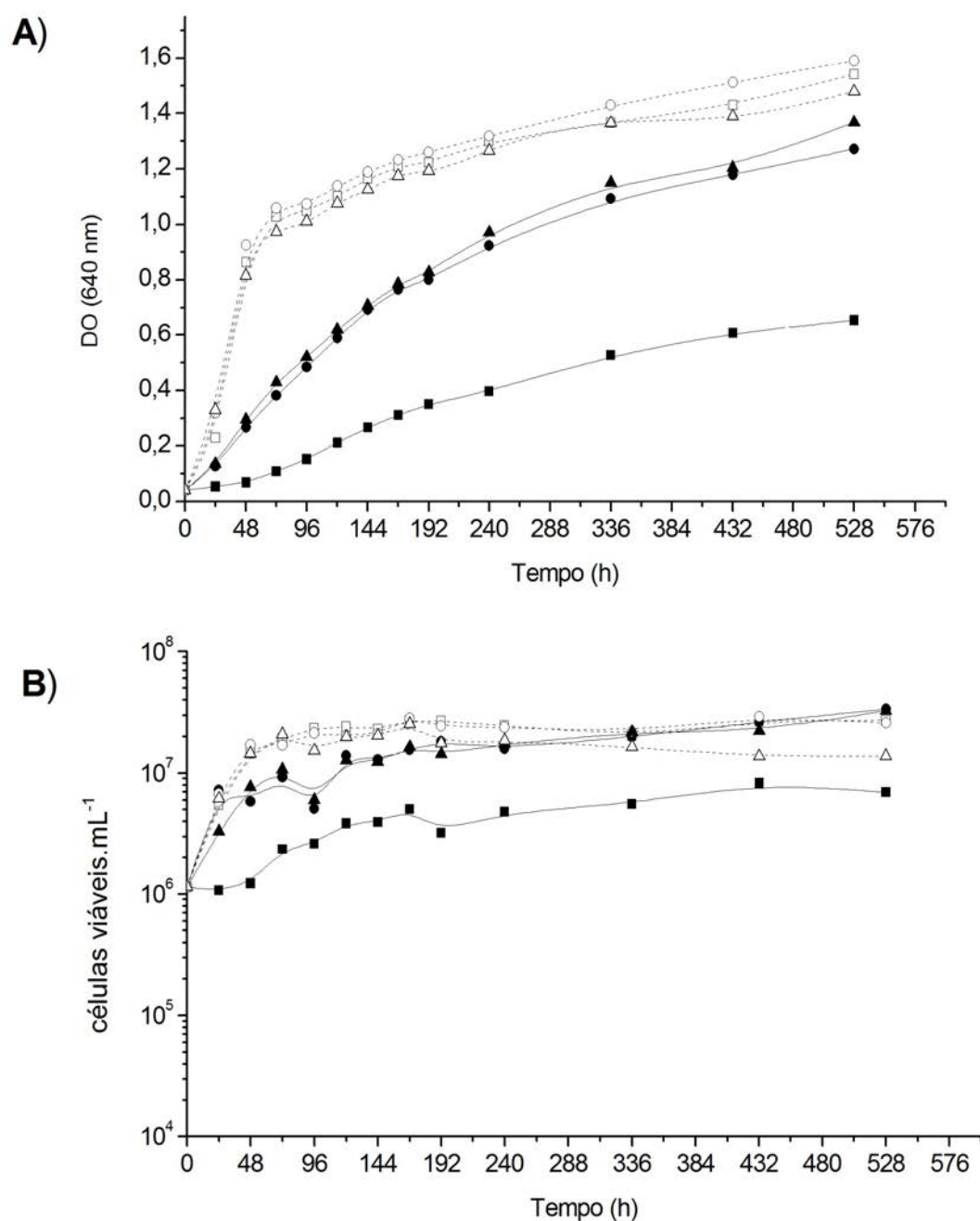
1.1.4. Capacidade de assimilação de ácido p-cumárico

A **Figura 25** apresenta a densidade óptica (Figura 25A) e contagem de células viáveis (Figura 25B) em fermentação com YNB e combinações de ácido p-cumárico e glicose. Observa-se que a cepa é capaz de crescer lentamente utilizando apenas YNB, entretanto, nos tratamentos contendo YNB e ácido p-cumárico o desenvolvimento populacional é consideravelmente maior, deixando claro que a cepa utiliza o ácido como fonte de carbono. As diferenças de concentração de ácido p-cumárico não resultaram em variação na curva de crescimento, assim como as curvas de crescimento foram semelhantes em todos os tratamentos contendo glicose.

