



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

GISELE MARTA MARTINS

Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose

São José do Rio Preto
Abril de 2011

GISELE MARTA MARTINS

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE

Orientadora: Prof^a Dr^a Eleni Gomes

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Alonso Bocchini Martins

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre junto ao 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

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Ceccato Antonini
Professor Associado Doutor
UFSCAR - Araras

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
Professor Livre Docente
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 26 de abril de 2011.

Martins, Gisele Marta.

Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose / Gisele Marta Martins. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.
101 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eleni Gomes

Co-orientador: Daniela Alonso Bocchini Martins

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Fungos – Biotecnologia. 3. Fermentação. 4. Bioetanol. I. Gomes, Eleni. II. Bocchini-Martins, Daniela Alonso. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 663.12

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

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte dessa trajetória, dedico e agradeço.
Em especial à minha mãe Dulcinda, ao meu irmão Roberto e ao Everton, pelo amor, incentivo e apoio.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Leveduras e sua importância biotecnológica.....	10
2.2. Fermentação alcoólica.....	11
2.3. Etanol como combustível	13
2.4. Composição e estrutura da biomassa lignocelulósica	15
2.5. Conversão da biomassa a etanol.....	17
2.6. Metabolismo de xilose por leveduras	20
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Gerais	23
3.2. Específicos.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Microrganismos	24
4.2. Coletas, isolamento e estoque de cepas de leveduras	24
4.3. Identificação das cepas de leveduras	25
4.4. Padronização do inóculo	25
4.5. Avaliação da assimilação de xilose e glicose	26
4.6. Avaliação dos efeitos de temperatura e pH sobre o crescimento das leveduras ...	26
4.7. Avaliação da produção de etanol.....	27
4.8. Métodos analíticos	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1. Isolamento de cepas de leveduras.....	29
5.2. Avaliação da assimilação de xilose e glicose pelas cepas de leveduras	31
5.3. Avaliação da capacidade de fermentação alcoólica a partir de xilose.	44
5.4. Avaliação das condições físico-químicas sobre crescimento das cepas isoladas..	49
5.5. Avaliação da produção de etanol pelas cepas	63
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de uma célula de levedura.....	10
Figura 2: Representação da organização da biomassa lignocelulósica	17
Figura 3: Mapa simplificado do metabolismo de D-xilose em leveduras.	22
Figura 4: Assimilação de xilose e crescimento celular pelas cepas <i>P. kluyveri</i> G1.1, <i>P. guilliermondii</i> G1.2, <i>Hanseniaspora sp.</i> G1.3, <i>Hanseniaspora sp.</i> G2 e <i>Hanseniaspora sp.</i> G4.1.....	32
Figura 5: Assimilação de xilose e crescimento celular pelas cepas <i>P. guilliermondii</i> G4.2, <i>Hanseniaspora sp.</i> G7.1, <i>R. mucilaginosa</i> G7.2, <i>H. guilliermondii</i> G9.1 e <i>Candida oleophila</i> G10.1.....	33
Figura 6: Assimilação de xilose e crescimento celular pelas cepas <i>Rhodotorula sp.</i> G10.2, <i>Hanseniaspora sp.</i> G11.1, <i>R. mucilaginosa</i> G11.2, <i>Hanseniaspora sp.</i> G13 e <i>Hanseniaspora sp.</i> G14	34
Figura 7: Assimilação de xilose e crescimento celular pelas cepas <i>Hanseniaspora sp.</i> G15, <i>Hanseniaspora sp.</i> G17, <i>M. koreensis</i> G18, <i>A. pullulans</i> G19 e <i>I. terricola</i> G20.....	35
Figura 8: Assimilação de xilose e crescimento celular pelas cepas <i>T. laibachii</i> 1A8, <i>P. ofunaensis</i> 1A14, <i>C. shehatae</i> BR6-2AY, <i>C. shehatae</i> BR6-2AI e <i>T. multisoron</i> 1A10 ..	36
Figura 9: Assimilação de glicose e crescimento celular pelas cepas <i>P. kluyveri</i> G1.1, <i>P. guilliermondii</i> G1.2, <i>Hanseniaspora sp.</i> G1.3, <i>Hanseniaspora sp.</i> G2 e <i>Hanseniaspora sp.</i> G4.1.....	38
Figura 10: Assimilação de glicose e crescimento celular pelas cepas <i>P. guilliermondii</i> G4.2, <i>Hanseniaspora sp.</i> G7.1, <i>R. mucilaginosa</i> G7.2, <i>H. guilliermondii</i> G9.1 e <i>Candida oleophila</i> G10.1.....	39
Figura 11: Assimilação de glicose e crescimento celular pelas cepas <i>Rhodotorula sp.</i> G10.2, <i>Hanseniaspora sp.</i> G11.1, <i>R. mucilaginosa</i> G11.2, <i>Hanseniaspora sp.</i> G13 e <i>Hanseniaspora sp.</i> G14.	40
Figura 12: Assimilação de glicose e crescimento celular pelas cepas <i>Hanseniaspora sp.</i> G15, <i>Hanseniaspora sp.</i> G17, <i>M. koreensis</i> G18, <i>A. pullulans</i> G19 e <i>I. terricola</i> G20	41
Figura 13: Assimilação de xilose, crescimento celular e produção de etanol pelas cepas <i>C. shehatae</i> BR6-2AI e BR6-2AY, <i>P. guilliermondii</i> G1.2 e <i>Rhodotorula sp.</i> G10.2 durante os primeiros ensaios de fermentação alcoólica.	46
Figura 14: Consumo de xilose e crescimento celular de <i>Pichia ofunaensis</i> 1A-14, <i>Hanseniaspora sp.</i> G4.1, <i>Pichia guilliermondii</i> G4.2, <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> G7.2, <i>Candida oleophila</i> G10.1, <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> G11.2 e <i>Metschnikowia koreensis</i> G18 durante os ensaios de fermentação alcoólica (estas cepas não apresentaram produção de etanol).....	48

Figura 15: Consumo de glicose e crescimento celular de <i>Pichia kluyveri</i> G1.1 sob diferentes condições de cultivo.....	51
Figura 16: Consumo de glicose e crescimento celular de <i>Pichia guilliermondii</i> G1.2 sob diferentes condições de cultivo.....	52
Figura 17: Consumo de glicose e crescimento celular de <i>Hanseniaspora sp.</i> G1.3 sob diferentes condições de cultivo.....	53
Figura 18: Consumo de glicose e crescimento celular de <i>Hanseniaspora sp.</i> G4.1 sob diferentes condições de cultivo.....	54
Figura 19: Consumo de glicose e crescimento celular de <i>Pichia guilliermondii</i> . G4.2 sob diferentes condições de cultivo.....	55
Figura 20: Consumo de glicose e crescimento celular de <i>Hanseniaspora sp.</i> G7.1 sob diferentes condições de cultivo.....	56
Figura 21: Consumo de glicose e crescimento celular de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> . G7.2 sob diferentes condições de cultivo.	57
Figura 22: Consumo de glicose e crescimento celular de <i>Candida oleophila</i> . G10.1 sob diferentes condições de cultivo.....	58
Figura 23: Consumo de glicose e crescimento celular de <i>Rhodotorula sp.</i> G10.2 sob diferentes condições de cultivo.....	59
Figura 24: Consumo de glicose e crescimento celular de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> G11.2 sob diferentes condições de cultivo	60
Figura 25: Consumo de glicose e crescimento celular de <i>Metschnikowia koreensis</i> G18 sob diferentes condições de cultivo.....	61
Figura 26: Consumo de glicose e crescimento celular de <i>Candida shehatae</i> BR6-2AY sob diferentes condições de cultivo.....	62
Figura 27: Consumo de açúcares, crescimento celular e produção de etanol durante fermentação alcoólica realizada em Erlenmeyers de anaerobiose das cepas <i>Candida shehatae</i> , <i>Rhodotorula sp.</i> e <i>S. cerevisiae</i>	64
Figura 28: Consumo de açúcares, crescimento celular e produção de etanol durante fermentação alcoólica realizada com <i>Candida shehatae</i> a 40°C.....	66
Figura 29: Controle da metodologia de fermentação alcoólica.....	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Cepas de leveduras isoladas (identificação e origem)	29
Tabela 2: Consumo de xilose e crescimento das cepas.....	37
Tabela 3: Consumo de glicose e crescimento realizado pelas cepas.	42
Tabela 4: Comparação entre os consumos de xilose e glicose	43
Tabela 5: Consumo de xilose, produção de etanol e rendimento de etanol por xilose consumida durante os primeiros ensaios de fermentação alcoólica.	47
Tabela 6: Consumo de xilose, produção de etanol e rendimento de etanol por xilose consumida durante o segundo experimento de fermentação alcoólica.	68
Tabela 7: Consumo de glicose, produção de etanol e rendimento de etanol por glicose consumida durante o segundo experimento de fermentação alcoólica.	69

RESUMO

Formas alternativas de produção de combustíveis estão sendo amplamente estudadas, entre as quais a utilização da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol. Para que o processo seja viável, o microrganismo fermentador deve ser capaz de utilizar não apenas a glicose, mas também os outros açúcares presentes no hidrolisado desse material, como a xilose, presente em grande quantidade. O objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar cepas de leveduras com capacidade de produção de etanol a partir de xilose. Para tanto, realizou-se coletas de amostras de diferentes materiais no ambiente e o isolamento de cepas foi feito em meio contendo xilose como principal fonte de carbono. Foram isoladas vinte cepas de leveduras, pertencentes aos gêneros *Aureobasidium*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Pichia* e *Rhodotorula*, as quais, junto com mais cinco cepas (*Candida shehatae* BR6-2AY e BR6-2AI, *Trichosporon multisporon* 1A-10, *Trichosporon laibachii* 1A-8 e *Pichia ofunaensis* 1A-14) pertencentes à coleção do laboratório de microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro foram cultivadas aerobicamente em meio nutriente basal composto de xilose ou glicose (30 g/L) como única fonte de carbono para avaliar a capacidade de assimilação desses açúcares. As melhores assimiladoras de xilose foram avaliadas quanto à capacidade de produzir etanol a partir de meio basal contendo xilose ou glicose (60 g/L) por meio de fermentação anaeróbia e, além disso, cultivos aeróbicos em meio YEPD (2% peptona, 1% extrato de levedura e 2% glicose) foram feitos sob diferentes condições de temperatura e pH para avaliar as condições que favoreciam o crescimento das cepas. Durante os experimentos, amostras foram tomadas periodicamente para avaliar o consumo dos açúcares redutores e do crescimento celular. A produção de etanol dos ensaios de fermentação alcoólica foi avaliada por meio de cromatografia gasosa. Todas as cepas consumiram xilose e glicose e quase todas apresentaram bom desenvolvimento a 32°C e pH 5. Quatro cepas, *Candida shehatae*

BR6-2AY e BR6-2AI, *Rhodotorula* sp G10.2 e *Pichia guilliermondii* G1.2, foram capazes de produzir etanol a partir de xilose com valores na ordem de 0,63 a 3,15 g/L.

PALAVRAS-CHAVE: Isolamento de Leveduras, Fermentação Alcoólica, Materiais Lignocelulósicos, Bioetanol, Xilose.

ABSTRACT

Alternatives forms of fuel production have been widely studied, including the use of lignocellulosic biomass to ethanol production. For the process to be possible, the fermenting microorganism must be able to utilize, beyond glucose, other sugars present in the hydrolysate of this material, such as xylose, present in large quantity. The objective of this research was to select yeast strains with ability to produce ethanol from xylose. The isolation of yeast strains was carried out from vegetal material samples using medium containing xylose as main carbon source. Twenty yeast strains isolated (of the genera *Aureobasidium*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Pichia* e *Rhodotorula*) and five strains (*Candida shehatae* BR6-2AY and BR6-2AI, *Trichosporon multisporon* 1A-10, *Trichosporon laibachii* 1A-8 and *Pichia ofunaensis* 1A-14) from work collection of the Microbiology Laboratory of Centro de Estudos de Insetos Sociais, Instituto de Biociências - UNESP/Rio Claro were studied. Strains were grown aerobically in basal nutrient medium containing glucose or xylose (30 g/L) as sole carbon source to evaluate the assimilation of these sugars and furthermore it was evaluated their ability to produce ethanol under anaerobic cultivations. In addition, aerobic cultivations in YEPD medium were performed under different conditions of temperature and pH. Samples were taken periodically to analyze the consumption of sugars and of cell growth. Ethanol production was evaluated by gas chromatography. All strains were able to assimilate xylose and glucose and majority showed good development at 32°C and pH 5. Four strains, *Candida shehatae* BR6-2AY and BR6-2AI, *Rhodotorula* sp G10.2 and *Pichia guilliermondii* G1.2, were able to produce ethanol from xylose with values of 0.63 to 3.15 g/L.

KEYWORDS: Isolation of Yeasts, Alcoholic Fermentation, Lignocellulosic Materials, Bioethanol, Xylose.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda mundial por energia criou a necessidade urgente de se buscar novas fontes de combustíveis, principalmente aqueles cuja produção e uso não agravam os sérios problemas ambientais já existentes. Resíduos vegetais, como bagaço de cana-de-açúcar, constituem matéria-prima alternativa para a produção de etanol celulósico por se tratar de um material amplamente disponível, de baixo custo e gerado em grande volume pela agroindústria.

Para uma produção eficiente de etanol a partir do bagaço, o microrganismo fermentador deve ser capaz de utilizar não apenas a glicose, mas também os outros açúcares liberados pela hidrólise química e/ou enzimática desse material, como xilose e arabinose. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, atualmente utilizada na produção industrial de etanol, não é capaz de fermentar pentoses como a xilose, e desse modo, torna-se necessário a descoberta de cepas de leveduras que sejam capazes de fermentar tanto pentoses quanto hexoses, quer seja por isolamento de novas cepas da natureza, quer seja por técnicas de engenharia genética ou metabólica.

O presente trabalho buscou contribuir com o atual investimento em pesquisas para a utilização de biomassa lignocelulósica na produção de etanol, propondo o isolamento de cepas de leveduras do meio ambiente capazes de produzir etanol a partir de xilose e glicose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leveduras e sua importância biotecnológica

As leveduras constituem um grupo de organismos eucarióticos pertencentes ao Reino *Fungi*, sendo a maioria ascomicética. São caracterizadas por um crescimento vegetativo predominantemente unicelular, embora algumas possam formar filamentos sob certas condições (“yeast-like fungi”). As células de leveduras são geralmente esféricas, ovais ou cilíndricas e a divisão celular geralmente ocorre por brotamento e, em poucos gêneros, por fissão binária. São muito maiores do que as células bacterianas, podendo ser distinguidas microscopicamente destas por suas dimensões e pela evidente presença de estruturas celulares internas, como o núcleo e outros sistemas de membrana (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). A Figura 1 mostra esquematicamente a estrutura celular de uma levedura.

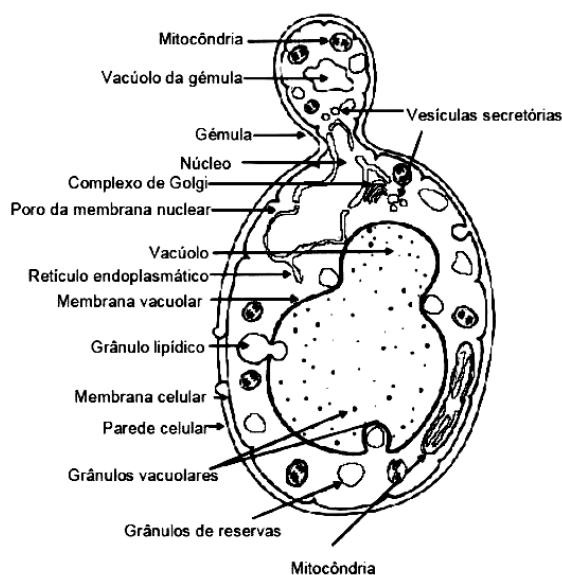


Figura 1: Representação esquemática de uma célula de levedura (LOURENÇO, 2009)

Habitats nos quais há a presença de açúcares solúveis, como frutos, flores e secreções de certos tecidos vegetais, são ideais para o crescimento de leveduras. Algumas espécies vivem simbioticamente com animais, em especial insetos, enquanto outras são patogênicas para animais e humanos (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1997).

Esse grupo de microrganismos encontra-se entre os mais intensamente utilizados em indústrias. As leveduras 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, do vinho e do pão, embora, somente no século dezenove tenha sido reconhecida a natureza biológica dos agentes responsáveis por estes processos (TORTORA; FUNKE; CASE, 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).

2.2. Fermentação alcoólica

Fermentação é um termo genérico para a degradação anaeróbia de nutrientes orgânicos a fim de obter energia, conservada na forma de Trifosfato de Adenosina (ATP), que será empregado na realização de vários trabalhos fisiológicos necessários à manutenção da vida, tais como absorção, excreção, biossíntese, crescimento e multiplicação. As fermentações são classificadas tanto em termo do substrato fermentado como dos produtos de fermentação gerados (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A glicólise é um processo bioquímico pelo qual a maioria das formas de vida degrada a glicose a duas moléculas de piruvato com produção líquida de 2 ATPs, constitui-se de uma série de reações que ocorrem em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Durante esse processo, duas moléculas de NAD^+ são reduzidas a NADH. Contudo, a célula possui apenas uma pequena quantidade de NAD^+ , e, se todo NAD^+ for reduzido, a degradação da glicose cessará. Essa “barreira” é transposta na fermentação pela oxidação de NADH, que origina o NAD^+ , por meio de reações envolvendo a redução do piruvato a algum dos vários produtos de fermentação (VOET, 1995).

As leveduras podem crescer eficientemente em substratos que contêm açúcar, multiplicando-se e gerando CO_2 (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 CO_2 quando em presença de elevadas concentrações de açúcares e/ou ausência de O_2 (PHAFF et al., 1978; AMORIM; LEÃO, 2005).

Na fermentação alcoólica o piruvato, formado a partir da glicólise, é convertido em etanol e CO_2 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 Mg^{2+} 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 (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002). Etanol e CO_2 são, então, os produtos finais da fermentação alcoólica, e a 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 produz duas de ATP, enquanto na respiração fabrica 38 moléculas de ATP (CAMPBELL, 2000).

Estima-se que 5% do açúcar metabolizado pela levedura sejam desviados para gerar produtos secundários da fermentação, sendo que os restantes 95% resultam no rendimento em etanol. No entanto, industrialmente, foram constatados diversos fatores que afetam a levedura: são de ordem física (temperatura e pressão osmótica), química (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológica (espécie, linhagem e concentração da levedura, além de contaminação bacteriana). Assim, de 8 a 15% do açúcar processado são desviados para a formação de glicerol, ácido succínico e biomassa. O glicerol está na mesma via de síntese do etanol, como um desvio, competindo com ele pela utilização do poder redutor de NADH, já o desenvolvimento do ácido succínico é precedido pelo piruvato e ocorre pela atividade residual de enzimas respiratórias, quando a mitocôndria está reprimida em anaerobiose, ocorrendo um processo oxidativo (AMORIM & LEÃO 2005).

O acúmulo de etanol também pode gerar múltiplos efeitos, 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 (BAI; ANDERSON; MOO-YONG, 2008).

2.3. Etanol como combustível

A utilização do etanol como fonte de energia se iniciou com o uso em máquinas de combustão interna, na Alemanha e França por volta de 1894 e o Brasil utiliza o etanol como combustível desde 1925. Com a crise do petróleo, na década de 70, o etanol passou a ser

considerado um combustível alternativo e a partir dos anos 80 foi adotado por muitos países (BALAT, 2008).

O Brasil utiliza a cana-de-açúcar para a produção de etanol enquanto os Estados Unidos e a Europa utilizam principalmente amido de milho e de trigo e cevada, respectivamente. Atualmente, o etanol Brasileiro é mais competitivo do que o produzido nos Estados Unidos e na Europa devido ao processo ser rápido, fácil e de baixo custo quando comparado aos outros. Por exemplo, no melaço da cana-de-açúcar, não há necessidade de uma hidrólise prévia do substrato (sacarose), que pode ser quebrada pela levedura responsável pelo processo de fermentação. Já no caso de materiais ricos em amido, é necessário quebrar as cadeias deste carboidrato, uma vez que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não consegue utilizá-lo. Assim, grandes concentrações de enzimas amilolíticas, como glucoamilase e α -amilase, devem ser adicionadas ao processo a fim de realizar a hidrólise enzimática do amido para, enfim, obter o xarope de glicose que é convertido a etanol pelas leveduras em processo de fermentação (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007; BALAT, 2010).

Com a crescente procura por biocombustíveis, processos alternativos de produção estão surgindo. O etanol representa uma importante opção para a substituição de combustíveis não renováveis, tendo em vista tanto a possível exaustão dos mesmos na natureza quanto a redução da emissão de gases poluentes como CO₂, SO₂ e NO_x na atmosfera, que contribuem para o aquecimento global e mudanças climáticas (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007; ARAQUE et al, 2008).

Nos últimos anos, vários países têm investido em pesquisas para a utilização de biomassa lignocelulósica na produção de etanol (etanol de 2ª geração). O fato de muitos materiais lignocelulósicos serem derivados de atividades agrícolas, industriais ou sobras domésticas, oferece altas possibilidades para a produção de etanol em larga escala, bem

como seu consumo global como combustível renovável. Entretanto, devido à complexidade da composição e estrutura do material lignocelulósico, o custo de produção acaba sendo alto quando comparado aos processos a partir de materiais ricos em sacarose (DEMIRBAS, 2005; BALAT et al, 2008).

2.4. Composição e estrutura da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica inclui materiais oriundos das atividades de exploração agroindustrial e florestal, tais como palhas de arroz e trigo, sabugo de milho, casca de aveia, bagaço de cana-de-açúcar, entre outros. Esses materiais possuem grande potencial de uso como matérias-primas em processos industriais para a produção de alimentos, biocombustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos, pois são recursos renováveis e de alta disponibilidade (ATTFIELD; BELL, 2006).

Os materiais lignocelulósicos são compostos por três grandes grupos de polímeros: celulose, lignina e hemiceluloses. A celulose é o constituinte básico da parede celular vegetal. Trata-se de um homopolissacarídeo de ocorrência natural composto por unidades de D-glucose unidas por meio de ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) (β -D-glucana), que é encontrado em todos os grupos vegetais (CAMPBELL, 2000; BALAT et al, 2008).

A celulose apresenta regiões altamente ordenadas (cristalinas) e áreas menos ordenadas (amorfas), onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada. As forças responsáveis pela estabilidade das regiões cristalinas são basicamente o resultado de um grande número de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. Diversas fibrilas elementares se associam umas com as outras formando cristalitos de celulose. Posteriormente, quatro desses agregados cristalinos se unem através de uma monocamada de hemicelulose, resultando na microfibrila de celulose. A celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou

cristalina. No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários microrganismos têm se mostrado capazes de catalisar a hidrólise de celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares solúveis (MARTINS, 2005).

A lignina é um polímero amorfo com estrutura tridimensional muito complexa e baseada em três precursores monoméricos aromáticos: os álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico, a proporção desses monômeros varia entre diferentes espécies de plantas. Esta macromolécula orgânica está presente na madeira em cerca de 20% a 30%, agindo como material adesivo, como agente de enrijecimento e como barreira contra degradação enzimática e/ou microbiana da parede celular (BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992; MARTINS, 2005).

Hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por pentoses, hexoses ou ácidos urônicos. A xilose é o maior componente da hemicelulose da maioria das plantas, fazendo parte de um complexo de carboidratos poliméricos incluindo xilana (polímero de xilose) e xiloglicana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose). Outros polímeros como glicomanana (heteropolímero de D-glicose e D-manose), galactoglicomanana (heteropolímero de D-galactose, D-glicose e D-manose) e arabinogalactana (heteropolímero de D-galactose e D-arabinose) são encontrados fazendo parte da hemicelulose (GÓMEZ, 1985; SILVA et al, 2009).

Estruturalmente, as hemiceluloses são mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003). A Figura 2 mostra a uma representação da organização dos componentes da biomassa lignocelulósica.

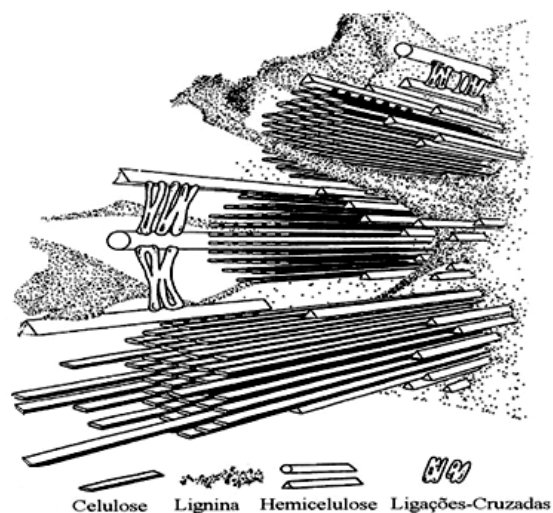


Figura 2: Representação da organização da biomassa lignocelulósica. (adaptado de BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992).

2.5. Conversão da biomassa a etanol

Um processo econômico de biomassa-etanol depende de um eficiente aproveitamento de todo o açúcar presente nas frações que compõem a lignocelulose, e para realizar a conversão desses materiais a etanol são necessárias diferentes etapas, incluindo: pré-tratamento da biomassa lignocelulósica com processos físicos, químicos ou físico-químicos a fim de desestabilizar sua estrutura; hidrólise desse material a açúcares fermentescíveis; fermentação desses açúcares a etanol por microrganismos eficientes; separação do etanol por destilação e tratamento dos efluentes originados durante o processo (SUN; CHENG, 2002).

Diferentes tipos de processos e reagentes podem ser utilizados no pré-tratamento, processos mecânicos como moagem visam a diminuição do tamanho e a organização do complexo lignocelulósico, já processos físico-químicos como explosão por vapor, no qual pode ser acrescentado amônia ou CO_2 , permitem a separação das fibras com perda mínima de material – no caso da amônia, o processo não libera diretamente nenhum açúcar, mas

permite que celulose e hemicelulose sejam atacados por enzimas que os reduzem a açúcares. Entre os pré-tratamentos químicos, tem-se a utilização de ácidos, principalmente HCl ou H_2SO_4 , que apesar de eficientes podem ser corrosivos, além de liberar compostos tóxicos; e utilização de reagentes alcalinos, principalmente NaOH, que reduz o conteúdo de lignina e hemicelulose na biomassa, aumentando a área de superfície, permitindo a penetração de moléculas de água em camadas interiores, e rompendo as ligações entre hemicelulose e lignocarbohidratos. Tratamentos com ozônio removem a lignina de forma eficiente e não produz resíduos tóxicos, no entanto, este processo requer uma grande concentração de ozônio, tornando-o inviável economicamente (SUN; CHENG, 2002; BALAT et al, 2008).

Após o pré-tratamento, a hidrólise pode ser realizada por meio da aplicação direta de enzimas ou pela aplicação de microrganismos produtores das enzimas. É comum a utilização de uma mistura de celulasas, como endoglucanases, exoglucanases, glucosidases e celobiohidrolases capazes de hidrolisar as cadeias de celulose. As endoglucanases atacam o interior das cadeias de celulose de forma aleatória, produzindo oligossacarídeos, enquanto as exoglucanases atacam as extremidades da cadeia, liberando celobiose. As glucosidases, como a β -glucosidases, hidrolisam celobiose e outros oligossacarídeos a glicose (DEMIRBAS, 2005). As hemicelulasas são as responsáveis por hidrolisar a fração hemicelulósica, com destaque para as enzimas do complexo xilanolítico. As xilanases clivam porções internas da cadeia principal de xilana, liberando substrato para a atuação das β -xilosidases, que atuam sobre oligossacarídeos de xilana e sobre as extremidades não redutoras da xilana (ação exo), e são responsáveis pela conversão da xilobiose a xilose (FERREIRA FILHO, 2004). Outras enzimas como esterases, arabinofuranosidases e glucoronidases hidrolisam as ligações de resíduos das cadeias laterais do polímero de xilana. Além da hidrólise enzimática a biomassa lignocelulósica também pode ser

hidrolisada por ácidos, raios gama, irradiação eletrônica ou microondas (BALAT et al, 2008).

No hidrolisado lignocelulósico, diversos tipos de açúcares se encontram disponíveis, porém, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada nos processos de produção de etanol, não é capaz de fermentar pentoses. A xilose é a mais abundante das pentoses presentes no material lignocelulósico, e embora este açúcar possa ser fermentado por algumas espécies de bactéria, leveduras e fungos filamentosos, a produção de etanol a partir desta fonte ainda é relatada como baixa (STAMBUK et al, 2003; FU et al, 2009). Dessa forma, a busca por cepas de leveduras com melhor eficiência na utilização de diferentes açúcares é de grande importância para a aplicação em processos de produção de etanol. Vários estudos de isolamento e modificação genética têm sido realizados visando a obtenção de microrganismos fermentadores de pentoses, bem como a otimização do processo de fermentação (GOVINDASWAMY; VANE, 2007; FERNANDES, 2008; RAO; BHADRA; SHIVAJI, 2008; VAN VLEET; JEFFRIES, 2009; FROMANGER, 2010; MARTÍN et. al., 2010; MORAES; PEREZ; DORTA, 2010).

Diversos produtos de degradação, tais como o ácido fórmico, acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis, produzidos durante o pré-tratamento e a hidrólise, podem inibir o processo de fermentação e afetar rendimentos do etanol, devendo assim ser removidos ou suavizados (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000a).

Durante o processo de hidrólise ácida, pode ocorrer a formação de alguns subprodutos como ácido acético, ácidos fórmicos e levulínicos, compostos fenólicos, e aldeídos furanos, principalmente furfural e 5- hidroximetilfurfural (MARTIN et al., 2007). Ácido acético é formado pela hidrólise do grupo acetil presente na hemicelulose e ácidos fórmicos e levulínicos são produtos da degradação do açúcar. 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). Compostos fenólicos são formados principalmente pela degradação parcial da lignina, podem inibir a bioconversão, inibindo a atividade enzimática, destruindo a integridade da membrana e afetando as suas propriedades, como a barreira seletiva (HEIPIEPER et al., 1994). Furfural e 5-hidroximetilfurfural são formados pela degradação de pentoses e hexoses, respectivamente, afetam os microrganismos, pois reduzem suas atividades enzimáticas e biológicas, quebram o DNA e inibem a síntese de RNA e proteínas (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988; MODING et al., 2002).

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 (DUARTE et al., 2005; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). 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 da levedura durante o processo, principalmente com relação ao crescimento celular.

2.6. Metabolismo de xilose por leveduras

As leveduras, 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.

Entre os gêneros que possuem capacidade de fermentar xilose estão *Brettanomyces*, *Candida*, *Clavispora*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen*, *Pichia* e *Schizosaccharomyces*. As espécies *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* e *Pichia stipitis* são indicadas, na literatura, como as mais aptas a alcançar altos rendimentos de fermentação alcoólica a partir de xilose. (McMILLAN, 1993; BALAT et al, 2008).

O metabolismo de xilose, em uma etapa inicial, pode ocorrer de duas formas: microrganismos que possuem a enzima xilose isomerase (predominante em bactérias) realizam a conversão da D-xilose em D-xilulose que é facilmente convertida em xilulose-5-fosfato. Esta entra na via Pentose-Fosfato (PPP) gerando frutose-6-fosfato, que por sua vez, por meio da glicólise, é convertida em piruvato. Na segunda forma (predominante em leveduras, fungos filamentosos e outros eucariotos) a D-xilose é catalisada pela xilose redutase gerando xilitol que, por meio da xilitol desidrogenase, é convertido em xilulose-5-fosfato, que segue também via PPP e, em seguida, via glicólise até gerar piruvato. Nas leveduras, em ausência de oxigênio, o piruvato é reduzido a etanol e CO₂ (JACKSON; NICOLSON, 2002; JEFFRIES, 2006). A Figura 3 apresenta um mapa simplificado do metabolismo de D-xilose.

O metabolismo de xilose em leveduras é parcialmente regulado pela disponibilidade de oxigênio. 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 cofator resulta em um acúmulo de NADP⁺ e NADH devido a um desequilíbrio de reciclagem de co-fatores que ocorre sob condições de respiração reduzida, provocando a inibição da atividade de XDH, o que, em leveduras fermentadoras de xilose, contribui significativamente para o aumento da formação de xilitol e diminuição da produção de etanol. Sob condições anaeróbias, NADPH pode ser regenerado por meio de frutose-6-P na via PPP e através das enzimas NADP-dependentes, isocitrato desidrogenase e

aldeído desidrogenase, minimizando o acúmulo de NADP^+ , entretanto, não é possível produzir a regeneração de NADH a NAD^+ por meio da fermentação alcoólica e o sistema de transferência de elétrons é incapaz de realizar a re-oxidação pela respiração devido aos baixos níveis de O_2 . A regeneração de NAD^+ pela reação de XDH pode ser efetuada por meio da redução de diidroxiacetona a glicerol, no entanto, a formação de glicerol não é considerada ideal, visto que desvia o carbono da produção de etanol (JEFFRIES, 2006; CHU; LEE, 2007).

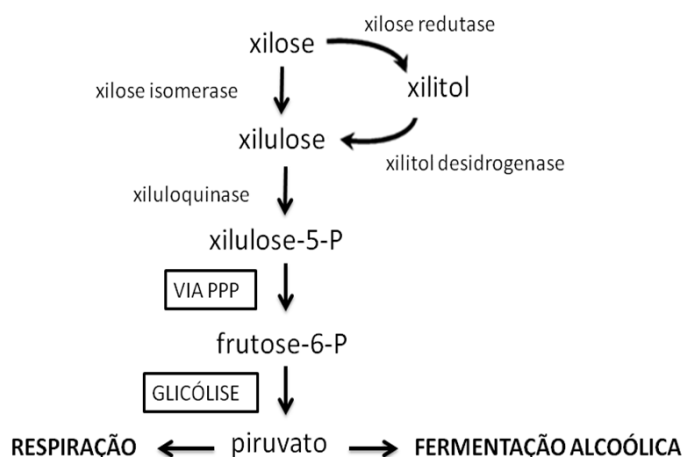


Figura 3: Mapa simplificado do metabolismo de D-xilose em leveduras. (adaptado de JACKSON; NICOLSON, 2002).

Considerando a nossa enorme biodiversidade, a grande quantidade de espécies microbianas ainda não conhecidas e o potencial de diversificação metabólica dos microrganismos, procurou-se nesse trabalho buscar cepas de leveduras no meio ambiente com o intuito de identificar potenciais fermentadores de xilose, fornecendo maior subsídio para o tão almejado sistema metabólico eficiente de produção de etanol a partir de pentoses.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

O presente projeto teve por objetivos gerais a seleção de cepas de leveduras com potencial para aplicação em processos de produção de bioetanol, considerando-se a capacidade de fermentar a xilose e a glicose, de modo a se aproveitar ambos os açúcares do hidrolisado de materiais lignocelulósicos.

3.2. Específicos

Os objetivos específicos do presente projeto são:

- isolar e selecionar cepas de leveduras a partir de coleta de amostras em campo e de “screening” em coleção de leveduras do Centro de Estudo de Insetos Sociais, IB, UNESP, Rio Claro.
- avaliar a capacidade de assimilação de xilose e glicose pelas cepas isoladas;
- definir condições físico-químicas (pH, temperatura) que promovam melhor crescimento das cepas;
- avaliar a capacidade de produzir etanol a partir de xilose e glicose em meio semi-sintético

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismos

Foram utilizadas cinco cepas provenientes das coleções do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (IB/UNESP – Rio Claro): duas cepas, isoladas de água de bromélia (*Vriesea* sp), da espécie *Candida shehatae* BR6-2AY e BR6-2AI, que possuem a característica de fermentar xilose; e três cepas isoladas de ninhos da formiga *Mycocepurus goeldii* (uma formiga da tribo Attini, a qual se caracteriza por cultivar e comer fungos), *Trichosporon multisporon* 1A-10, *Trichosporon laibachii* 1A-8 (ambas são leveduras celulolíticas) e *Pichia ofunaensis* 1A-14 (capaz de fermentar glicose e com bom crescimento em xilose, além de ser celulolítica). Além dessas, 20 cepas de leveduras foram isoladas de amostras coletadas em campo e, dessa forma, um total de 25 cepas foram avaliadas.

Uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*, oriunda de fermento de panificação Fleischmann[®], foi utilizada no processo de produção de etanol a partir de glicose para fins comparativos e como controle da metodologia.

4.2. Coletas, isolamento e estoque de cepas de leveduras

O isolamento foi feito a partir de coletas de material lignocelulósico em decomposição, serrapilheiras, flores, frutos, entre outros. Aproximadamente 0,5 g de amostra foi transferido diretamente para tubos contendo 4,0 mL de meio YEPX (2% peptona, 1% extrato de levedura e 2% de xilose) com 1% de solução dos antibióticos ampicilina e cloranfenicol (500 mg/L). No laboratório, após 48 horas de incubação a 30°C, as amostras foram transferidas, por meio de estrias para placas de Petri, contendo o mesmo

meio nutriente acrescido de agar (1,5%), e foram incubadas a 30°C. Após o crescimento, as colônias foram re-inoculadas, através de semeadura por esgotamento (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004) até a obtenção de culturas puras.

A conservação das culturas puras foi feita por estocagem em glicerol (15%) a -80°C. Para tanto, pérolas de vidro, foram lavadas com água, 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 Ependorf 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.

4.3. Identificação das cepas de leveduras

As cepas de leveduras isoladas, foram identificadas por pesquisadores do Laboratório de Microbiologia – CEIS (IB/UNESP – Rio Claro), sob a coordenação do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, por meio de sequenciamento dos domínios D1/D2 do rDNA (PAGNOCCA et al, 2008).

4.4. Padronização do inóculo

Para cada cepa, após cultivo por 24h, em 25 mL de meio YEPX, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, 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 ependorf de peso conhecido, até peso constante. A partir desses dados, foi construída uma curva de calibração, plotando-se em gráfico os

valores de absorvância 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.

4.5. Avaliação da assimilação de xilose e glicose

Cada cepa foi avaliada quanto ao seu potencial de utilização de xilose e glicose. Para tanto, foi feito o pré-inóculo das cepas em 25 mL de meio YEPD (2% peptona, 1% extrato de levedura e 2% de glicose) durante 24h a 30°C e agitação de 150 rpm. O inóculo inicial do experimento foi padronizado em 1 g/L e o experimento foi feito em 25 mL de meio basal - composto por KH_2PO_4 (2,0 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L), uréia (0,3 g/L), CaCl_2 (0,3 g/L), solução de sais (1,0 g/L) - e xilose ou glicose (30,0 g/L) como única fonte de carbono. Para este cultivo, Amostras foram tomadas a cada 24 horas para a avaliação do crescimento celular e do consumo de açúcar. As melhores cepas assimiladoras de xilose foram selecionadas para o experimento de avaliação da produção de etanol.

4.6. Avaliação dos efeitos de temperatura e pH sobre o crescimento das leveduras

As cepas foram cultivadas por fermentação submersa em meio nutriente YEPD, com pH inicial de 4,0 ou 5,0, em temperatura de 28, 32 e 40°C e agitação de 150 rpm, por 11 horas. O cultivo foi feito em frascos Erlenmeyer de 100 mL contendo 25 mL de meio. Amostras foram tomadas em 1, 3, 5, 7, 9 e 11 horas de cultivo para a determinação do crescimento celular e avaliação do consumo de açúcares. O pré-inóculo foi feito cultivando-se cada cepa em meio YEPD líquido por 24h e o inóculo inicial foi padronizado em 1 g/L.

4.7. Avaliação da produção de etanol

Para avaliar a capacidade das cepas em produzir etanol a partir de xilose, as leveduras foram pré-cultivadas em meio YEPD, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, a 30°C e agitação de 150 rpm, por 24 horas. Após este período, alíquotas foram centrifugadas a 10000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi inoculado (em uma concentração celular final de 4,0 g/L) em 6,0 mL do meio nutriente basal (pH inicial 4) contendo xilose (60,0 g/L) e extrato de levedura (10,0 g/L), utilizando-se frascos de penicilina de 2,5 x 5,0 cm (diâmetro x comprimento), fechados com rolha de borracha e lacrados com lacre de metal como recipiente de fermentação. Nas tampas dos frascos foram inseridas agulhas (de seringas) estéreis, contendo algodão estéril na extremidade exposta ao ar, para que pudessem ocorrer trocas gasosas. Os frascos foram mantidos a 30°C, durante 120 horas, sem agitação. A cada 24 horas um frasco foi retirado para análise do crescimento celular, do consumo de açúcar e da produção de etanol.

A fim de tentar melhorar a produção de etanol, outra metodologia também foi testada para a fermentação alcoólica. O cultivo foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL fechados com válvula própria para fermentação anaeróbia, a válvula continha solução de metabissulfito de sódio a 1 mg/mL para permitir a saída de CO₂ e evitar a entrada de O₂. Em cada Erlenmeyer utilizou-se 60 mL do mesmo meio anteriormente citado, com xilose ou glicose a 100g/L e temperatura e pH ótimos da levedura testada. A fermentação foi realizada durante 120 horas sob agitação de 150 rpm. Os processos de amostragem e análise foram feitos da mesma forma descrita anteriormente.

4.8. Métodos analíticos

Para a determinação da massa celular durante os experimentos, amostras (2,0 mL) do cultivo foram tomadas, em intervalos de tempo definidos e centrifugadas a 10000 x g, por 15

minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi levado à estufa a 60°C até peso constante.

A concentração de açúcares redutores foi feita pelo método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS), como proposto por 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 adicionou-se 8,0 mL de água destilada e a leitura da absorbância foi feita a 540 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em mg de açúcar redutor/mL com curvas padrão de xilose ou glicose, a partir das quais obteve-se as equações:

$$\text{xilose (mg/mL)} = \frac{(\text{Absorbância a 540 nm}) + 0,034}{1,36} \quad (R^2 = 0,997)$$

$$\text{glicose (mg/mL)} = \frac{(\text{Absorbância a 540 nm}) + 0,047}{0,97} \quad (R^2 = 0,996)$$

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 100 µL da fase vapor e injetados no cromatógrafo. O cromatógrafo gasoso (HP 5890) foi equipado com um detector de ionização de chama, um injetor split/splitless e com uma coluna capilar FFAP (polietileno glicol) de 30 metros de comprimento, 0,22 mm de diâmetro e 0,3 µm de espessura de filme, a injeção foi no modo split (1:20) com fluxo do gás de arraste de 1 mL/min. As temperaturas dos blocos de injeção e detecção foi de 250°C. A quantificação foi realizada com curva de calibração construída a partir de análises de soluções etanol : água em diferentes proporções.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento de cepas de leveduras

As coletas foram realizadas em áreas urbanas (como praças, jardins, canteiros e terrenos baldios) da cidade de São José do Rio Preto-SP. Foram isoladas 20 cepas de leveduras, coletadas de flores, folhas e frutos, em decomposição ou não. Coletas de materiais do tipo silagens e serrapilheiras também foram feitas, porém, não houve crescimento de leveduras a partir dessas amostras. A Tabela 1 apresenta as cepas isoladas e a fonte, bem como a identificação em níveis de gênero ou espécie.