O número de células viáveis apresentou uma estabilização parecida em todas as cepas. Na presença de glicose as células se desenvolveram rápido e acabaram tendo queda na viabilidade, sendo que em meio contendo glicose e 1 mM de ácido p-cumárico a viabilidade sofreu queda maior. Na presença de glicose a população se desenvolve rápido e a viabilidade tem queda maior. Não houve diferença, no perfil de desenvolvimento, entre 0,1 e 1,0 mM de ácido p-cumárico

A **Tabela 13** apresenta os resultados da produção de fenóis voláteis em 552 h de cultivo dos tratamentos que continham o ácido p-cumárico. A produção do 4-etilfenol foi de acordo com a concentração do ácido, maior quantidade de ácido maior quantidade de 4-etilfenol, a utilização do ácido foi dividida entre crescimento e produção do fenol, independente da quantidade presente. Além disso não houve diferenciação na produção do fenol quando comparado a ausência e a presença de glicose, ou seja, a cepa não produziu maior quantidade de fenol na presença de outra fonte de carbono.

Figura 25: Desenvolvimento de *B. bruxellensis* ISA 2211 em teste de utilização de ácido p-cumárico como fonte de carbono. A) Medida da densidade óptica; B) Contagem de células viáveis.



YNB (—■—), YNB com glicose a 2 g.L⁻¹ (---□---), YNB com 0,1 mM de ácido p-cumárico (—●—), YNB com glicose a 2 g.L⁻¹ e 0,1 mM de ácido p-cumárico (---○---), YNB com 1,0 mM de ácido p-cumárico (—▲—), YNB com glicose a 2 g.L⁻¹ e 1,0 mM de ácido p-cumárico (---△---).

Tabela 13: Quantificação dos fenóis voláteis 4-etilfenol (EP), 4-etilguaicol (EG), 4-vinilfenol (VP) com 552 h de cultivo.

	EP ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	EG ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	VP ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
YNB	65	46	0
YNB + Glicose	67	40	0
YNB + 0,1 pCA	5908	44	0
YNB + Glic. + 0,1 mM pCA	6920	41	0
YNB + 1.0 mM pCA	72162	46	18
YNB + Glic. + 1,0 mM pCA	69820	43	0