Tabela 1: Cepas de leveduras isoladas (identificação e origem)

Designação das cepas	Identificação*	Material Coletado
G1.1	<i>Pichia kluyveri</i>	fruto (Anarcadiaceae)
G1.2	<i>Pichia guilliermondii</i>	fruto (Anarcadiaceae)
G1.3	<i>Hanseniaspora sp.</i>	fruto (Anarcadiaceae)
G2	<i>Hanseniaspora sp.</i>	flor (Leguminosae)
G4.1	<i>Hanseniaspora sp.</i>	fruto (Rosaceae)
G4.2	<i>Pichia guilliermondii</i>	fruto (Rosaceae)
G7.1	<i>Hanseniaspora sp.</i>	flor (Euphorbiaceae)
G7.2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	flor (Euphorbiaceae)
G9.1	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	flor (Bignoniaceae)
G10.1	<i>Candida oleophila</i>	folha (Asteraceae)
G10.2	<i>Rhodotorula sp.</i>	folha (Asteraceae)
G11.1	<i>Hanseniaspora sp.</i>	flor (Plantaginaceae)
G11.2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	flor (Plantaginaceae)
G13	<i>Hanseniaspora sp.</i>	fruto (Rutaceae)
G14	<i>Hanseniaspora sp.</i>	inflorescência (Myrtaceae)
G15	<i>Hanseniaspora sp.</i>	fruto (Malpighiaceae)
G17	<i>Hanseniaspora sp.</i>	inflorescência (Rubiaceae)
G18	<i>Metschnikowia koreensis</i>	flor (Amaryllidaceae)
G19	<i>Aureobasidium pullulans</i>	flor (Nyctaginaceae)
G20	<i>Issatchenkia terricola</i>	fruto (Myrtaceae)

*Sequenciamento dos domínios D1/D2 do rDNA e identificação baseada em resultados de BLASTn (mínimo de 98% de similaridade, com referência em sequências homólogas do GenBank)

O sequenciamento e BLAST das cepas G1.3, G2, G4.1, G7.1, G11.1, G13, G14, G15 e G17, não permitiram chegar à identificação em nível de espécie, são do gênero *Hanseniaspora*. A levedura G10.2 também foi identificada apenas em nível de gênero, como *Rhodotorula sp.*

Segundo Fernandes (2008), as populações mais densas de leveduras em ambientes naturais estão normalmente associadas a substratos que contêm açúcares e outras fontes de carbono rapidamente assimiláveis (flores, frutos, exsudados de árvores, etc.) e as espécies *Hanseniaspora uvarum*, o seu estado anamórfico *Kloeckera apiculata* e *Metshnikowia spp.* são frequentemente isoladas a partir de flores e frutos. Estas informações corroboram os resultados deste trabalho, pois as cepas de levedura isoladas foram oriundas, em quase sua totalidade, de fontes que correspondem a flores e frutos, além disso, os resultados do processo de identificação mostram uma alta frequência do gênero *Hanseniaspora*, além da ocorrência de uma estirpe de *Metshnikowia*.

As espécies *A. pullulans*, *C. oleophila*, *H. uvarum*, *I. terricola*, *M. koreensis*, *P. guilliermondii*, *P. kluyvery*, *R. mucilaginosa*, *R. minuta*, *R. pallida* e *R. glutinis*, entre outras espécies do gênero *Rhodotorula* podem ser encontradas na literatura com resultados positivos referentes à assimilação de glicose e xilose. Além disso, espécies ou gêneros encontrados nesse trabalho, como *A. pullulans*, *C. didensi*, *C. shehatae*, *C. utilis*, *I. terricola*, *I. orientalis*, *M. bicuspidata*, *M. chrysoperlae*, *M. zobellii*, *P. guilliermondii*, *P. stipitis*, *R. minuta*, *R. mucilaginosa* e *R. pallida*, são mencionadas na literatura como capazes de produzir etanol a partir de xilose (GONG et al, 1981; TOIVOLA et al, 1984; NIGAM et al, 1985; KURTZMAN; FELL, 1998; SREENATH; JEFRIES, 2000; HONG et al, 2001; BHADRA et al, 2008; FERNANDES, 2008; RAO; BHADRA; SHIVAJI, 2008).

5.2. Avaliação da assimilação de xilose e glicose pelas cepas de leveduras

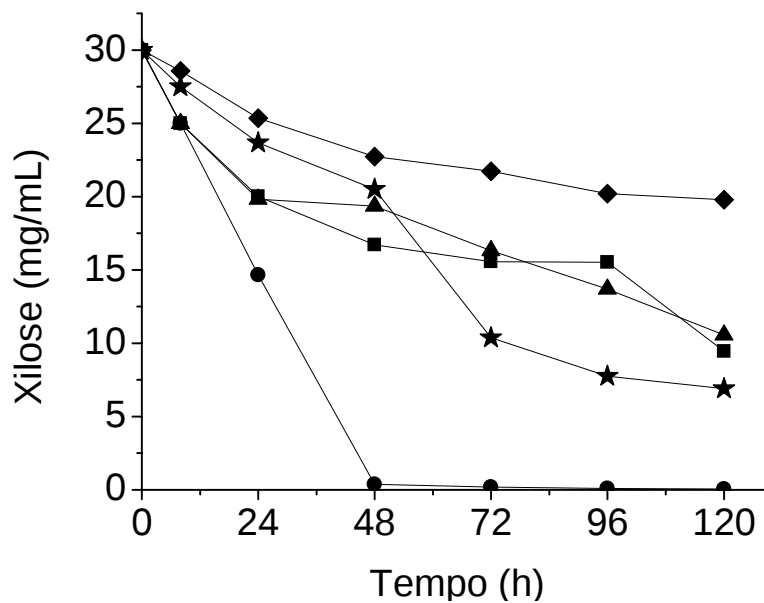
As Figuras 4, 5, 6, 7 e 8 apresentam as curvas do consumo de xilose do meio de cultura das cepas. Das 25 cepas de leveduras analisadas, 21 consumiram xilose e apenas quatro (*T. multisporon* 1A10 (Figura 8); *Hanseniaspora* sp. G15 e G17 (Figura 7); *I. terricola* G20 (Figura 7)) apresentaram baixo consumo desse açúcar. As melhores assimiladoras de xilose foram *Candida shehatae* BR6-2AY e BR6-2AI (Figura 8), que utilizaram toda a xilose em 24h de cultivo, seguidas de *P. ofunaensis* 1A14 (Figura 8) e *P. guilliermondii* G1.2 (Figura 4), que levaram 48h para exaurir a xilose do meio. *P. guilliermondii* G4.2 (Figura 5) consumiu todo o açúcar em 72h e *M. koreensis* G18 (Figura 7) assimilou a xilose em 120h de cultivo.

As cepas *R. mucilaginosa* G7.2 (Figura 5), *T. laibachii* (Figura 8), *Rhodotorula* sp. G10.2 (Figura 6) e *Hanseniaspora* sp. G4.1 e G7.1 (Figura 4) utilizaram entre 78% e 98% da xilose em 120h, enquanto o restante das cepas apresentou um consumo mediano (entre 25 e 70 %).

Comparando as curvas de crescimento celular com as de consumo de xilose percebe-se que, na maior parte, as cepas que apresentaram maior assimilação de xilose também apresentaram maior crescimento celular, no entanto aquelas que apresentaram um rápido consumo do açúcar, como as cepas de *C. shehatae* (Figura 8), apresentaram um menor crescimento. Esse dado sugere que esse açúcar não foi totalmente direcionado para o crescimento celular, possivelmente, tenha ocorrido a produção de algum metabólito secretável. As leveduras que apresentaram maior crescimento foram *T. laibachii* 1A8 (Figura 8) que não consumiu toda a xilose em 120h e *R. mucilaginosa* G7.2 (Figura 5) que levou 120h para exaurir a xilose do meio.

A Tabela 2 apresenta um resumo do consumo de xilose e crescimento celular realizado pelas cepas.

a)



b)

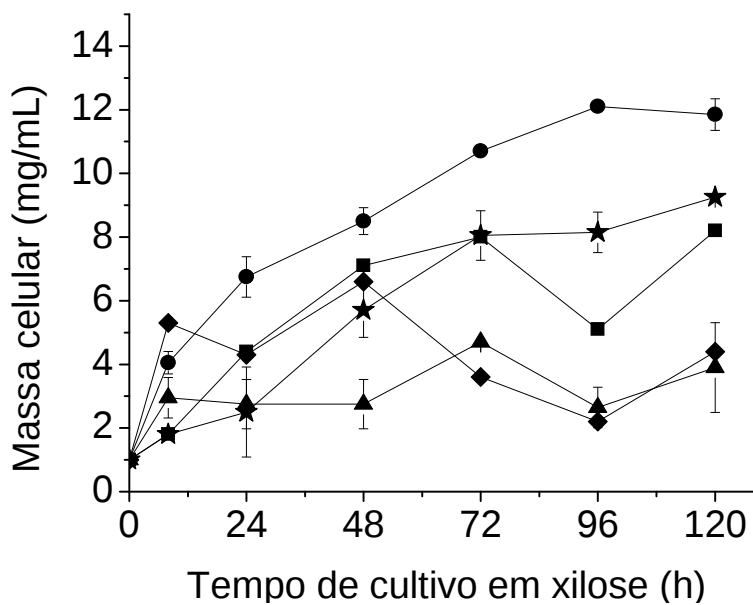
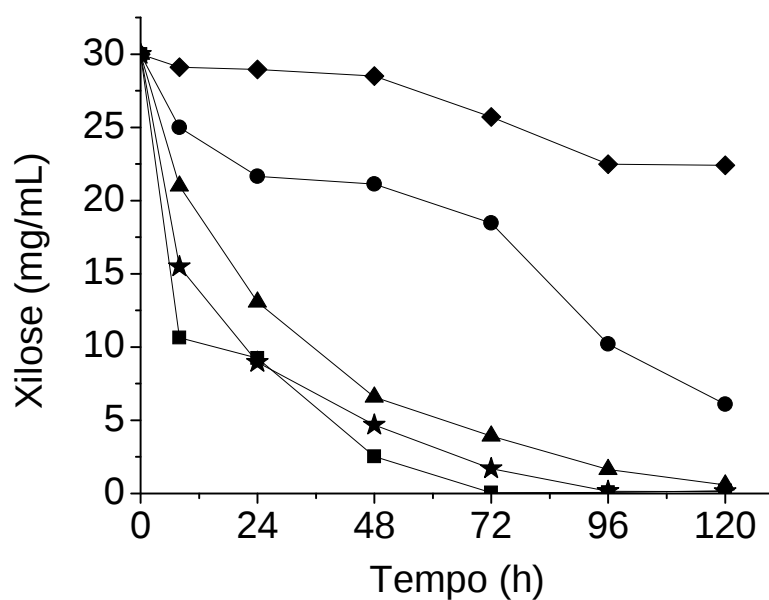


Figura 4: Assimilação de xilose (a) e crescimento celular (b) pelas cepas *P. kluyveri* G1.1 (■), *P. guilliermondii* G1.2 (●), *Hanseniaspora* sp. G1.3 (▲), *Hanseniaspora* sp. G2 (◆) e *Hanseniaspora* sp. G4.1 (★) em experimento realizado em meio basal contendo xilose a 30 g/L, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, com inóculo inicial de 1 g/L.

a)



b)

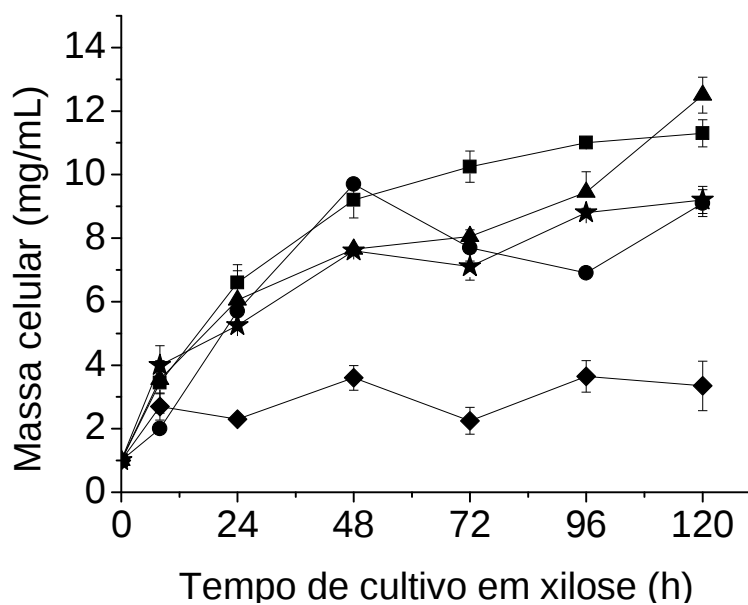
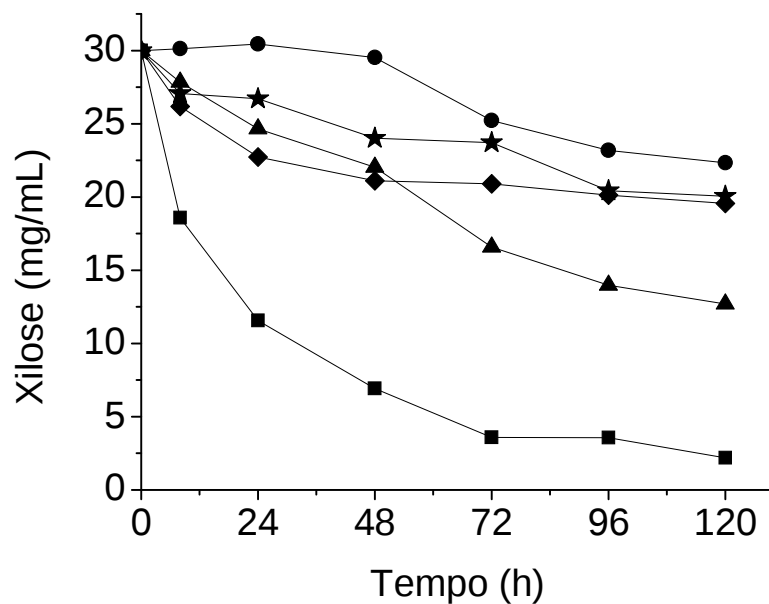


Figura 5: Assimilação de xilose (a) e crescimento celular (b) pelas cepas *P. guilliermondii* G4.2 (-■-), *Hanseniaspora* sp.G7.1 (-●-), *R. mucilaginosa* G7.2 (-▲-), *H. guilliermondii* G9.1 (-◆-) e *Candida oleophila* G10.1 (-★-) em experimento realizado em meio basal contendo xilose a 30 g/L, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, com inóculo inicial de 1 g/L.

a)



b)

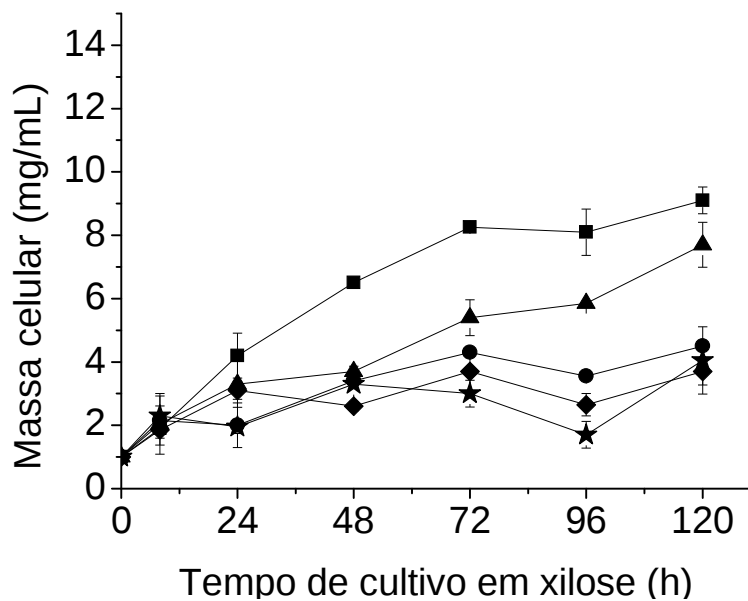
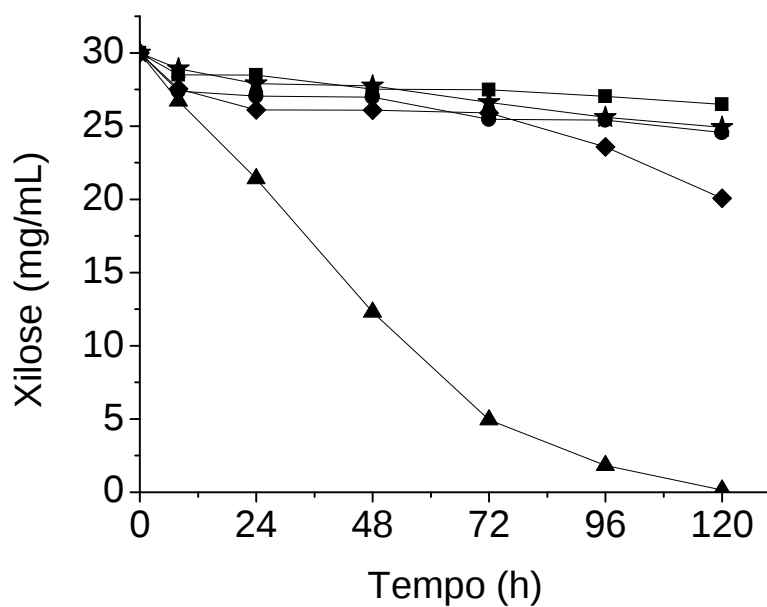


Figura 6: Assimilação de xilose (a) e crescimento celular (b) pelas cepas *Rhodotorula* sp. G10.2 (-■-), *Hanseniaspora* sp. G11.1 (-●-), *R. mucilaginosa* G11.2 (-▲-), *Hanseniaspora* sp. G13 (-◆-) e *Hanseniaspora* sp. G14 (-★-) em experimento realizado em meio basal contendo xilose a 30 g/L, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, com inóculo inicial de 1 g/L.

a)



b)

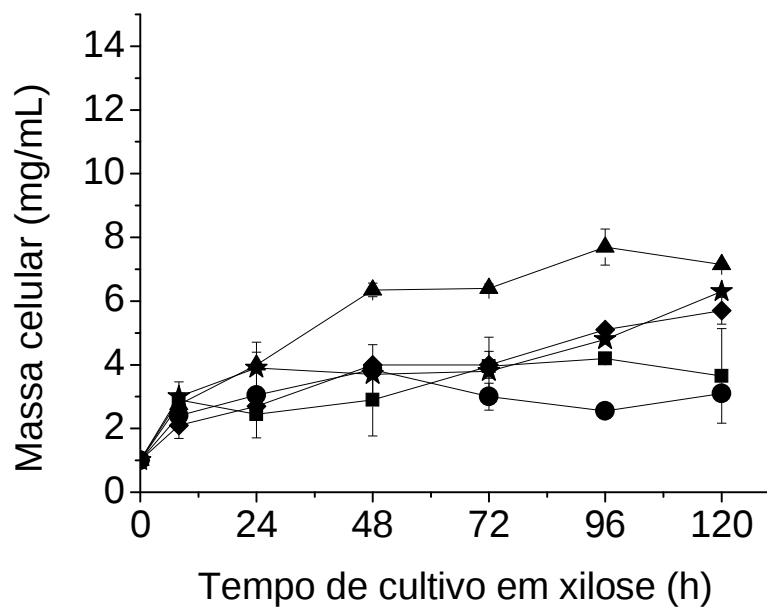
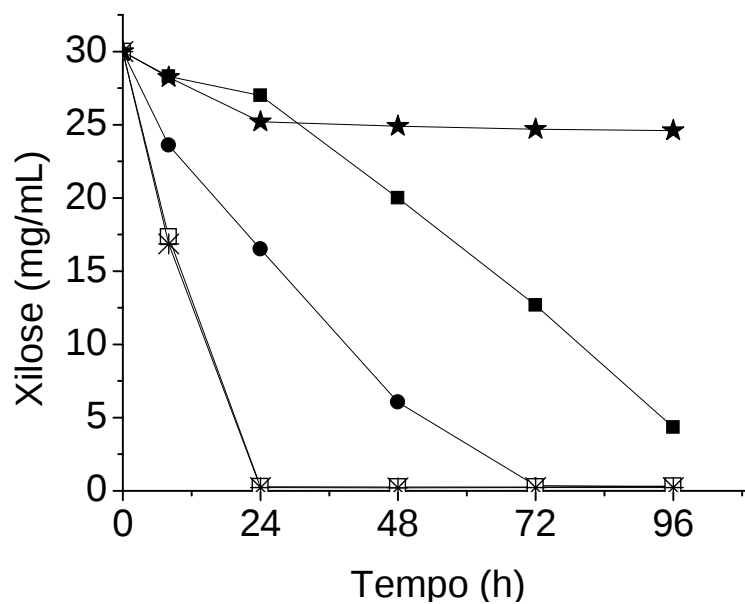


Figura 7: Assimilação de xilose (a) e crescimento celular (b) pelas cepas *Hanseniaspora* sp. G15 (■-), *Hanseniaspora* sp G17 (●-), *M. koreensis* G18 (-▲-), *A. pullulans* G19 (-◆-) e *I. terricola* G20 (-★-) em experimento realizado em meio basal contendo xilose a 30 g/L, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, com inóculo inicial de 1 g/L.

a)



b)

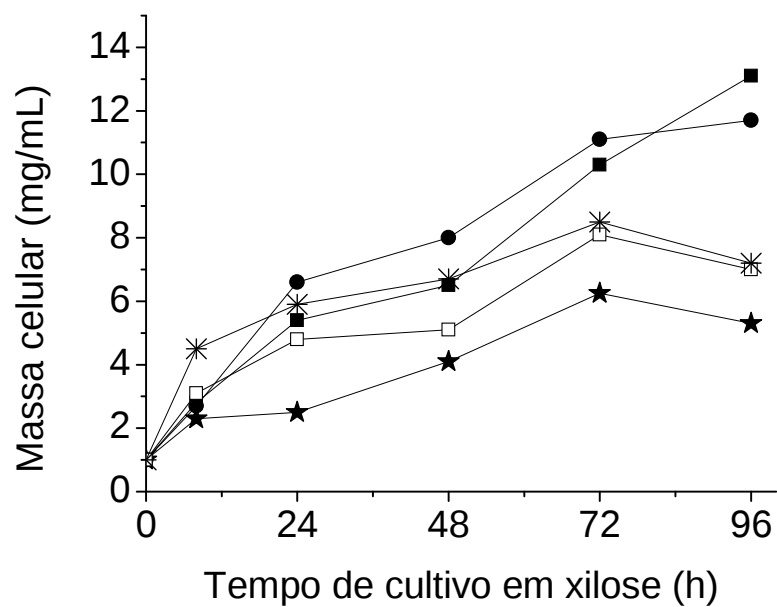


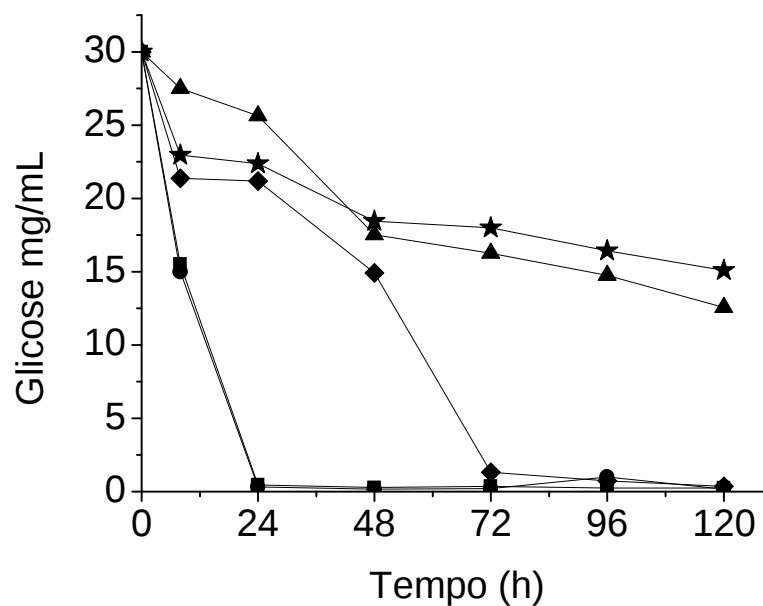
Figura 8: Assimilação de xilose (a) e crescimento celular (b) pelas cepas *T. laibachii* 1A8 (-■-), *P. ofunaensis* 1A14 (-●-), *C. shehatae* BR6-2AY (-□-), *C. shehatae* BR6-2AI(-*-) e *T. multisporon* 1A10 (-★-) em experimento realizado em meio basal contendo xilose a 30 g/L, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, com inóculo inicial de 1 g/L.