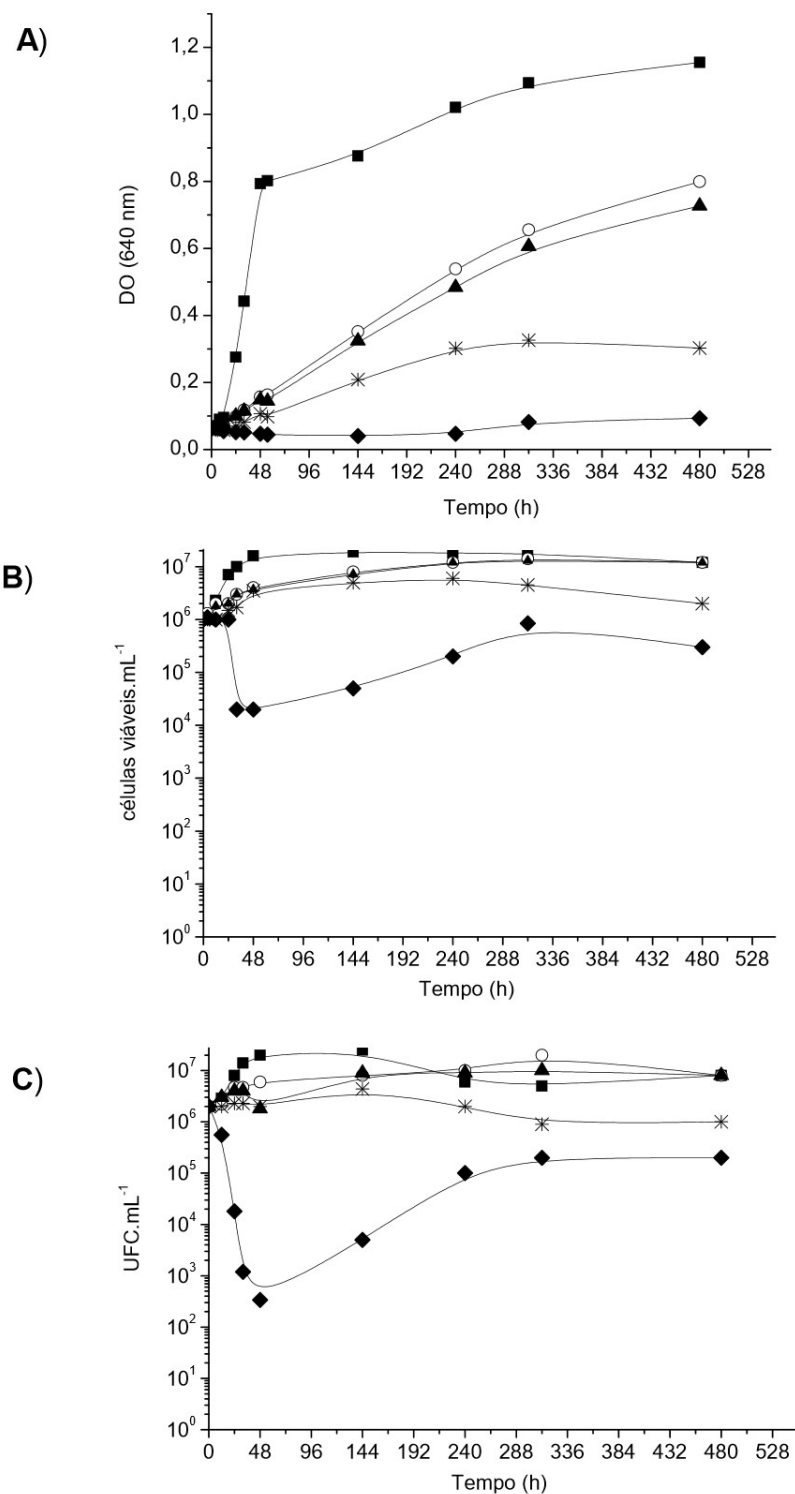
A única produção considerável foi a de 4-etilfenol, o que é natural, já que o ácido *p*-cumárico é precursor do 4-etilfenol. Enquanto o precursor do 4-etilguaicol é o ácido ferúlico.

1.1.5. Utilização de ácido *p*-cumárico como fonte de carbono em variadas concentrações.

A **Figura 26 A** mostra que houve inibição de crescimento da cepa a partir de 5 mmol.L^{-1} de ácido *p*-cumárico, sendo que existe uma diferença considerável entre 5 e 10 mmol.L^{-1} . Com 10 mmol.L^{-1} a cepa sofre forte inibição do crescimento populacional e queda inicial da viabilidade (**Figuras 26 B e C**). Comparando-se os perfis de 10 mmol.L^{-1} da contagem de células viáveis em câmara de Neubauer e da Contagem de unidades formadoras de colônias observa-se que existem células no estado de “viável porém não cultivável”. Este estado é característico dessa espécie e relatado na literatura quando a célula está sob estresse por SO_2 (AGNOLUCCI et al., 2014) e confirma a inibição das células pelo ácido *p*-cumárico.

O desenvolvimento populacional, a viabilidade e a culturabilidade em 1 e 2 mmol.L^{-1} de ácido *p*-cumárico foram semelhantes e o número de células viáveis nessas duas concentrações se equiparou ao de glicose no decorrer do cultivo, apesar de não atingir o mesmo crescimento populacional.