Tabela 2: Consumo de xilose e crescimento das cepas em experimento realizado em meio basal contendo xilose a 30 g/L, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, com inóculo inicial de 1 g/L.

Leveduras	Consumo máximo de Xilose		Produção máxima de massa celular		Rendimento de crescimento (g massa cel./g xil. consumida)
	(mg/mL)	Tempo	(mg/mL)	Tempo	
<i>P. kluyveri</i> G1.1	20,5	120h	7,2	120h	0,3
<i>P. guilliermondii</i> G1.2	30,0	72h	10,8	120h	0,3
<i>Hanseniaspora</i> sp. G1.3	19,4	120h	3,7	72h	0,2
<i>Hanseniaspora</i> sp. G2	10,2	120h	5,6	48h	0,5
<i>Hanseniaspora</i> sp. G4.1	23,0	120h	8,2	120h	0,3
<i>P. guilliermondii</i> G4.2	30,0	72h	10,6	120h	0,3
<i>Hanseniaspora</i> sp. G7.1	23,9	120h	8,1	120h	0,3
<i>R. mucilaginosa</i> G7.2	29,4	120h	11,5	120h	0,4
<i>H. guilliermondii</i> G9.1	7,6	120h	2,6	96h	0,3
<i>C. oleophila</i> G10.1	30,0	96h	8,2	120h	0,3
<i>Rhodotorula</i> sp. G10.2	27,8	120h	8,1	120h	0,3
<i>Hanseniaspora</i> sp. G11.1	7,6	120h	3,5	120h	0,5
<i>R. mucilaginosa</i> G11.2	17,3	120h	6,7	120h	0,4
<i>Hanseniaspora</i> sp. G13	10,4	120h	2,7	72h	0,2
<i>Hanseniaspora</i> sp. G14	9,9	120h	2,0	120h	0,2
<i>Hanseniaspora</i> sp. G15	3,5	120h	2,2	96h	0,6
<i>Hanseniaspora</i> sp. G17	5,4	120h	2,8	48h	0,5
<i>M. koreensis</i> G18	30,0	120h	6,7	96h	0,2
<i>A. pullulans</i> G19	9,9	120h	9,7	120h	0,9
<i>I. terricola</i> G20	5,1	120h	5,0	96h	0,9
<i>C. shehatae</i> BR6-2AY	30,0	24h	7,1	72h	0,2
<i>C. shehatae</i> BR6-2AI	30,0	24h	7,5	72h	0,2
<i>T. multisporon</i> 1A-10	5,4	120h	5,2	72h	0,9
<i>T. laibachii</i> 1A-8	25,6	96h	12,1	96h	0,4
<i>P. ofunaensis</i> 1A-14	30,0	72h	10,7	96h	0,3

As cepas isoladas também foram avaliadas com relação ao consumo de glicose para fins comparativos e esses dados estão mostrados nas Figuras 9, 10, 11 e 12. As leveduras *P. guilliermondii* G4.2 (Figura 10) e *M. koreensis* G18 (Figura 12) consumiram todo o açúcar em 24h de cultivo e as cepas *P. kluyveri* G1.1 (Figura 9), *P. guilliermondii* G1.2 (Figura 9), *C. oleophila* G10.1 (Figura 10) e *I. terricola* G20 (Figura 12) levaram 48h para assimilar toda a glicose do meio. *Hanseniaspora* sp. G11.1 (Figura 11) exauriu a glicose em 96h e *Hanseniaspora* sp. G2 (Figura 9) em 120h. Aquelas que apresentaram menor consumo foram as cepas de *Hanseniaspora* sp. G17 e G15 (ambas na Figura 12), que assimilaram cerca de 20%. As outras cepas apresentaram um consumo entre 40 e 90% durante as 120h de cultivo em glicose.

a)



b)

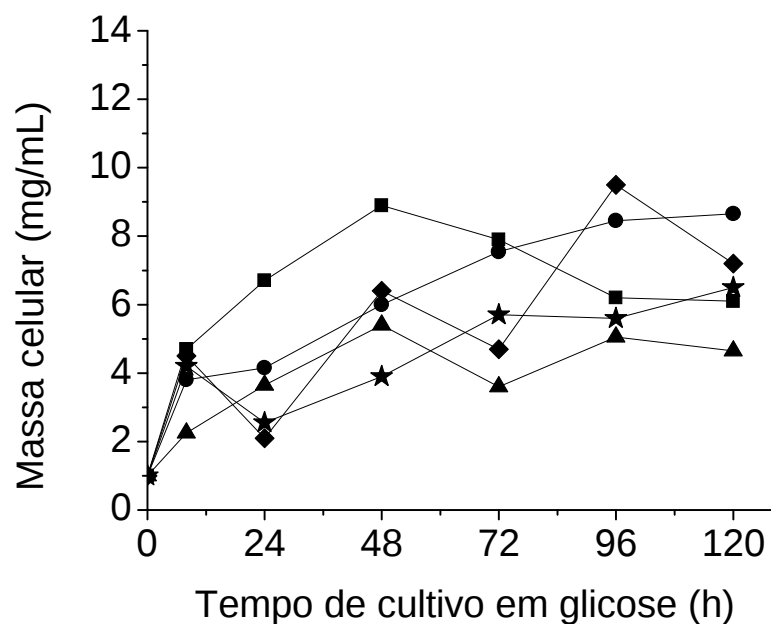
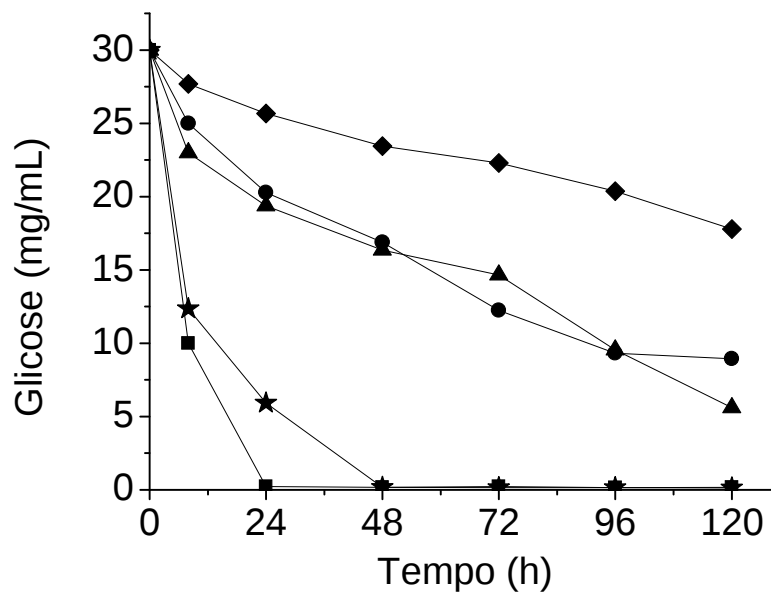


Figura 9: Assimilação de glicose (a) e crescimento celular (b) pelas cepas *P. kluyveri* G1.1 (-■-), *P. guilliermondii* G1.2 (-●-), *Hanseniaspora* sp. G1.3 (-▲-), *Hanseniaspora* sp. G2 (-◆-) e *Hanseniaspora* sp. G4.1 (-★-) em experimento realizado em meio basal contendo glicose a 30 g/L, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, com inóculo inicial de 1 g/L.

a)



b)

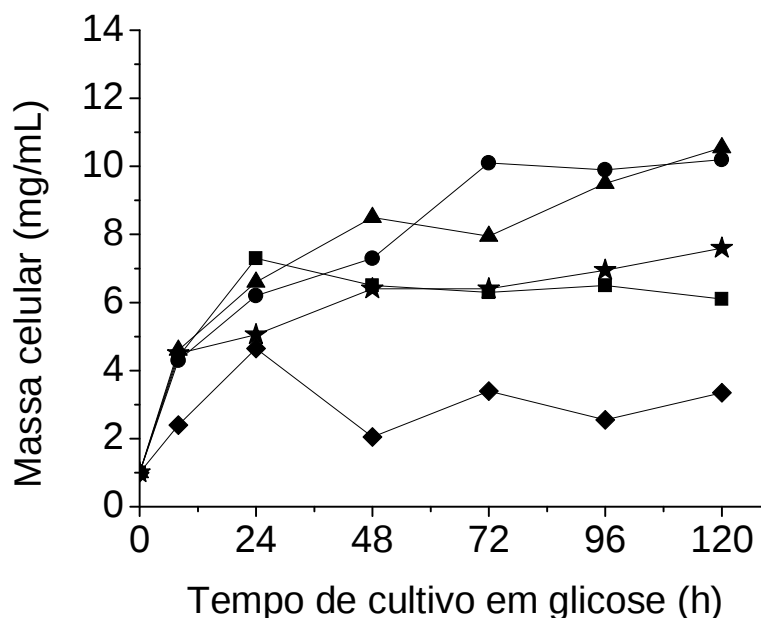
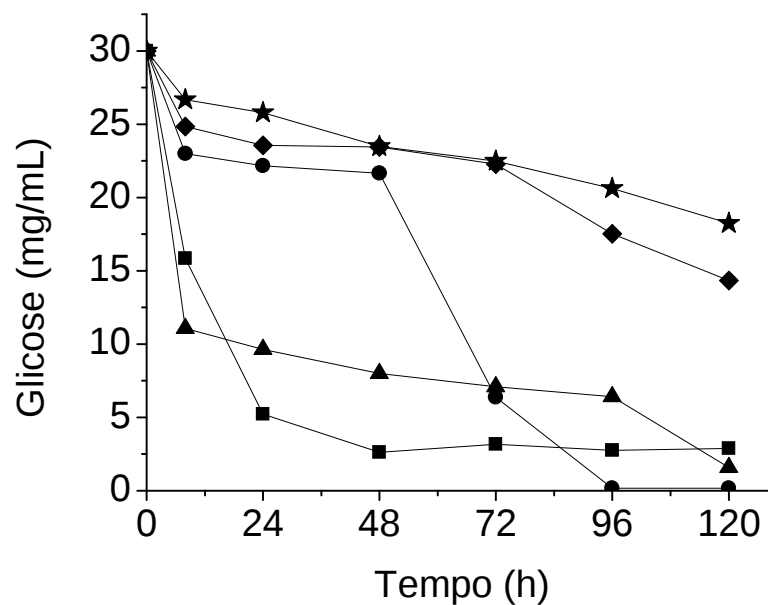


Figura 10: Assimilação de glicose (a) e crescimento celular (b) pelas cepas *P. guilliermondii* G4.2 (-■-), *Hanseniaspora* sp.G7.1 (-●-), *R. mucilaginosa* G7.2 (-▲-), *H. guilliermondii* G9.1 (-◆-) e *Candida oleophila* G10.1 (-★-) em experimento realizado em meio basal contendo glicose a 30 g/L, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, com inóculo inicial de 1 g/L.

a)



b)

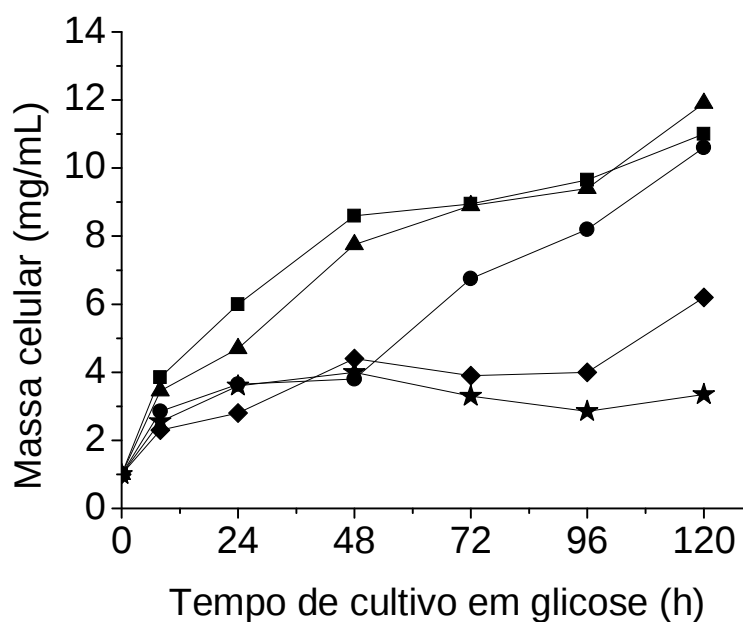
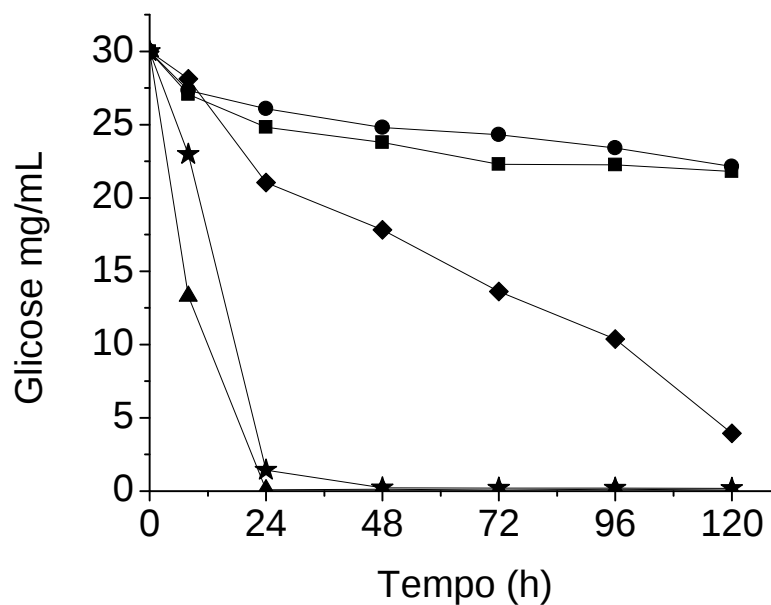


Figura 11: Assimilação de glicose (a) e crescimento celular (b) pelas cepas *Rhodotorula* sp. G10.2 (-■-), *Hanseniaspora* sp. G11.1 (-●-), *R. mucilaginosa* G11.2 (-▲-), *Hanseniaspora* sp. G13 (-◆-) e *Hanseniaspora* sp. G14 (-★-) em experimento realizado em meio basal contendo glicose a 30 g/L, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, com inóculo inicial de 1 g/L.

a)



b)

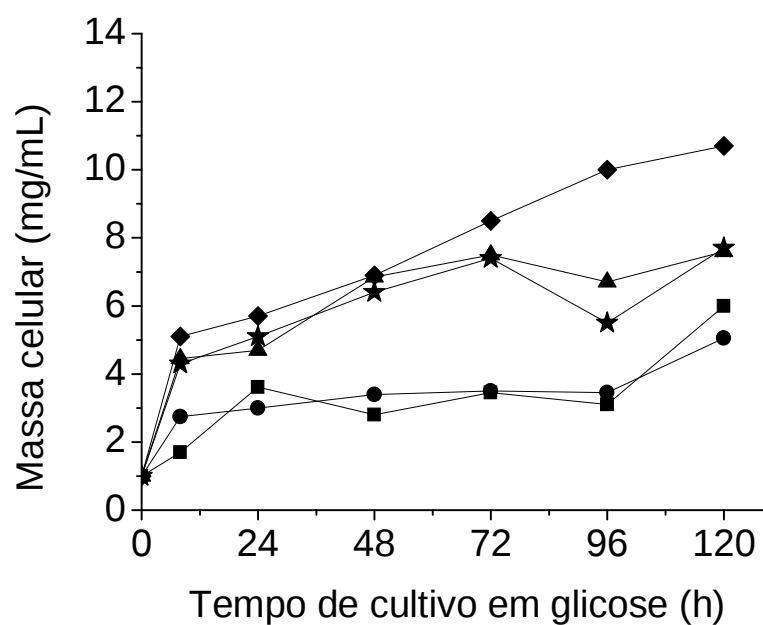


Figura 12: Assimilação de glicose (a) e crescimento celular (b) pelas cepas *Hanseniaspora* sp. G15 (-■-), *Hanseniaspora* sp G17 (-●-), *M. koreensis* G18 (-▲-), *A. pullulans* G19 (-◆-) e *I. terricola* G20(-★-) em experimento realizado em meio basal contendo glicose a 30 g/L, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, com inóculo inicial de 1 g/L.

A levedura que mais cresceu foi *R. mucilaginosa* G11.2, que atingiu 10,9 mg/mL de massa celular, seguida por *Rhodotorula* sp. G10.2 (Figura 11) com 10,0 mg/mL. *Hanseniaspora* sp. G1.3 e G17 e *H. guilliermondii* G9.1 atingiram cerca de 4 mg/mL e as que menos cresceram foram as cepas de *Hanseniaspora* sp. G14 (Figura 11) e G15 (Figura 12) ambas com 2,6 mg/mL. As outras cepas apresentaram crescimento entre 5 e 9 mg/mL.

A Tabela 3 mostra um resumo do consumo e crescimento das cepas durante os cultivos em glicose. Comparando os dados observa-se que as leveduras que consumiram mais rapidamente o açúcar (*P. guilliermondii* G4.2 e *M. koreensis* G18) tiveram um crescimento de cerca de 6 mg/mL, enquanto *R. mucilaginosa* G11.2, a que mais cresceu teve um consumo de 98% em 120h. De um modo geral, aquelas que consumiram acima de 70% do açúcar tiveram crescimento acima de 5 mg/mL e as que consumiram até cerca de 40% apresentaram os menores valores de crescimento celular.

Tabela 3: Consumo de glicose e crescimento das cepas em experimento realizado em meio basal contendo glicose a 30 g/L, temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm, com inóculo inicial de 1g/L.

Leveduras	Consumo máximo de Glicose		Produção máxima de massa celular		Rendimentos de crescimento (g massa cel./g de glicose consumida)
	(mg/mL)	Tempo	(mg/mL)	Tempo	
<i>P. kluyveri</i> G1.1	30,0	48h	7,9	48h	0,3
<i>P. guilliermondii</i> G1.2	30,0	48h	7,6	120h	0,2
<i>Hanseniaspora</i> sp. G1.3	17,4	120h	4,4	48h	0,2
<i>Hanseniaspora</i> sp. G2	30,0	120h	8,5	96h	0,3
<i>Hanseniaspora</i> sp. G4.1	14,9	120h	5,8	120h	0,4
<i>P. guilliermondii</i> G4.2	30,0	24h	6,3	24h	0,2
<i>Hanseniaspora</i> sp. G7.1	21,1	120h	9,2	120h	0,4
<i>R. mucilaginosa</i> G7.2	24,4	120h	9,5	120h	0,4
<i>H. guilliermondii</i> G9.1	12,2	120h	3,6	24h	0,3
<i>C. oleophila</i> G10.1	30,0	48h	6,6	120h	0,2
<i>Rhodotorula</i> sp. G10.2	27,1	120h	10,0	120h	0,4
<i>Hanseniaspora</i> sp. G11.1	30,0	96h	10,6	120h	0,3
<i>R. mucilaginosa</i> G11.2	29,4	120h	10,9	120h	0,4
<i>Hanseniaspora</i> sp. G13	15,6	120h	5,2	120h	0,3
<i>Hanseniaspora</i> sp. G14	11,7	120h	2,6	24h	0,2
<i>Hanseniaspora</i> sp. G15	8,1	120h	2,6	24h	0,3
<i>Hanseniaspora</i> sp. G17	7,8	120h	4,0	120h	0,5
<i>M. koreensis</i> G18	30,0	24h	6,6	120h	0,2
<i>A. pullulans</i> G19	26,0	120h	9,0	96h	0,3
<i>I. terricola</i> G20	30,0	48h	8,4	48h	0,2

Na Tabela 4 observamos uma comparação entre os consumos de xilose e glicose das cepas. As leveduras que consumiram bem tanto xilose quanto glicose foram *Pichia guilliermondii* G1.2 e G4.2, *Candida oleophila* G10.1, e *Metschnikowia koreensis* G18 (Tabelas 2 e 3). As leveduras de *Hanseniaspora sp.* G1.3 e G7.1, bem como *Rhodotorula sp.* G10.2 também apresentaram consumo parecido de xilose e glicose, porém foi um consumo mediano (entre 50 e 90%). As cepas de *Hanseniaspora sp.* G4.1 e G17 e a cepa *Rhodotorula mucilaginosa* G7.2 alcançaram maior consumo de xilose do que de glicose, por outro lado, *Pichia kluyveri* G1.1, *Hanseniaspora sp.* G2 e G11.1, *R. mucilaginosa* G11.2, *Aureobasidium pullulans* G19 e *Issatchenkia terricola* G20 assimilaram mais glicose do que xilose. As cepas de *Hanseniaspora sp.* G9.1, G13, G14, G15 e G17 foram fracas assimiladoras tanto de xilose quanto de glicose, indicando que as condições experimentais para essas cepas devem ser revistas.

Tabela 4: Comparação entre os consumos de xilose e glicose

Leveduras	Consumo máximo de Xilose		Consumo máximo de glicose	
	(%)	Tempo	(%)	Tempo
<i>P. kluyveri</i> G1.1	68	120h	100	48h
<i>P. guilliermondii</i> G1.2	100	72h	100	48h
<i>Hanseniaspora sp.</i> G1.3	64	120h	58	120h
<i>Hanseniaspora sp.</i> G2	34	120h	100	120h
<i>Hanseniaspora sp.</i> G4.1	78	120h	49	120h
<i>P. guilliermondii</i> G4.2	100	72h	100	24h
<i>Hanseniaspora sp.</i> G7.1	79	120h	70	120h
<i>R. mucilaginosa</i> G7.2	98	120h	81	120h
<i>H. guilliermondii</i> G9.1	25	120h	40	120h
<i>C. oleophila</i> G10.1	100	96h	100	48h
<i>Rhodotorula sp.</i> G10.2	92	120h	90	120h
<i>Hanseniaspora sp.</i> G11.1	25	120h	100	96h
<i>R. mucilaginosa</i> G11.2	57	120h	98	120h
<i>Hanseniaspora sp.</i> G13	34	120h	52	120h
<i>Hanseniaspora sp.</i> G14	33	120h	39	120h
<i>Hanseniaspora sp.</i> G15	11	120h	27	120h
<i>Hanseniaspora sp.</i> G17	18	120h	26	120h
<i>M. koreensis</i> G18	100	120h	100	24h
<i>A. pullulans</i> G19	33	120h	86	120h
<i>I. terricola</i> G20	16	120h	100	48h

Muitas espécies pertencentes aos gêneros *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* são facilmente encontrados na literatura como assimiladoras de xilose e glicose (GONG et al, 1981; TOIVOLA et al, 1984; KURTZMAN; FELL, 1998; RAO; BHADRA; SHIVAJI, 2008).

A espécie “yest-like fungi” *A. pullulans* é definida como assimiladora de glicose e xilose, porém não fermenta glicose. Além disso, é mencionada como responsável por alta atividade de xilanases (KURTZMAN; FELL, 1998; BHADRA et al, 2008).

O gênero *Hanseniaspora* e a espécie *Issatchenkia terricola* são fermentadores de glicose, mas existem informações variadas com relação à assimilação de xilose por essas leveduras (KURTZMAN; FELL, 1998; NIGAM et al, 1985; FERNANDES, 2008).

5.3. Avaliação da capacidade de fermentação alcoólica a partir de xilose.

A partir dos resultados dos experimentos de assimilação de xilose, as estirpes que melhor assimilaram o açúcar foram escolhidas para a realização de ensaios de fermentação alcoólica. As cepas selecionadas foram *C. shehatae* BR6-2AY e BR6-2AI, *P. ofunaensis* 1A-14, *P. guilliermondii* G1.2 e G4.2, *Hanseniaspora* sp. G4.1, *R. mucilaginosa* G7.2 e G11.2, *C. oleophila*, G10.1, *Rhodotorula* sp. G10.2 e *M. koreensis* G18. Esses primeiros testes de fermentação alcoólica foram realizados com a primeira metodologia descrita no item 4.7, no qual a fermentação ocorreu em tubos de penicilina.

Das cepas avaliadas apenas *C. shehatae* BR6-2AY e BR6-2AI, *P. guilliermondii* G1.2 e *Rhodotorula* sp. G10.2 apresentaram produção de etanol e as curvas do consumo de xilose, crescimento e produção de etanol destas cepas são mostradas na Figura 13. A estirpe *C. shehatae* BR6-2AI produziu 1,9 g de etanol/L de meio (Figura 13c), enquanto BR6-2AI apresentou a produção de 1,4 g/L. *Rhodotorula* sp. G10.2 gerou 1,3 g/L. A cepa *P. guilliermondii* G1.2 foi a que demonstrou menor produção de etanol (0,63 g/L).

Durante esses primeiros testes de fermentação anaeróbia (ensaio de fermentação alcoólica) as cepas apresentaram um consumo de açúcar menor do que durante a fermentação aeróbia (ensaio de assimilação). Durante as 120h de fermentação, as cepas *C. shehatae* BR6-2AY e BR6-2AI consumiram 28 e 33% da xilose, respectivamente (Figura 13a). *P. guilliermondii* G1.2 foi a que menos consumiu o açúcar, apenas 15% e *Rhodotorula sp.* G10.2 consumiu 20 %.

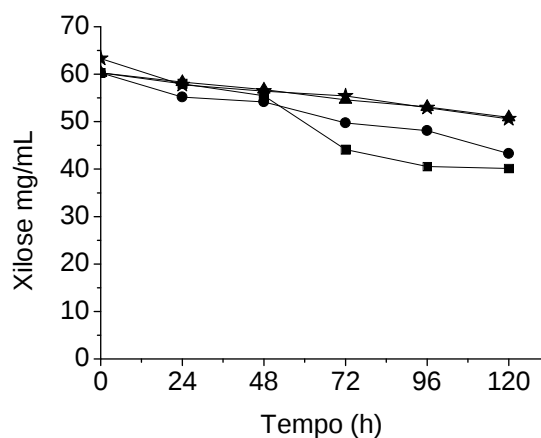
Com relação ao crescimento (Figura 13b), a que alcançou maior desenvolvimento de massa celular foi *P. guilliermondii* G1.2 (13,4 mg/mL), seguida de *C. shehatae* BR6-2AY e BR6-2AI, com cerca de 10 mg/mL de massa celular. *Rhodotorula sp.* G10.2 foi a que apresentou menor crescimento celular, atingiu 8,45 mg/mL de massa celular.

A cepa *P. guilliermondii* G1.2 alcançou maior rendimento tanto para etanol quanto para crescimento e a levedura *C. shehatae* BR6-2AI atingiu o menor valor de rendimento também para etanol e crescimento. O pico de rendimento de etanol das cepas de *C. shehatae* aconteceu em 48h de fermentação, para *P. guilliermondii* G1.2 o pico foi em 24h e para *Rhodotorula sp.* G10.2 o pico de rendimento ocorreu mais tarde, em 72h de cultivo.

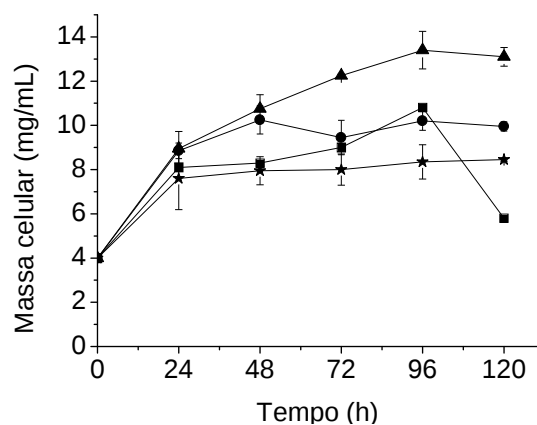
Os dados da Tabela 5 mostram uma clara correlação entre os parâmetros produção de etanol, consumo de xilose e produção de biomassa. A levedura *C. shehatae* BR6-2AY chegou a transformar 17% do açúcar consumido em etanol e apresentou crescimento razoável, enquanto a cepa BR6-2AI chegou a um máximo de 9%. *P. guilliermondii* G1.2 atingiu 22% de transformação de xilose em etanol e maior crescimento observado, já *Rhodotorula sp.* G10.2 alcançou um máximo de 12%.

As quatro cepas tiveram os maiores rendimentos de crescimento nas primeiras 24h de fermentação, após isso, o rendimento de crescimento caiu para todas, talvez devido à diminuição do oxigênio que pudesse estar presente no meio.

a)



b)



c)

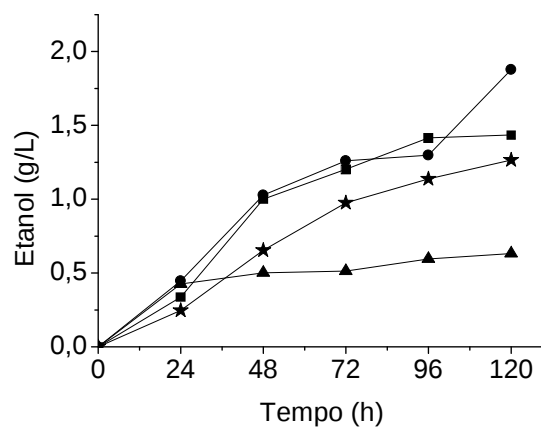


Figura 13: Assimilação de xilose (a), crescimento celular (b) e produção de etanol (c) pelas cepas *C. shehatae* BR6-2AI (-■-) e BR6-2AY (-●-), *P. guilliermondii* G1.2 (-▲-) e *Rhodotorula* sp. G10.2 (-★-) durante os primeiros ensaios de fermentação alcoólica realizados em meio basal contendo xilose a 60 g/L, extrato de levedura a 10 g/L, inóculo inicial a 4 g/L e temperatura de 30°C, sem agitação.

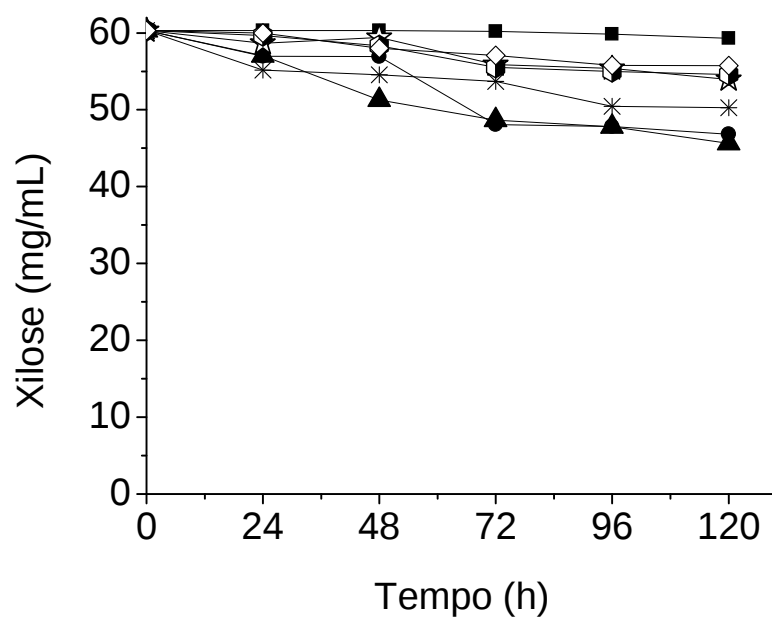
Tabela 5: Consumo de xilose, produção de etanol e rendimento de etanol por xilose consumida durante os ensaios de fermentação alcoólica realizados em meio basal contendo xilose a 60 g/L, extrato de levedura a 10 g/L, inóculo inicial a 4 g/L e temperatura de 30°C, sem agitação.

Cepas	Tempo de amostragem (h)	Xilose consumida (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimento etanol (g etanol/g xilose consumida)	Rendimento crescimento (g massa celular/g xilose consumida)
<i>C. shehatae</i> BR6-2AY	24	5,1	0,5	0,09	0,9
	48	6,1	1,0	0,17	1,0
	72	10,6	1,3	0,12	0,5
	96	12,2	1,3	0,11	0,5
	120	17,0	1,8	0,11	0,3
<i>C. shehatae</i> BR6-2AI	24	9,1	0,3	0,04	0,4
	48	11,6	1,0	0,09	0,3
	72	22,9	1,2	0,05	0,2
	96	26,5	1,4	0,05	0,2
	120	26,9	1,4	0,05	0,1
<i>P. guilliermondii</i> G1.2	24	1,9	0,4	0,22	2,5
	48	3,5	0,5	0,14	1,9
	72	5,7	0,5	0,09	1,4
	96	7,2	0,6	0,08	1,3
	120	9,3	0,6	0,07	0,9
<i>Rhodotorula sp.</i> G10.2	24	5,5	0,2	0,04	0,6
	48	6,8	0,6	0,10	0,5
	72	7,8	0,9	0,12	0,5
	96	10,3	1,1	0,11	0,4
	120	12,7	1,2	0,10	0,3

A Figura 14 apresenta as curvas de assimilação de xilose e crescimento celular realizado pelas cepas que não produziram etanol durante os ensaios de fermentação alcoólica. Apesar de não gerar etanol as leveduras consumiram xilose, a cepa *Pichia guilliermondii* G4.2 foi a que mais assimilou o açúcar do meio (24%), seguida de *Hanseniaspora sp.* G4.1 (22%) e *Candida oleophila* G10.1 (18%).

As cepas de *Rhodotorula mucilaginosa* G7.2 e G11.2 consumiram cerca de 10% da xilose, já *Metschnikowia koreensis* G18 e *Pichia ofunaensis* 1A-14 foram as que menos assimilaram xilose, 4 e 1% respectivamente.

a)



b)

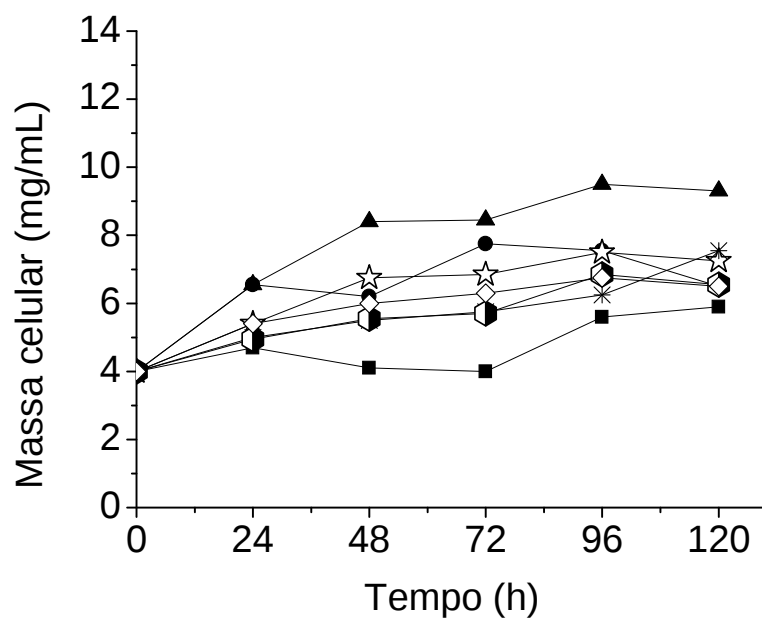


Figura 14: Consumo de xilose (a) e crescimento celular (b) de *Pichia ofunaensis* 1A-14 (—■—), *Hanseniaspora* sp. G4.1 (—●—), *Pichia guilliermondii* G4.2 (—▲—), *Rhodotorula mucilaginosa* G7.2 (—☆—), *Candida oleophila* G10.1 (—✱—), *Rhodotorula mucilaginosa* G11.2 (—◐—) e *Metschnikowia koreensis* G18 (—◊—) durante os ensaios de fermentação alcoólica realizados em meio basal contendo xilose a 60 g/L, extrato de levedura a 10 g/L, inóculo inicial a 4 g/L e temperatura de 30°C, sem agitação (estas cepas não apresentaram produção de etanol).

O crescimento foi proporcional ao consumo, ou seja, as cepas que consumiram mais também cresceram mais, sendo assim, *Pichia guilliermondii* G4.2 foi a que mais se desenvolveu (9,5 mg/mL) e *Pichia ofunaensis* 1A-14 a que alcançou menor valor de massa celular (5,9 mg/mL).

As cepas não produtoras etanol que mais assimilaram a xilose apresentaram um consumo semelhante ao das que produziram etanol, além disso, os rendimentos de crescimento encontrados entre as cepas que produziram e não produziram etanol são próximos, ao redor de 0,3-1,9 g/g. Talvez essas cepas tenham gerado produtos secundários que não foram quantificados neste trabalho, como xilitol, glicerol e ácido acético, ou talvez as leveduras realmente tenham utilizado o açúcar aerobicamente, resultando em desenvolvimento celular.

Nesse trabalho, as leveduras com capacidade de produzir etanol a partir de xilose são dos gêneros *Candida*, *Pichia* e *Rhodotorula*. Outros trabalhos podem ser encontrados na literatura mencionando leveduras fermentadoras de xilose pertencentes a esses mesmos gêneros, entretanto, espécies pertencentes a *Metschnikowia*, *Issatchenkia* e *Aureobasidium* também são mencionadas por sua habilidade de produzir etanol a partir de xilose (GONG et al, 1981; TOIVOLA et al, 1984; NIGAM et al, 1985; SREENATH; JEFFRIES, 2000; RAO; BHADRA; SHIVAJI, 2008). Nigam et al (1985) relatam cepas de *Aureobasidium pullulans* que produziram até 4 g/L de etanol a partir de meio contendo 2% de xilose e 0,5% de extrato de levedura, além de cepas de *Issatchenkia terricola* com produções abaixo de 1 g/L.

5.4. Avaliação das condições físico-químicas sobre crescimento das cepas isoladas

As condições físico-químicas do meio de crescimento das leveduras foram avaliadas para as cepas que apresentaram melhor consumo de xilose. Foram escolhidas as cepas que apresentaram acima de 50% de consumo da xilose em 120h de cultivo dos experimentos em

condições aeróbias com o açúcar (Tabela 2). Dessa forma, as cepas escolhidas foram *Pichia kluyveri* G1.1, *Pichia guilliermondii* G1.2, *Hanseniaspora sp.* G1.3, *Hanseniaspora sp.* G4.1, *Pichia guilliermondii* G4.2, *Hanseniaspora sp.* G7.1, *Rhodotorula mucilaginosa* G7.2, *Candida oleophila* G10.1, *Rhodotorula sp.* G10.2, *Rhodotorula mucilaginosa* G11.2, *Metschnikowia koreensis* G18. Além dessas cepas o experimento também foi feito com *Candida shehatae* BR6-2AY a fim de tentar melhorar as condições experimentais de fermentação alcoólica.

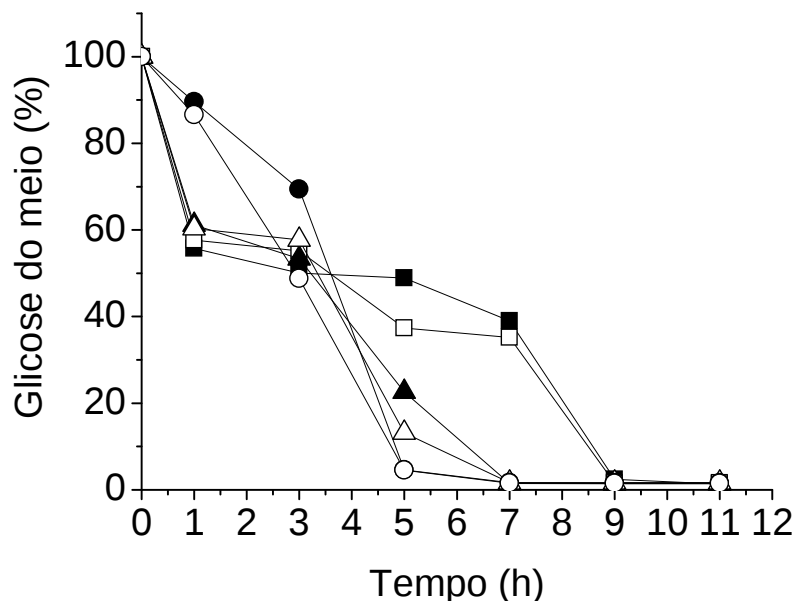
Os resultados desse experimento se encontram nas Figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 e 25 e 26 com as curvas de assimilação de açúcar e crescimento para cada levedura em cultivos de 28, 32 e 40°C e pH 4 e 5.

Quase todas as leveduras consumiram bem a glicose a 32°C e pH 5, com exceção à *Rhodotorula sp.* G10.2 (Figura 23), que mostrou preferência por pH 4 e às *Rhodotorula mucilaginosa* G7.2 (Figura 21) e G11.2 (Figura 24) que consumiram todo o açúcar apenas em temperatura de 40°C.

A levedura *Pichia kluyveri* G1.1 (Figura 15) consumiu bem a glicose em todas as temperaturas e pHs, mas mostrou preferência pela faixa de 32-40°C e pH 5, enquanto *Pichia guilliermondii* G1.2 (Figura 16) foi mais eficiente em 40°C e pH 5.