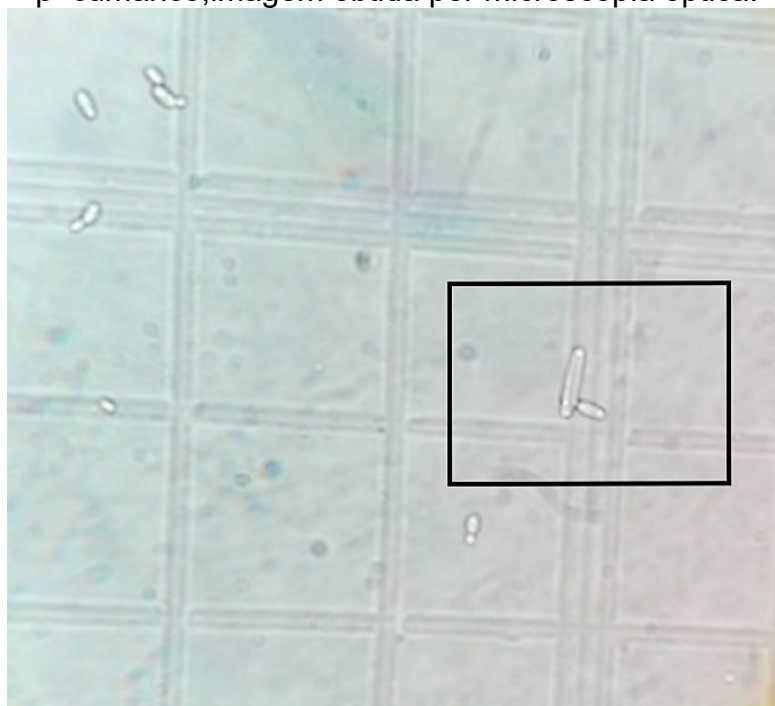
Figura 26: Desenvolvimento de *B. bruxellensis* ISA 2211 sob diferentes concentrações de ácido p-cumárico. A) Medida da densidade óptica. B) Contagem de células viáveis. C) Contagem de unidades formadoras de colônias.



Glicose a 2 g.L⁻¹ (—■—); ácido p-cumárico a 1 mM (—○—), 2 mM (—▲—), 5 mM (—✱—), 10 mM (—◆—).

Quando cultivadas em ácido *p*-cumárico, independente da concentração, algumas células mudaram sua morfologia, estas se apresentavam mais alongadas e maiores que as outras células, **Figura 27**. No meio que não continha o ácido *p*-cumárico e sim glicose as amostras não apresentavam essa forma, mas nos meios contendo o ácido era comum observar esse tipo de morfologia, entretanto poucas células tinham a morfologia modificada. A literatura carece de trabalhos que esclareçam essas estratégias de sobrevivência. Uscanga e colaboradores (2000) também observaram diferenças na morfologia de *B. bruxellensis* com mudanças nutricionais, como a ausência de sulfato de amônio, mas as bases dessa estratégia de sobrevivência não são esclarecidas.

Figura 27: Morfologia celular de *B. bruxellensis* ISA 2211 na presença de ácido *p*-cumárico, imagem obtida por microscopia óptica.



Aumento de 400x

4. CONCLUSÕES

No geral, a cepa *B. bruxellensis* ISA 2211 mostrou suscetibilidade às condições do meio, entretanto parece ter habilidades que permitem a adaptação ao meio em que se encontra.

A levedura teve a tolerância a SO₂ diminuída quando combinado com etanol. Já a presença de vitaminas e extrato de levedura aumentaram a tolerância da cepa ao SO₂, porém foi capaz de recuperar o crescimento em algumas condições.

Com relação ao ácido p-cumárico como fonte de carbono, a estirpe foi capaz de utilizá-lo, porém teve seu crescimento inibido com quantidade maiores do composto presente no meio. Além disso, apresentou modificação da morfologia de algumas células na presença do composto.

A espécie *B. bruxellensis* possui características diferenciadas de outras espécies de leveduras, tais como a utilização de fontes de carbono e nitrogênio incomuns, e possui boa adaptação ao ambiente industrial. Atualmente é vista como um problema, por se tratar de um contaminante de vinhos e dornas de produção de etanol combustível, entretanto, se melhor estudada e compreendida, talvez possa ser promissora em processos industriais. Com relação ao controle de sua contaminação, é preciso continuar buscando novas alternativas, pois a suscetibilidade dela ao meio e à presença de outros microrganismos podem ser poderosas ferramentas, ainda que seja necessário a combinação com o SO₂.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNOLUCCI, M.; CRISTANI, C.; MAGGINI, S.; et al. Impact of sulphur dioxide on the viability, culturability, and volatile phenol production of *Dekkera bruxellensis* in wine. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 653–659, 2014.

AGNOLUCCI, M.; REA, F.; SBRANA, C.; et al. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 76–80, 2010.