Hanseniaspora sp. G4.1 (Figura 18), *Candida oleophila* G10.1 (Figura 22) e *Metschnikowia koreensis* G18 (Figura 25) assimilaram melhor a glicose a 32°C e se mostraram indiferentes ao pH (4 a 5), além disso, *Hanseniaspora sp.* G4.1 e *Metschnikowia koreensis* G18 também consumiram bem o açúcar a 28°C. As cepas *Pichia guilliermondii* G4.2 (Figura 19) e *Rhodotorula mucilaginosa* G7.2 (Figura 21) e G11.2 (Figura 24) também se mostraram indiferentes ao pH, porém preferiram o cultivo a 40°C e *Pichia guilliermondii* G4.2 se mostrou eficaz também a 32°C.

a)



b)

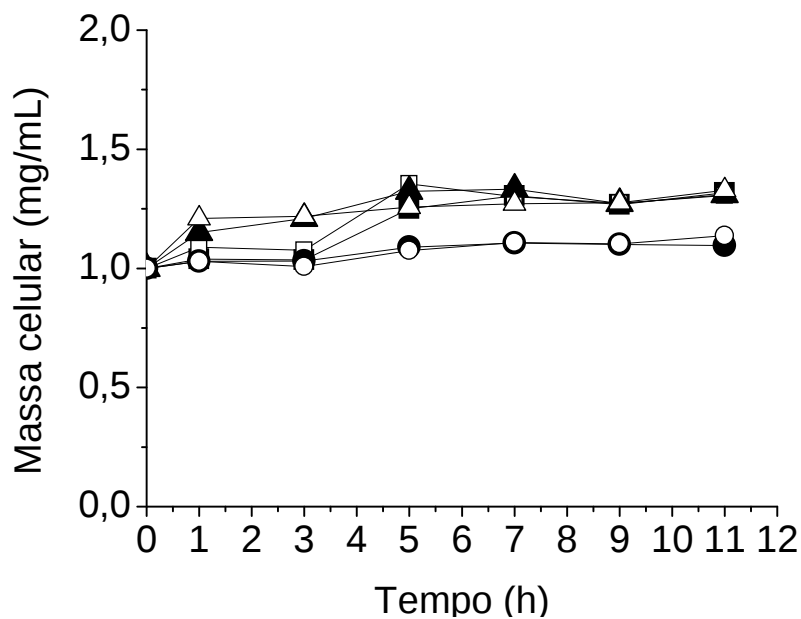
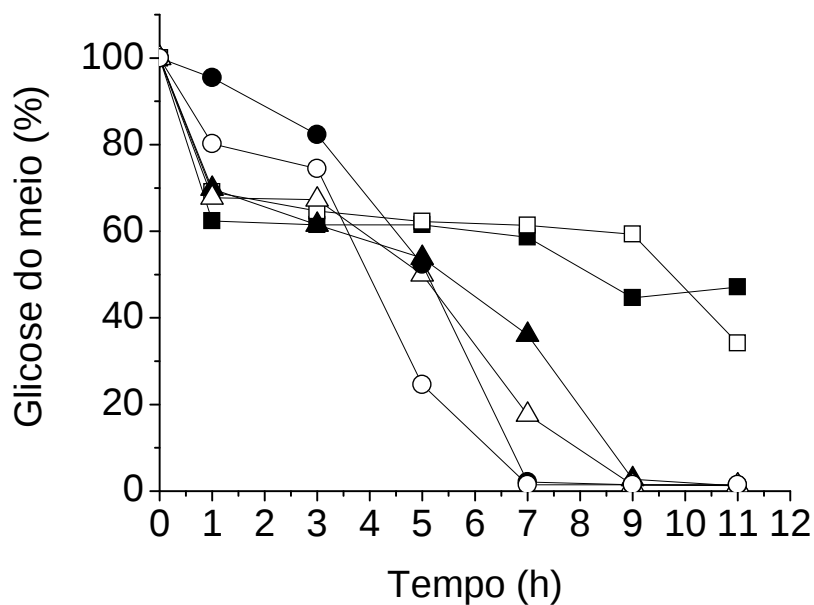


Figura 15: Consumo de glicose (a) e crescimento celular (b) de *Pichia kluyveri* G1.1 sob diferentes condições de cultivo: 28 °C (—■—; —□—) 32 °C (—▲—; —△—) 40 °C (—●—; —○—), sendo que símbolos sólidos correspondem a pH 4 (—■—; —▲—; —●—) e símbolos abertos (—□—; —△—; —○—) a pH 5. Experimento realizado com meio YEPD, inóculo inicial de 1 g/L e agitação de 150 rpm.

a)



b)

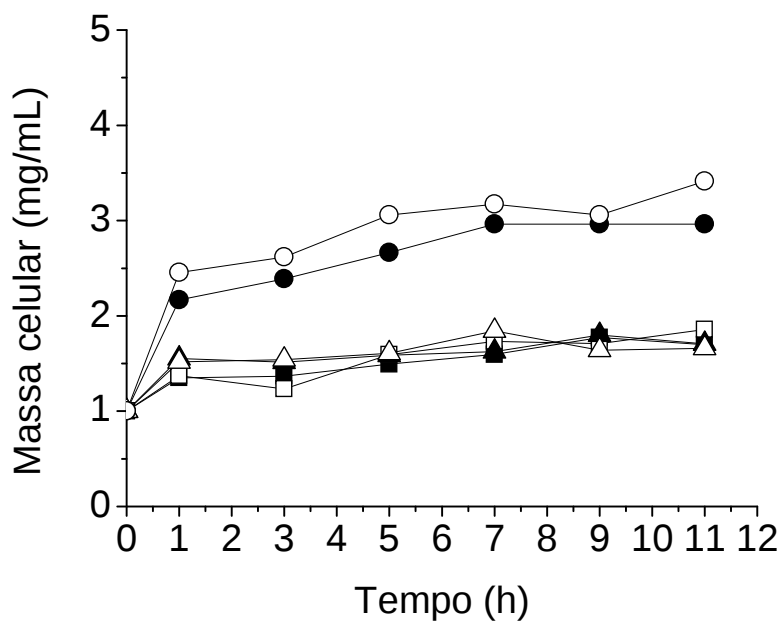
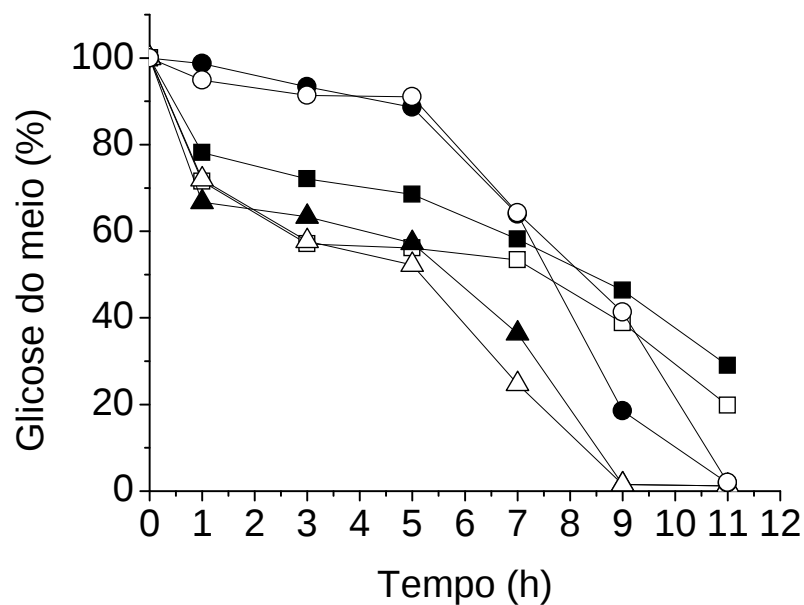


Figura 16: Consumo de glicose (a) e crescimento celular (b) de *Pichia guilliermondii* G1.2 sob diferentes condições de cultivo: 28 °C (—■—; —□—) 32°C (—▲—; —△—) 40 °C (—●—; —○—), sendo que símbolos sólidos correspondem a pH 4 (—■—; —▲—; —●—) e símbolos abertos (—□—; —△—; —○—) a pH 5. Experimento realizado com meio YEPD, inóculo inicial de 1 g/L e agitação de 150 rpm.

a)



b)

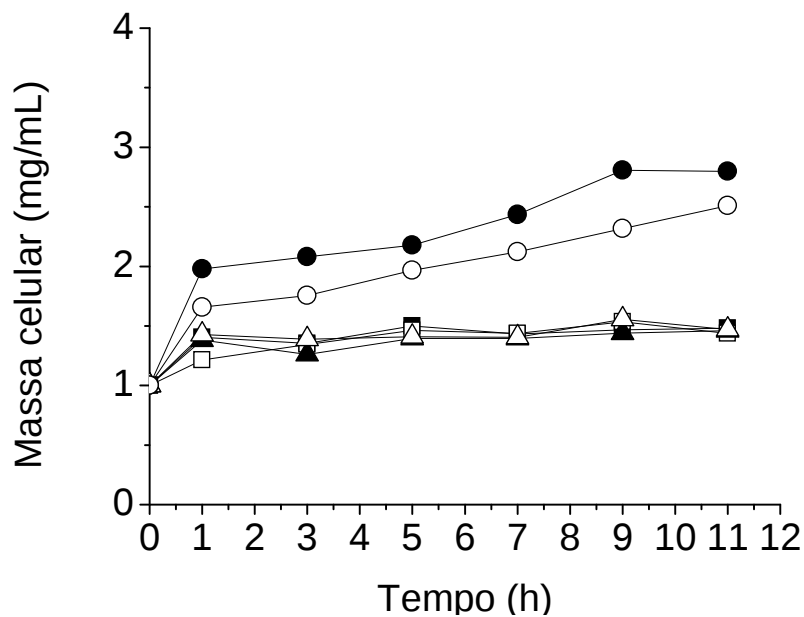
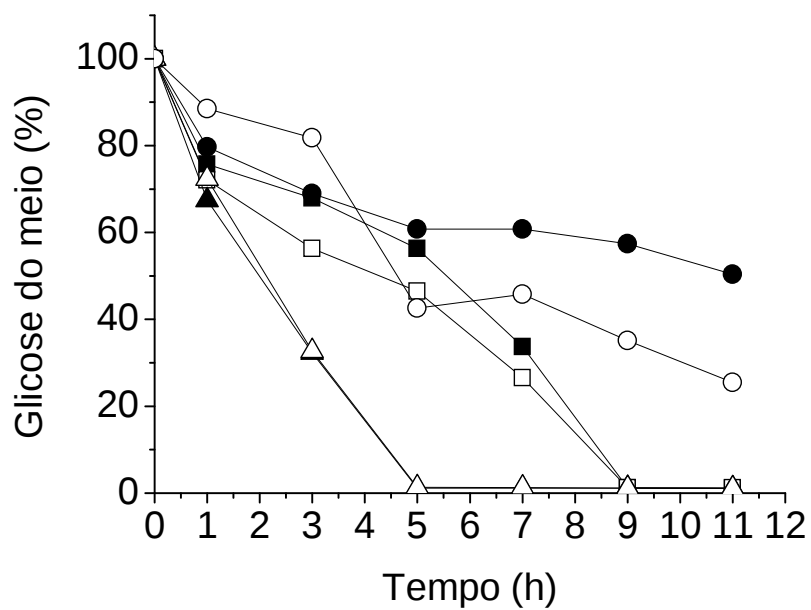


Figura 17: Consumo de glicose (a) e crescimento celular (b) de *Hanseniaspora sp.* G1.3 sob diferentes condições de cultivo: 28 °C (—■—; —□—) 32°C (—▲—; —△—) 40 °C (—●—; —○—), sendo que símbolos sólidos correspondem a pH 4 (—■—; —▲—; —●—) e símbolos abertos (—□—; —△—; —○—) a pH 5. Experimento realizado com meio YEPD, inóculo inicial de 1 g/L e agitação de 150 rpm.

a)



b)

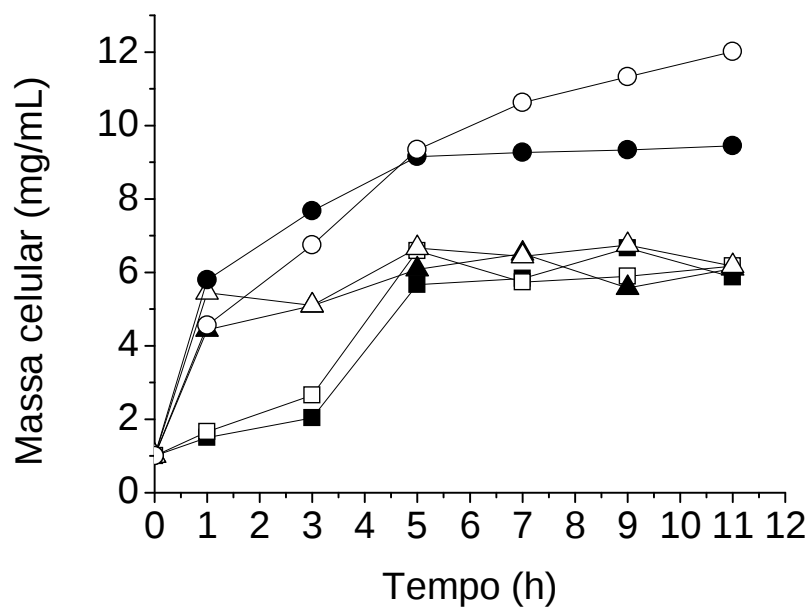
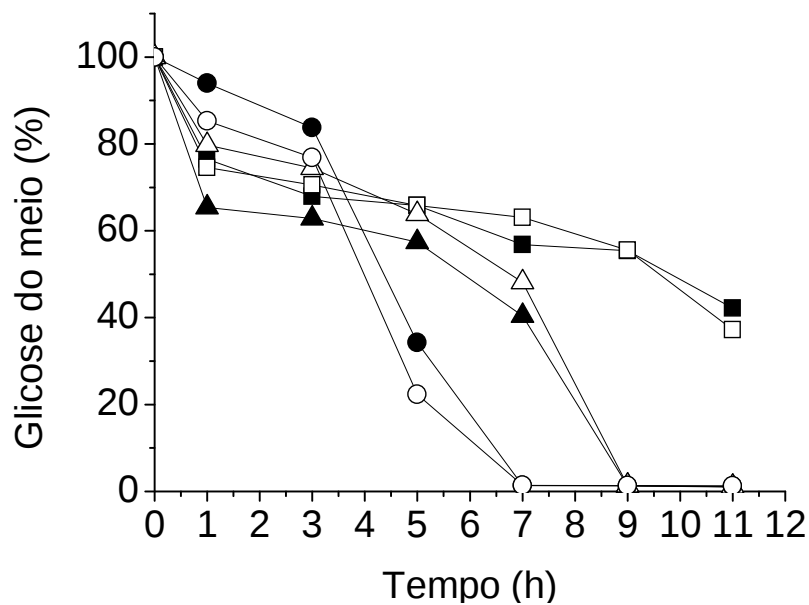


Figura 18: Consumo de glicose (a) e crescimento celular (b) de *Hanseniaspora sp.* G4.1 sob diferentes condições de cultivo: 28 °C (—■—; —□—) 32°C (—▲—; —△—) 40 °C (—●—; —○—), sendo que símbolos sólidos correspondem a pH 4 (—■—; —▲—; —●—) e símbolos abertos (—□—; —△—; —○—) a pH 5. Experimento realizado com meio YEPD, inóculo inicial de 1 g/L e agitação de 150 rpm.

a)



b)

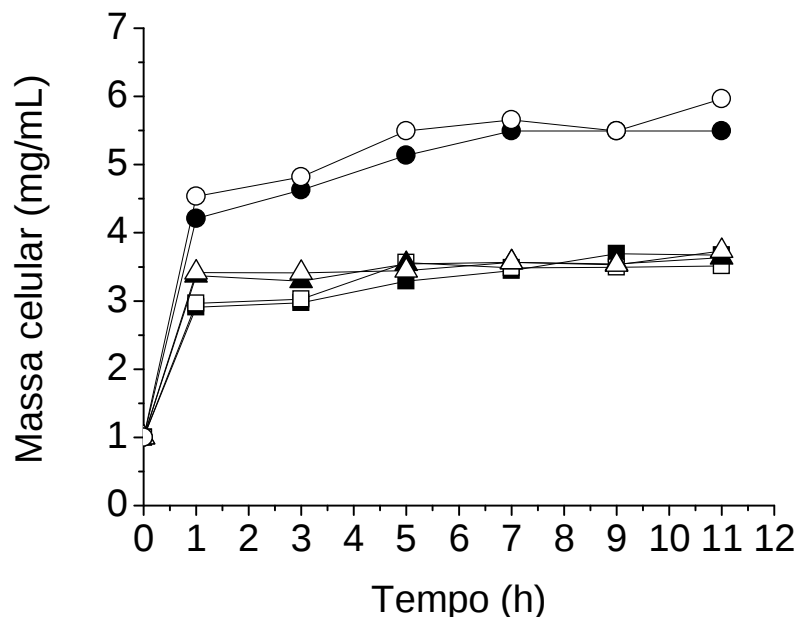
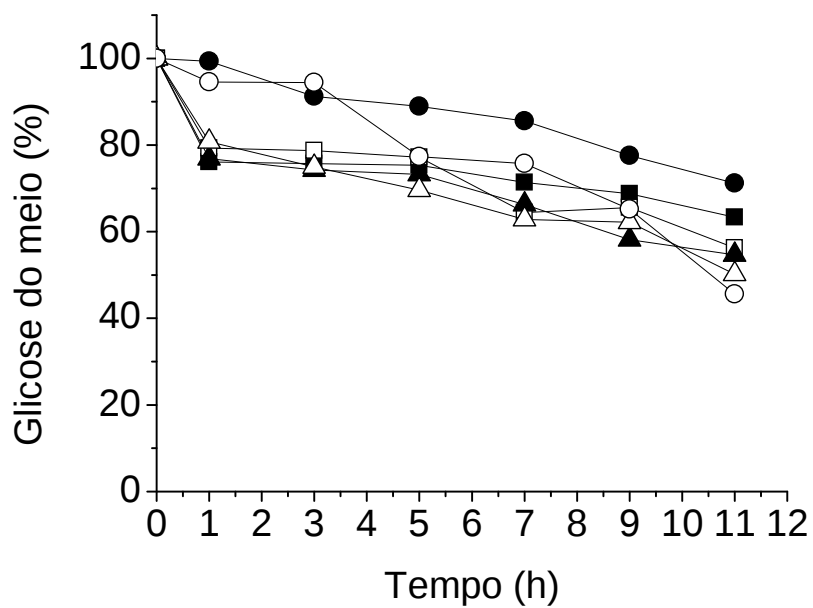


Figura 19: Consumo de glicose (a) e crescimento celular (b) de *Pichia guilliermondii*. G4.2 sob diferentes condições de cultivo: 28 °C (—■—; —□—) 32°C (—▲—; —△—) 40 °C (—●—; —○—), sendo que símbolos sólidos correspondem a pH 4 (—■—; —▲—; —●—) e símbolos abertos (—□—; —△—; —○—) a pH 5. Experimento realizado com meio YEPD, inóculo inicial de 1 g/L e agitação de 150 rpm.

a)



b)

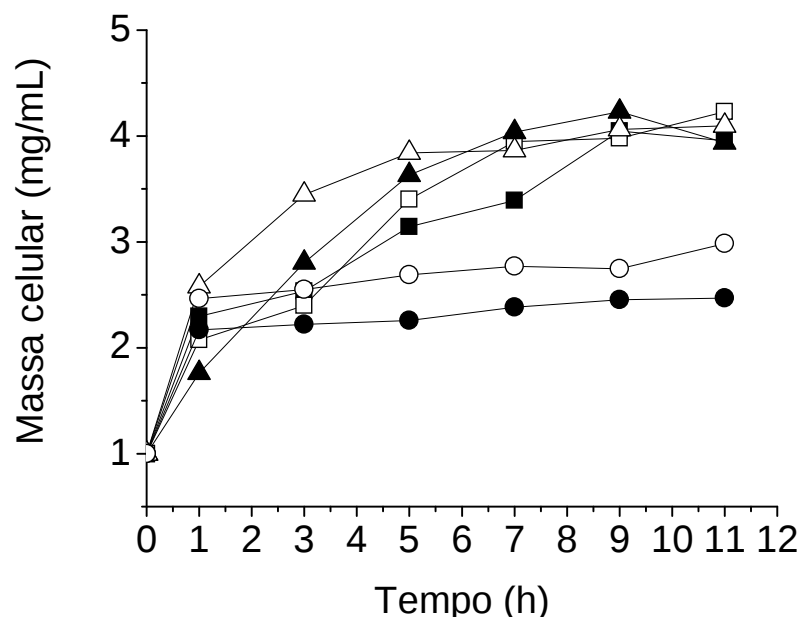
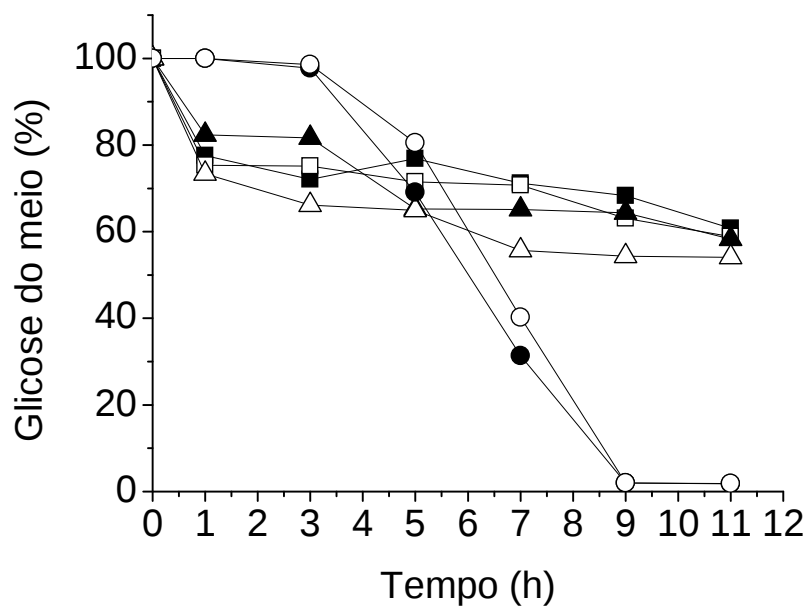


Figura 20: Consumo de glicose (a) e crescimento celular (b) de *Hanseniaspora sp.* G7.1 sob diferentes condições de cultivo: 28 °C (—■—; —□—) 32 °C (—▲—; —△—) 40 °C (—●—; —○—), sendo que símbolos sólidos correspondem a pH 4 (—■—; —▲—; —●—) e símbolos abertos (—□—; —△—; —○—) a pH 5. Experimento realizado com meio YEPD, inóculo inicial de 1 g/L e agitação de 150 rpm

a)



b)

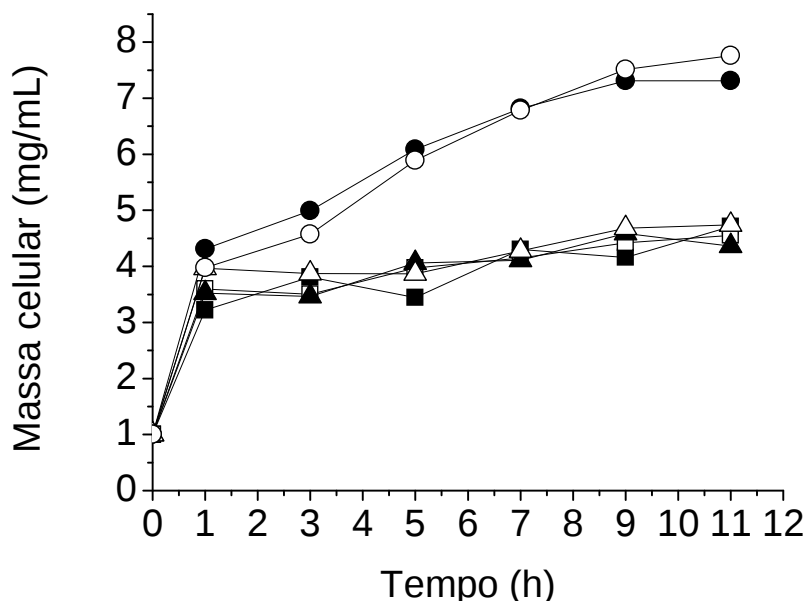
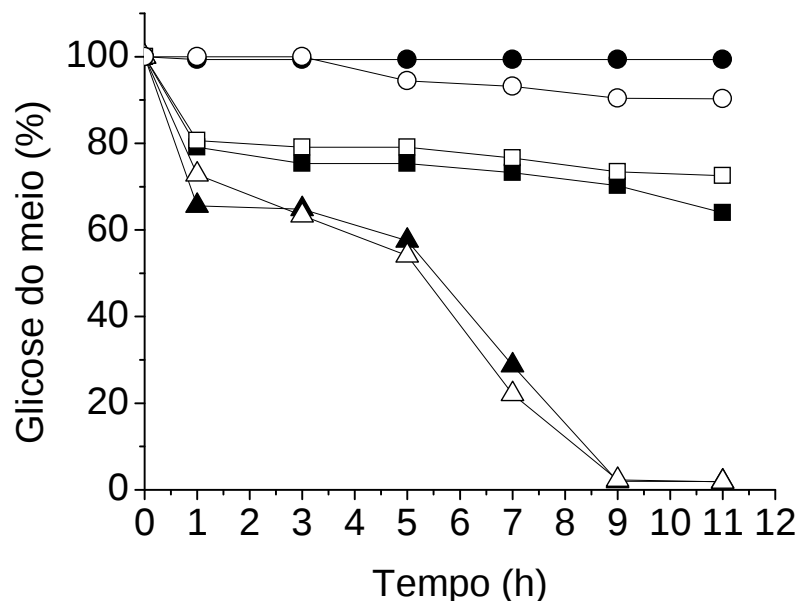


Figura 21: Consumo de glicose (a) e crescimento celular (b) de *Rhodotorula mucilaginosa*. G7.2 sob diferentes condições de cultivo: 28 °C (—■—; —□—) 32°C (—▲—; —△—) 40 °C (—●—; —○—), sendo que símbolos sólidos correspondem a pH 4 (—■—; —▲—; —●—) e símbolos abertos (—□—; —△—; —○—) a pH 5. Experimento realizado com meio YEPD, inóculo inicial de 1 g/L e agitação de 150 rpm

a)



b)

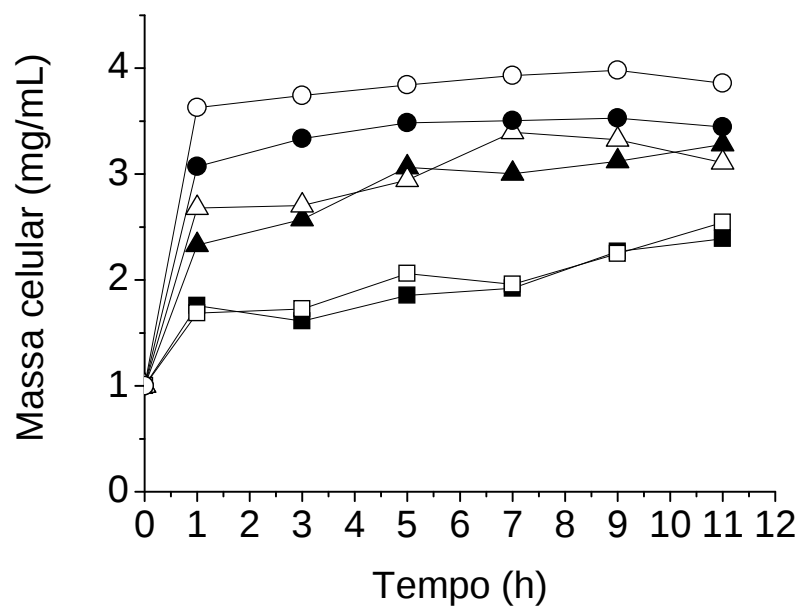
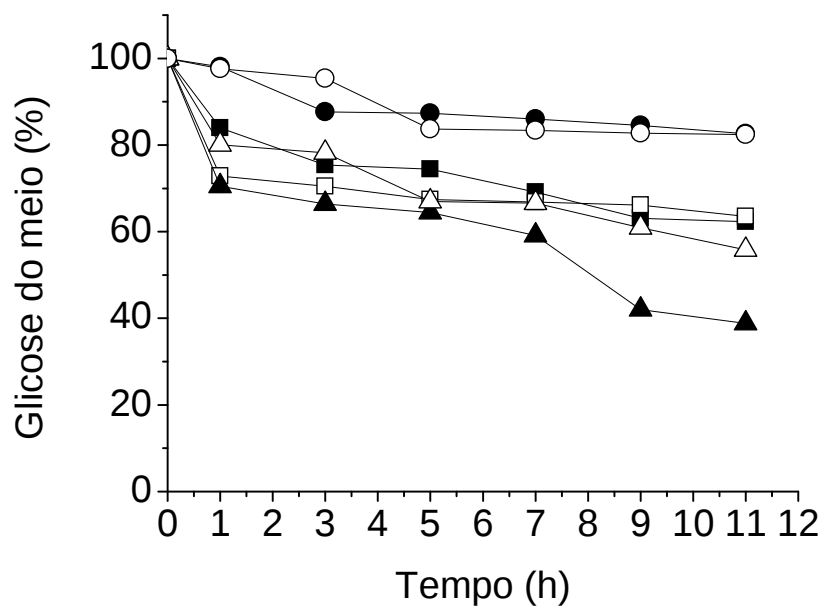


Figura 22: Consumo de glicose (a) e crescimento celular (b) de *Candida oleophila*. G10.1 sob diferentes condições de cultivo: 28 °C (—■—; —□—) 32°C (—▲—; —△—) 40 °C (—●—; —○—), sendo que símbolos sólidos correspondem a pH 4 (—■—; —▲—; —●—) e símbolos abertos (—□—; —△—; —○—) a pH 5. Experimento realizado com meio YEPD, inóculo inicial de 1 g/L e agitação de 150 rpm

a)



b)

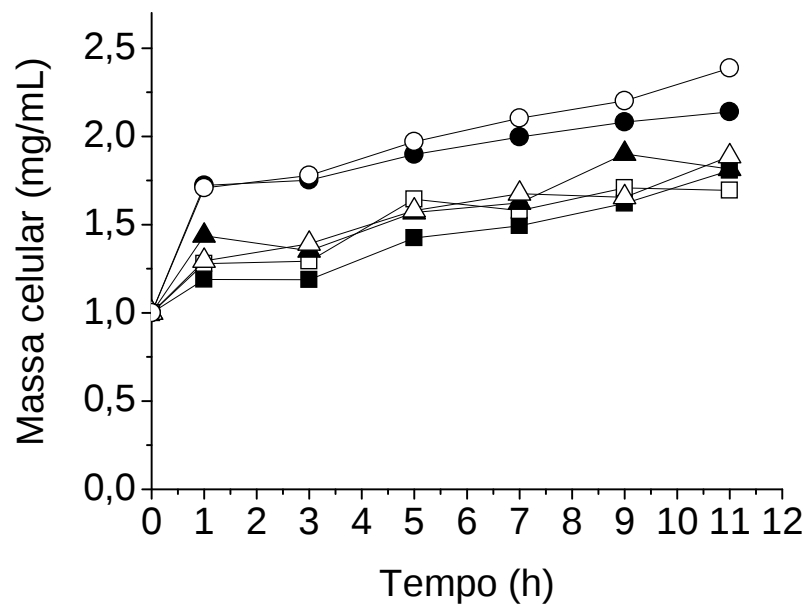
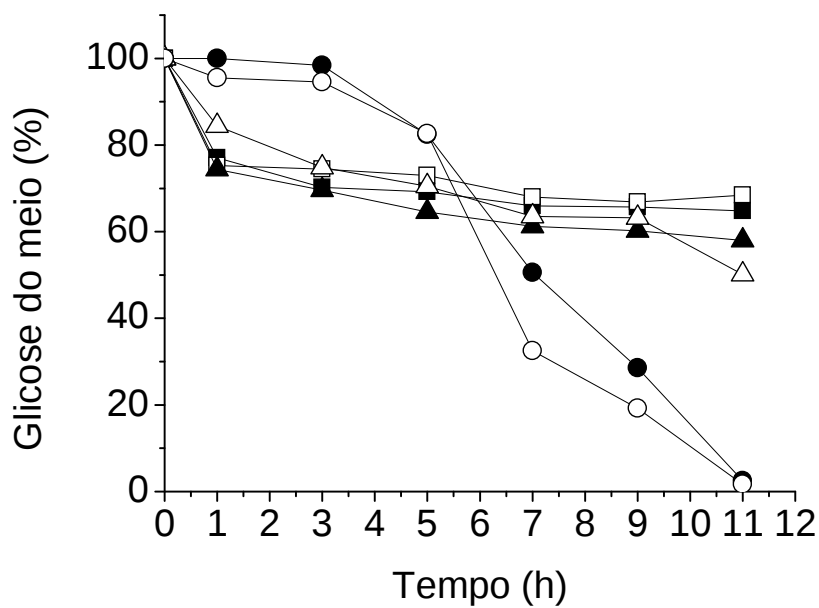


Figura 23: Consumo de glicose (a) e crescimento celular (b) de *Rhodotorula sp.* G10.2 sob diferentes condições de cultivo: 28 °C (—■—; —□—) 32°C (—▲—; —△—) 40 °C (—●—; —○—), sendo que símbolos sólidos correspondem a pH 4 (—■—; —▲—; —●—) e símbolos abertos (—□—; —△—; —○—) a pH 5. Experimento realizado com meio YEPD, inóculo inicial de 1 g/L e agitação de 150 rpm

a)



b)

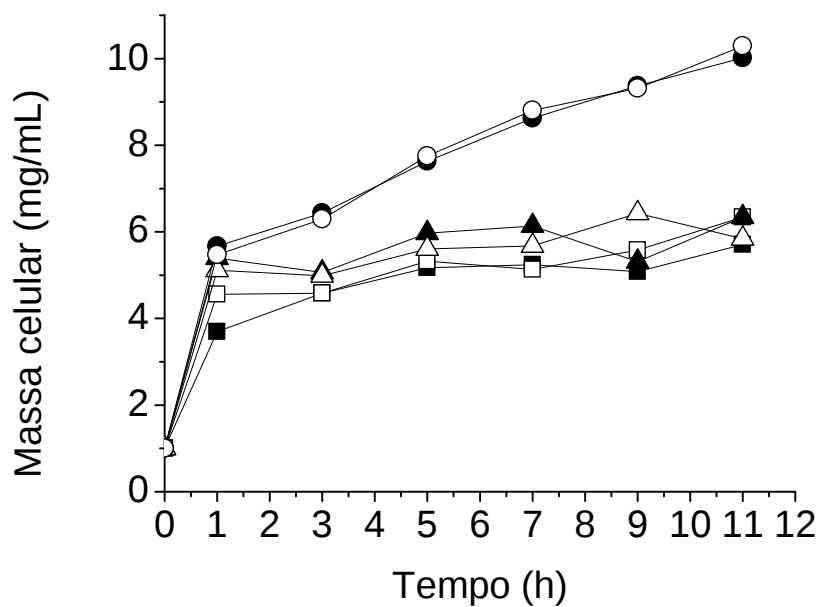
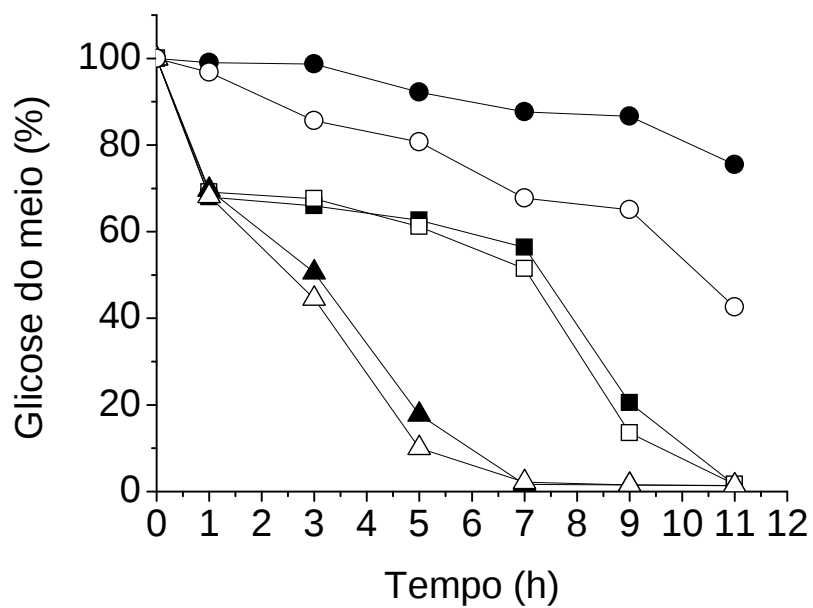


Figura 24: Consumo de glicose (a) e crescimento celular (b) de *Rhodotorula mucilaginosa* G11.2 sob diferentes condições de cultivo: 28 °C (—■—; —□—) 32°C (—▲—; —△—) 40 °C (—●—; —○—), sendo que símbolos sólidos correspondem a pH 4 (—■—; —▲—; —●—) e símbolos abertos (—□—; —△—; —○—) a pH 5. Experimento realizado com meio YEPD, inóculo inicial de 1 g/L e agitação de 150 rpm

a)



b)

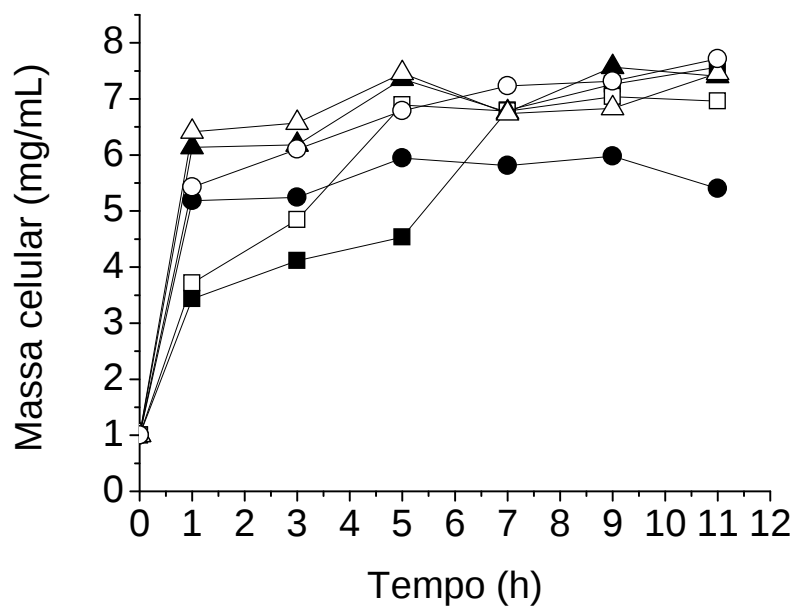
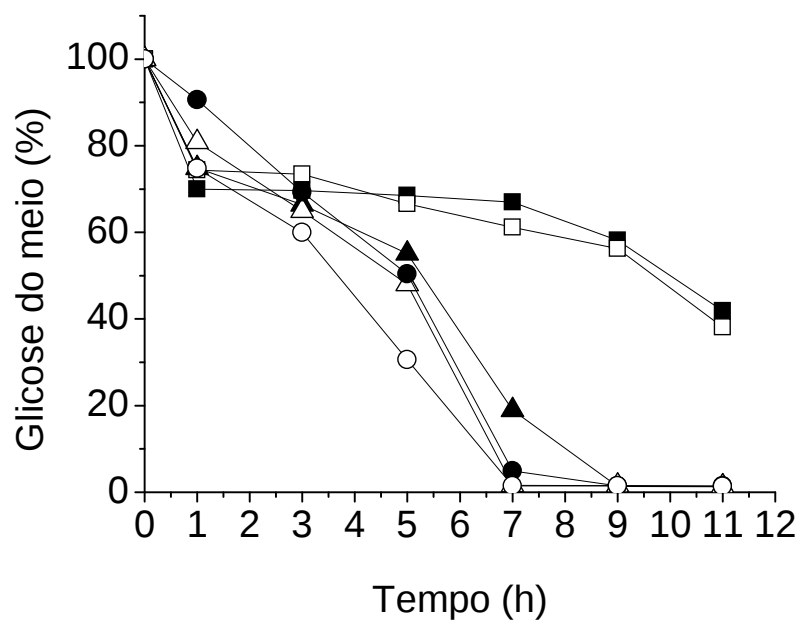


Figura 25: Consumo de glicose (a) e crescimento celular (b) de *Metschnikowia koreensis* G18 sob diferentes condições de cultivo: 28 °C (—■—; —□—) 32°C (—▲—; —△—) 40 °C (—●—; —○—), sendo que símbolos sólidos correspondem a pH 4 (—■—; —▲—; —●—) e símbolos abertos (—□—; —△—; —○—) a pH 5. Experimento realizado com meio YEPD, inóculo inicial de 1 g/L e agitação de 150 rpm

a)



b)

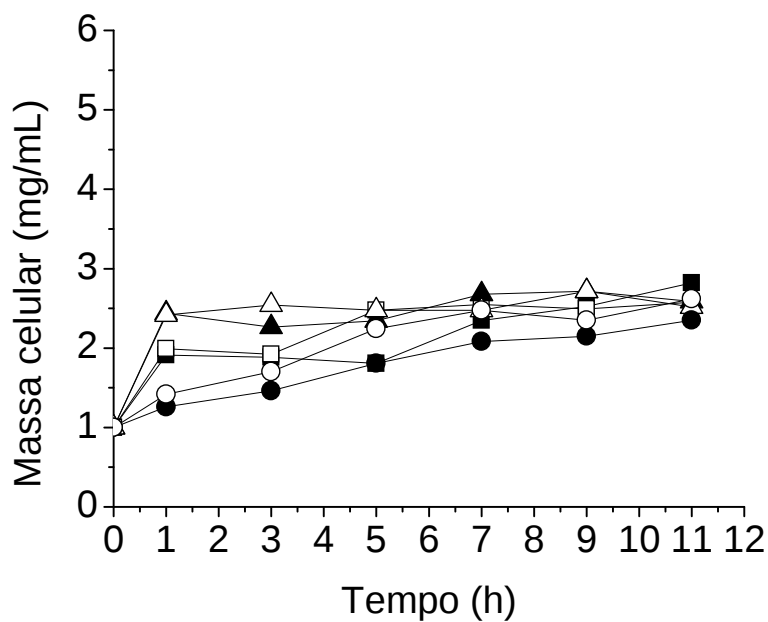


Figura 26: Consumo de glicose (a) e crescimento celular (b) de *Candida shehatae* BR6-2AY sob diferentes condições de cultivo: 28 °C (—■—; —□—) 32°C (—▲—; —△—) 40 °C (—●—; —○—), sendo que símbolos sólidos correspondem a pH 4 (—■—; —▲—; —●—) e símbolos abertos (—□—; —△—; —○—) a pH 5. Experimento realizado com meio YEPD, inóculo inicial de 1 g/L e agitação de 150 rpm

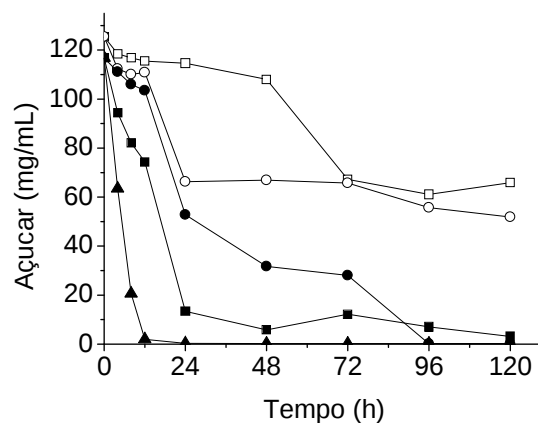
Hanseniaspora sp. G1.3 (Figura 17) assimilou melhor a glicose no cultivo a 32°C e pH 5, mas teve bom consumo em 40°C. Já as cepas *Hanseniaspora sp.* G7.1 (Figura 20) e *Rhodotorula sp.* G10.2 (Figura 23) não consumiram totalmente o açúcar em nenhuma das condições de cultivo, mas a primeira foi melhor na faixa de 28-32°C e pH 5, enquanto a segunda preferiu 32°C e pH 4. *Candida shehatae* BR6-2AY (Figura 26) apresentou boas condições de desenvolvimento na faixa de 32-40°C em ambos os pHs 4 a 5.