BARATA, A.; CALDEIRA, J.; BOTELHO, R.; et al. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 201–207, 2008b.

BARATA, A.; PAGLIARA, D.; PICCININNO, T.; et al. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1097–1102, 2008a.

BENITO, S.; PALOMERO, F.; MORATA, A.; CALDERÓN, F.; SUÁREZ-LEPE, J. A. Factors affecting the hydroxycinnamate decarboxylase/vinylphenol reductase activity of *Dekkera/Brettanomyces*: Application for *Dekkera/Brettanomyces* control

- in red wine making. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. 15–22, 2009.
- BLOMQVIST, J.; EBERHARD, T.; SCHNÜRER, J.; PASSOTH, V. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1487–1497, 2010.
- CHANDRA, M.; BARATA, A.; FERREIRA-DIAS, S.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. A Response Surface Methodology study on the role of factors affecting growth and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis* ISA
- CONTERNO, L.; JOSEPH, C. M. L.; ARVIK, T. J.; HENICK-KLING, T.; BISSON, L. F. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, p. 139–147, 2006.
- DIAS, L.; PEREIRA-DA-SILVA, S.; TAVARES, M.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. **Food Microbiology**, v. 20, p. 377–384, 2003.
- LEITE, F. C. B.; BASSO, T. O.; PITA, W. D. B.; et al. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, A major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 34–43, 2013.
- OELOFSE, A.; PRETORIUS, I. S.; TOIT, M. DU. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 29, p. 128–144, 2008.
- PEREIRA, L. F.; BASSI, A. P. G.; AVANSINI, S. H.; et al. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 529–539, 2012.
- SERPAGGI, V.; REMIZE, F.; RECORBET, G.; et al. Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. **Food Microbiology**, v. 30, p. 438–447, 2012.
- SMITH, C. **Postmodern Winemaking**. University of California Press: Los Angeles, 368 p., 2013.
- USCANGA, M. G. A.; DELIA, M. L.; STREHAIANO, P. Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: Growth and physiology in batch and chemostat cultures. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1046–1050, 2000.

CONCLUSÕES GERAIS

1. DISCUSSÃO GERAL

O estudo das características individuais de cada cepa mostrou diferenças de comportamento fisiológico das linhagens frente aos parâmetros fermentativos aplicados. Com relação às cepas produtoras de etanol, conseguiu-se aumentar o consumo do açúcar e, conseqüentemente, aumentar a produção de etanol.

Leveduras não-*Saccharomyces* têm recebido atenção limitada no contexto de produção de etanol de segunda geração ou biorrefinarias, os estudos se concentram em poucas espécies. O metabolismo de pentoses é diferente do metabolismo de hexose e fornece desafios à aplicação da cofermentação, como por exemplo o oxigênio, que se faz necessário para a produção de etanol a partir de xilose, enquanto sua ausência favorece a fermentação de hexose (LERTWATTANASAKUL et al., 2013).

A espécie *C. shehatae* está entre as espécies mais estudadas dentro do contexto de fermentação de xilose e este trabalho contribui com alguns parâmetros pouco explorados, como a avaliação da concentração celular inicial. Além disso, reforça a importância de se avaliar os parâmetros fermentativos a fim de atingir condições que favoreçam a produção de etanol.

No caso da cepa *A. pullulans*, a produção de etanol alcançada com a modificação dos parâmetros fermentativos fortalece a idéia de que deve-se dispensar maior atenção aos estudos fisiológicos e metabólicos de cepas não-*Saccharomyces*, visando aplicação industrial. Ainda que esta cepa não possua um rendimento satisfatório de produção de etanol, possui características fisiológicas e morfológicas diferentes de espécies tradicionalmente promissoras para a fermentação de xilose, por exemplo o fato de ser “yeast-like”.

Para uma aplicação dessas estirpes, deve-se considerar o método de pré-tratamento do material lignocelulósico, uma vez que houve inibição causada por compostos que com frequência são liberados durante processos envolvendo aplicação de reagentes químicos em condições drásticas de temperatura e/ou pressão, levando à necessidade de desintoxicação do hidrolisado ou a tentativa de adaptar as cepas a concentrações maiores desses compostos. Por outro lado, a assimilação do ácido p-cumárico como fonte de carbono pela espécie *B. bruxelensis* é interessante, uma vez que os ácidos hidroxicinâmicos são

compostos derivados da degradação da lignina e causam inibição no processo de fermentação do hidrolisado (KLINKE et al., 2004). Estudos mais aprofundados seriam interessantes, a fim de entender melhor o processo de utilização desses compostos e tentar alternativas de descontaminação.

A espécie *B. bruxelensis* também pode oferecer vantagens na cofermentação de hexoses e pentoses, pelo fato de possuir a característica de fermentar glicose a etanol mais rapidamente na presença de oxigênio do que em condições anaeróbicas, além de ser uma espécie comumente isolada de ambiente de fermentação alcoólica industrial e ser adaptada a esse ambiente. Sendo assim, pode ser uma alternativa de levedura a ser aplicada em conjunto com outras que fermentem pentoses, ou mesmo com *S. cerevisiae*, pois possuem metabolismo diferente e *B. bruxelensis* consegue não competir com *S. cerevisiae* em ambiente de fermentação alcoólica. Além disso, há a alternativa de aplicá-la isoladamente para a fermentação de ambos os açúcares. (STEENSELS et al., 2015).

Assim como *B. bruxelensis*, *A. pullulans* é uma espécie que possui potencial em alcançar maior visibilidade e importância biotecnológica no futuro. De acordo com Chi e colaboradores (2009), é uma espécie reconhecida por estar amplamente distribuída em diferentes ambientes com capacidades de obtenção de diferentes bioprodutos, dependendo de onde a estirpe foi isolada. Os autores chamam atenção para a ocorrência dessas diferenças e para o fato do genoma completo de *A. pullulans* ainda não ter sido sequenciado. Além disso, acreditam ser possível encontrar outros bioprodutos e novos genes a partir dessa espécie.

Sendo assim, mais estudos podem descobrir novos bioprodutos a partir de pentoses, tanto D-xilose quanto L-arabinose, já que a espécie assimila ambos os açúcares, ao mesmo tempo que não possui eficiência para fermentar hexoses (KURTZMAN et al., 2011), o que pode ser vantagem em caso de cocultivo.

No caso de *B. bruxelensis* como contaminante de vinhos, muitas perguntas ainda precisam ser respondidas, se conhece a fisiologia da levedura, mas o metabolismo por traz dessa fisiologia ainda precisa ser explorado. A cepa deste trabalho apresentou suscetibilidade aos fatores ambientais quando combinado com a presença de SO₂, mas ao mesmo tempo mostrou tolerância e adaptabilidade a situações de estresse. Assim como acontece com *A. pullulans*, o estudo das características metabólicas e genéticas dessa espécie pode contribuir

tanto para seu controle como contaminante quanto para seu potencial de aplicação biotecnológica. Apesar de atualmente a espécie estar exercendo um papel de inimiga dos processos biotecnológicos, suas características sugerem um grande potencial em favor da aplicação industrial.

2. CONCLUSÃO

Este trabalho contribuiu com os estudos acerca das características fisiológicas das espécies *Aureobasidium pullulans*, *Scheffersomyces (Candida) shehatae* e *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, confirmando alguns resultados já encontrados na literatura e contrapondo outros, mas acima de tudo mostrando a importância do estudo mais profundo de espécies não-*Saccharomyces* dentro do contexto de aplicações biotecnológicas e, ainda, a necessidade do estudo de diferentes estirpes de uma mesma espécie. Por fim, vale ressaltar que explorar as características das espécies não-*Saccharomyces* pode contribuir tanto com a descoberta de novos bioprodutos quanto com o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHI, Z.; WANG, F.; CHI, Z.; et al. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 793–804, 2009.
- KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 10–26, 2004.
- KURTZMAN, C. P. ; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. Elsevier, 5 ed, 2354 p. 2011.
- LERTWATTANASAKUL, N.; SUPRAYOGI; MURATA, M.; et al. Essentiality of respiratory activity for pentose utilization in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, p. 933–945, 2013.
- STEENSELS, J.; DAENEN, L.; MALCORPS, P.; et al. *Brettanomyces* yeasts-- From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. **International journal of food microbiology**, v. 206, p. 24–38, 2015.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 10 / 12 / 2015

Giisele Marta Martins
Assinatura