É importante destacar o crescimento das cepas a *P. kluyveri* G1.1, *P. guilliermondii* G1.2, *Hanseniaspora sp.* G1.3, *P. guilliermondii* G4.2, *R. mucilaginosa* G7.2, *R. mucilaginosa* G11.2 e *C. shehatae* BR6-2AY a 40°C, visto que a maioria das leveduras são descritas como organismos mesofílicos com crescimento ótimo entre 28 e 32°C (McMILLAN, 1993; DU PREEZ, 1994; GHINDEA et al, 2010).

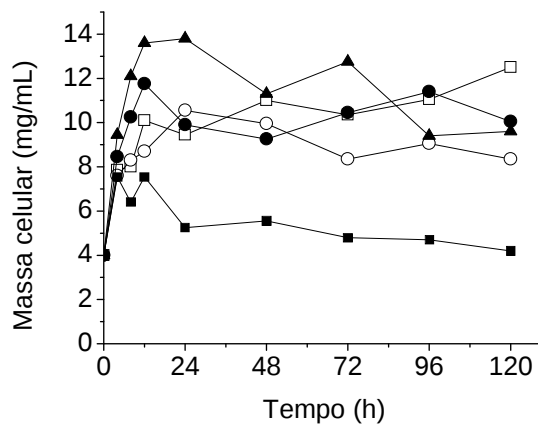
5.5. Avaliação da produção de etanol pelas cepas

Uma segunda metodologia de fermentação alcoólica foi testada, utilizando-se Erlenmeyer próprio para fermentação anaeróbia. Foram realizadas fermentações com as cepas *C. shehatae* BR6-2AY e *Rhodotorula sp.* G10.2, com xilose e glicose, separadamente, como fontes de carbono. Visto que *Candida shehatae* BR6-2AY apresentou maior crescimento e taxa de assimilação de glicose a 40°C, foram realizadas fermentações da xilose a 32 e 40°C. Fez-se também fermentação com glicose utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae* para fins comparativos. Os resultados desse experimento podem ser visualizados nas Figuras 27 e 28. O consumo de xilose (Figura 27a) foi próximo para *C. shehatae* BR6-2AY e *Rhodotorula sp.* G10.2, consumiram 47 e 58%, respectivamente. *C. shehatae* BR6-2AY consumiu quase toda a glicose (97%) e *Rhodotorula sp.* G10.2 consumiu todo o açúcar em 96h de cultivo, enquanto *S. cerevisiae* consumiu 99% da glicose do meio nas primeiras 24 horas.

a)



b)



c)

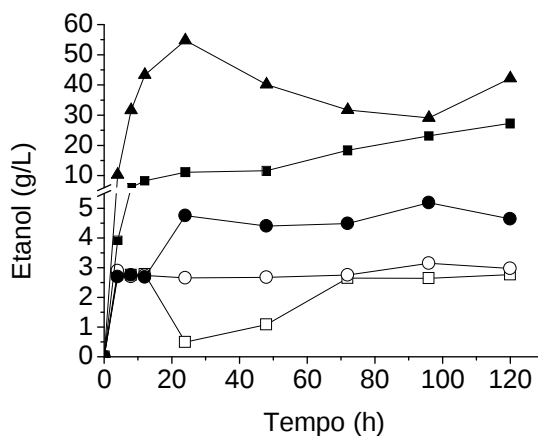


Figura 27: Consumo de açúcares (a), crescimento celular (b) e produção de etanol (c) durante fermentação alcoólica realizada em Erlenmeyers de anaerobiose das cepas *Candida shehatae* (■; □) *Rhodotorula sp.* (●; ○) e *S. cerevisiae* (▲). Símbolos sólidos (■; ▲; ●) correspondem ao cultivo em glicose e símbolos abertos (□; ○) ao cultivo em xilose. Meio basal com xilose ou glicose a 100 g/L, extrato de levedura a 10g/L, inóculo inicial de 4 g/L, agitação de 150 rpm, temperatura de 32°C.

Com relação ao crescimento em xilose (Figura 27b), *C. shehatae* BR6-2AY atingiu massa celular de 12,5 mg/mL e *Rhodotorula sp.* G10.2 chegou a 10,5 mg/mL. Na fermentação com glicose, *C. shehatae* BR6-2AY cresceu pouco (7,5 mg/mL) quando comparada às outras cepas, *Rhodotorula sp.* G10.2 alcançou 11,7 mg/mL e *S. cerevisiae* 13,8 mg/mL. Silva (2007), trabalhando com *P. stipitis* em 60 g/L de substrato inicial, e Kipper (2009), utilizando *P. tannophilus* e 80 g/L de substrato inicial, realizaram fermentação de 120h a 30°C e também observaram crescimento das leveduras durante toda a fermentação, apesar das cepas estarem em condições que estimulam a produção de etanol.

A produção de etanol (Figura 27c) foi semelhante para as duas cepas utilizadas para fermentação com xilose, *C. shehatae* BR6-2AY produziu 2,8 g/L e *Rhodotorula sp.* G10.2 formou 3,15 g/L. A produção de etanol a partir de glicose foi maior do que a partir de xilose para ambas as cepas utilizadas. *C. shehatae* BR6-2AY atingiu uma produção bem maior para fermentação de glicose do que de xilose (27,3 g/L), já *Rhodotorula sp.* G10.2 apresentou valor mais próximo de produção (5 g/L). A levedura controle *S. cerevisiae* alcançou um pico de produção de 54,7 g/L em 24h de cultivo, a partir do qual houve redução de produção. Essa queda pode ter ocorrido devido ao consumo do etanol pela levedura após a glicose ser exaurida do meio e restar apenas etanol como fonte de carbono (SCHÜLLER, 2003).

A Figura 28 mostra os resultados da fermentação realizada com *C. shehatae* BR6-2AY a 40°C. Apesar de ter consumido 24% da xilose presente no meio a cepa apresentou fraco crescimento (6,7 mg/ml) e apenas 0,8 g/L de etanol. Segundo Ghindea et al (2010), quando as células de leveduras são cultivadas em temperaturas acima de 37°C observa-se uma drástica diminuição na produtividade de xilitol, o qual pertence à mesma via bioquímica do etanol.

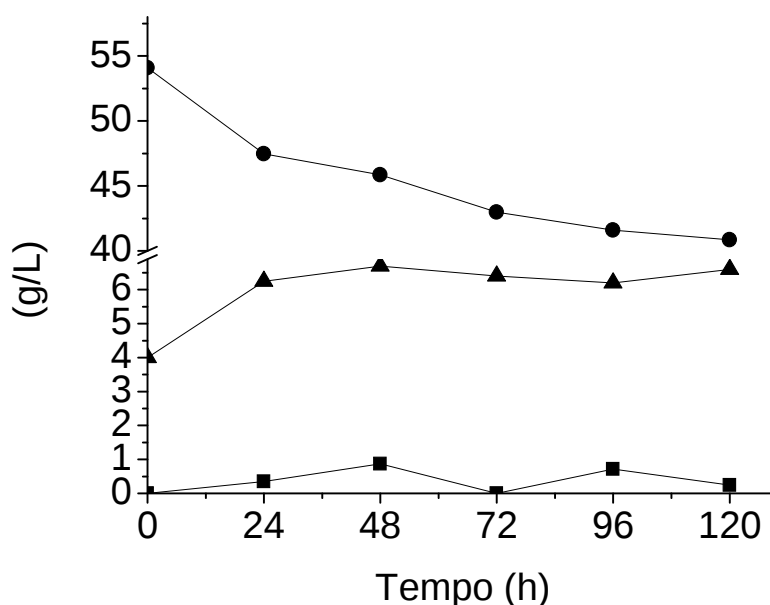


Figura 28: Consumo de açúcares (—●—), crescimento celular (—▲—) e produção de etanol (—■—) durante fermentação alcoólica realizada com *Candida shehatae* a 40°C. Meio basal com xilose a 60 g/L, extrato de levedura a 10g/L, inóculo inicial de 4 g/L e agitação de 150 rpm

Para testar se estava ocorrendo perda de etanol durante a execução da metodologia realizou-se um experimento controle, no qual se adicionou uma concentração determinada de etanol (4,5%) no meio de cultura utilizado na fermentação, sem inóculo de levedura, e executou-se todo o processo de amostragem e análise (para quantificação de etanol) realizadas durante o experimento de fermentação alcoólica. A curva se encontra na Figura 29 e indica que não houve perdas de etanol, a pequena variação encontrada provavelmente se deve às variações normalmente encontradas em análises de cromatografia gasosa, nas quais algumas variáveis contribuem para esse tipo de divergência, como o manuseio da seringa no momento da amostragem e/ou injeção da amostra no equipamento.

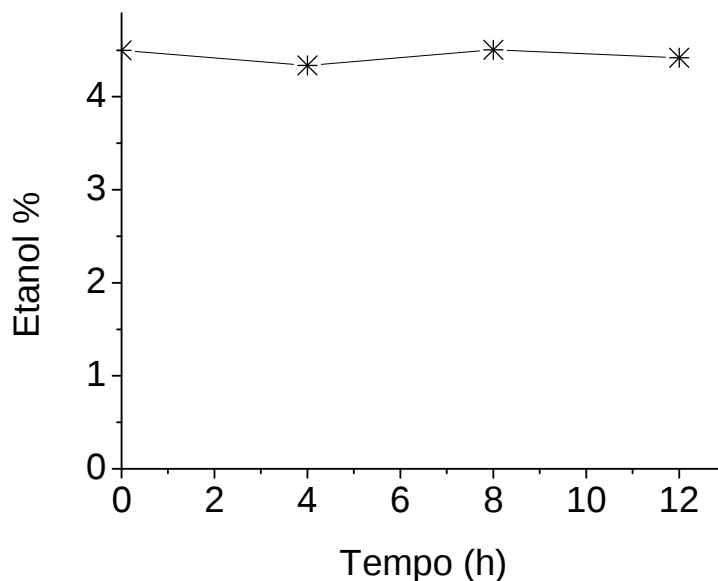


Figura 29: Controle da metodologia de fermentação alcoólica: Cerca de 4,5% de etanol foram adicionados ao meio utilizado na fermentação alcoólica como forma de controle, a fim de avaliar se alguma quantidade de etanol estava sendo perdida durante a execução da metodologia. Os asteriscos representam os pontos de amostragem do controle.

A Tabela 6 apresenta o consumo de xilose, a produção de etanol, o rendimento da produção de etanol e massa celular com relação à xilose consumida pelas duas cepas durante o experimento, ao passo que a Tabela 7 apresenta esses valores com relação à fermentação a partir de glicose.

Os rendimentos de produção de etanol a partir de xilose foram maiores nas primeiras horas do experimento. *C. shehatae* BR6-2AY alcançou rendimentos 0,39 g de etanol/g de xilose e *Rhodotorula sp.* G10.2 atingiu 0,22 g/g. Com relação ao crescimento foram de 0,61 g de massa celular/g de xilose para a primeira cepa e 0,32 g/g para a segunda.

Tabela 6: Consumo de xilose, produção de etanol e rendimento de etanol por xilose consumida durante o segundo experimento de fermentação alcoólica em meio com concentração de xilose de 100 g/L, temperatura de 32°C, agitação de 150 rpm e inóculo inicial de 4 g/L

Cepas	Tempo de amostragem (h)	Xilose consumida (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimento etanol (g etanol/g xilose consumida)	Rendimento crescimento (g massa celular/g xilose consumida)
<i>C. shehatae</i> BR6-2AY	4	6,9	2,7	0,39	0,55
	8	8,5	2,7	0,32	0,46
	12	9,9	2,8	0,27	0,61
	24	10,8	0,5	0,04	0,50
	48	17,3	1,1	0,06	0,40
	72	58,1	2,6	0,04	0,10
	96	64,2	2,6	0,04	0,10
	120	59,4	2,8	0,04	0,14
<i>Rhodotorula sp.</i> G10.2	4	13,1	2,9	0,22	0,27
	8	15,2	2,7	0,17	0,28
	12	14,5	2,7	0,18	0,32
	24	59,1	2,6	0,04	0,11
	48	58,4	2,7	0,04	0,10
	72	59,6	2,7	0,04	0,07
	96	69,7	3,1	0,04	0,07
	120	73,5	2,9	0,04	0,05

Os rendimentos da produção de etanol a partir de glicose (Tabela 7) foram maiores nas primeiras horas para *Rhodotorula sp.* G10.2 (0,47 g/g). *C. shehatae* BR6-2AY e *S. cerevisiae* apresentaram valores mais constantes durante todo o experimento, entre 0,17 g/g e 0,24 g/g para *C. shehatae* BR6-2AY e 0,19-0,46 g/g para *S. cerevisiae*.

A cepa *Rhodotorula sp.* G10.2 alcançou maiores rendimentos também para crescimento e os menores valores são de *C. shehatae* BR6-2AY, a levedura que apresentou menor desenvolvimento de massa celular. *Rhodotorula sp.* G10.2 atingiu rendimentos que variam entre 0,05 g/g e 0,78 g/g. Já os valores de *C. shehatae* BR6-2AY são na ordem de 0,00 a 0,15 g/g. Para *S. cerevisiae* os rendimentos se encontram entre 0,04 g/g e 0,10 g/g.

Tabela 7: Consumo de glicose, produção de etanol e rendimento de etanol por glicose consumida durante o segundo experimento de fermentação alcoólica em meio com concentração inicial de glicose de 100 g/L, temperatura de 32°C, agitação de 150 rpm e inóculo inicial de 4 g/L.

Cepas	Tempo de amostragem (h)	Glicose consumida (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimento etanol (g etanol/g glicose consumida)	Rendimento crescimento (g massa celular/g glicose consumida)
<i>C. shehatae</i> BR6-2AY	4	22,4	3,9	0,17	0,15
	8	34,7	6,1	0,17	0,06
	12	42,4	8,3	0,19	0,08
	24	103,4	11,1	0,10	0,01
	48	110,9	11,6	0,10	0,01
	72	104,5	18,4	0,17	0,01
	96	109,7	23,1	0,21	0,01
	120	113,6	27,3	0,24	0,00
<i>Rhodotorula sp.</i> G10.2	4	5,7	2,7	0,47	0,78
	8	10,7	2,7	0,25	0,58
	12	13,2	2,6	0,20	0,58
	24	63,9	4,7	0,07	0,09
	48	85,1	4,4	0,05	0,06
	72	88,7	4,5	0,05	0,07
	96	116,6	5,2	0,04	0,06
	120	116,7	4,6	0,03	0,05
<i>S. cerevisiae</i>	4	53,3	10,3	0,19	0,10
	8	96,2	31,6	0,32	0,08
	12	114,8	43,3	0,37	0,08
	24	116,5	54,7	0,46	0,08
	48	116,5	40,1	0,34	0,06
	72	116,5	31,7	0,27	0,07
	96	116,5	29,1	0,24	0,04
	120	116,5	42,2	0,36	0,04

A da 2ª metodologia de fermentação alcoólica a partir de xilose permitiu que se aumentasse produção de etanol em 1,5 vezes para *C. shehatae* BR6-2AY e 2,5 vezes para *Rhodotorula sp.* G10.2, quando comparada à 1ª metodologia.

Os resultados desta metodologia corroboram os resultados de outros trabalhos que utilizam metodologias de fermentação alcoólica semelhantes. Kiipper (2009), em seus experimentos com hidrolisado de cana-de-açúcar, empregando *P. tannophilus*, apresentou produção de 0,205% de etanol em 24h e rendimento de 0,247 g etanol/g xilose nas primeiras

12h de fermentação, além disso, observou que o ápice da produção de etanol ocorreu em 24h de fermentação. Fugita (2010) realizou experimentos com fermentação de mosto sintético contendo xilose a 50 g/L e glicose a 9,35 g/L, e encontrou pico de produção de etanol com 6 h de fermentação, onde *R. glutinis* produziu 2,33 g/L de etanol, *R. minuta* 2,16 g/L e *C. guilliermondii* 2,14 g/L. Enquanto Canilha et al (2010), trabalhando com *P. stipitis*, em meio contendo xilose a 60 g/L e glicose a cerca de 3 g/L obteve 7,5 g/L de etanol em 48h de fermentação e rendimento de 0,3 g/g.

Silva (2007), trabalhando com *Pichia stipitis* e fermentação de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, com concentração de 60 g/L de açúcares totais (sendo a proporção entre eles, aproximadamente, 1:6:1 para glicose, xilose e arabinose, respectivamente), atingiu produção de 15,5 g/L de etanol, após 120 horas de cultivo e rendimentos de cerca de 0,3 g etanol/g xilose, sendo que esse trabalho atingiu valores de rendimentos semelhantes, além de ter utilizado somente xilose como açúcar redutor.

Outros trabalhos apresentam valores maiores de produção, porém realizaram fermentações alcoólicas em fermentadores que permitem a execução dos experimentos em maior escala e maior controle das condições do meio, como pH e oxigenação, contudo, observa-se que os rendimentos das leveduras se mantêm. Rao, Bhadra e Shivaji (2008) alcançaram um rendimento de 0,38 g de etanol/g de xilose com *P. guilliermondii* e 0,16 g/g com *R. mucilaginosa*. Sreenath & Jeffries (2000) relatam estudo com *C. shehatae*, *P. stipitis* e *P. tannophilus* cuja produção etanol alcançou rendimento de 0,33-0,51 g de etanol/g de xilose. Em condições controladas de oxigenação, Fromanger et al (2010) obtiveram uma produção de etanol de 48,81 g/L e rendimento de 0,327 g etanol/g xilose com *C. shehatae*. Dessa forma, o melhoramento e maior controle das condições de cultivo provavelmente permitiriam um aumento na produção de etanol por essas cepas.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, 20 cepas de leveduras pertencentes aos gêneros *Aureobasidium*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia*, *Pichia* e *Rhodotorula* foram isoladas de materiais como flores e frutos e outros tipos de materiais lignocelulósicos. Estas e as outras cepas avaliadas demonstraram que uma grande variedade de estirpes de leveduras encontradas na natureza possui potencial de aplicação biotecnológica, sendo as cepas desse estudo capazes de metabolizar xilose e glicose sob condições aeróbias e quatro destas (*Candida shehatae* BR6-2AY e BR6-2AI, *Rhodotorula sp* G10.2 e *Pichia guilliermondii* G1.2) capazes de produzir etanol a partir de xilose. Novos estudos com controle das condições de cultivo, enriquecimento do meio, cinética de consumo de açúcares e produção de etanol provavelmente permitiriam um aumento na produção de etanol por essas cepas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. *Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia*. Piracicaba, Ed. Fermentec, 448p, 2005.
- ARAUQUE, E.; PARRA, C.; FREER, J.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J.; MENDONÇA, R.; BAEZA, J. Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology Elsevier*, v. 43, p. 214–219, 2008.
- ATTFIELD, P. V.; BELL, P. J. L. Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source. *FEMS Yeast Res*, v. 6 p. 862–868, 2006.
- 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.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science Elsevier*, v. 34, p. 551-573, 2008.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, v. xxx, p.xxx–xxx, 2010.
- BHADRA, B., RAO, S.R., SINGH, P.K., SARKAR, P.K. AND SHIVAJI, S. Yeasts and yeast-like fungi associated with the bark of trees: diversity of yeasts and identification of yeasts producing extracellular endo-xylanases. *Curr. Microbiol.* v.56, p. 489–494, 2008.
- BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. *Proc. Okla. Acad. Sci.* v. 72 p. 51-56, 1992.
- CAMPBELL, M. K. *Bioquímica*. Ed. ArtMed, e. 3, cap. 12, p. 428-430, 2000.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W. ; FELIPE, M. G. A. ; ALMEIDA E SILVA, J.B. ; GIULIETTI, M. Ethanol production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using *Pichia stipitis*. *Applied Biotechnology*, v. 161, p.84-92, 2010.
- CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2415–2457, 2007.
- CHU, B. C.H.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 425–441. 2007.
- DEMIRBAS, A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources*, v.27, p.327-337, 2005.
- DU PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factors affecting Dxylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 16, p. 944-952, 1994.

- DUARTE, L. C.; CARVALHEIRO, F.; NEVES, I.; GÍRIO, F. M. Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121-124, p. 413-425, 2005.
- FERNANDES, A. P. F. V. *Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺-ATPase da membrana*. 2008. 2001 f. Tese (Doutorado em Biologia, especialidade em Microbiologia). Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2008.
- FERREIRA FILHO, E. X. Xilanases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 137-148.
- FROMANGER, R. et al. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. *J Ind Microbiol Biotechnol*. v. 37, p. 437-445, 2010.
- FU, N., PEIRIS P., MARKHAN J., BAVOR J. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 210-217, 2009.
- FUGITA, T. P. L. *Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado heemicelulósico de bagaço de cana*. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.
- GHINDEA, R.; CSUTAK, O.; STOICA, I.; TANASE, A. M.; VASSU, T. Production of xylitol by yeasts. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 15, n. 3, p. 5217-5222, 2010.
- GÔMEZ, C. H. R. J. Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus*. UNICAMP., 1985.
- GONG, C.S.; CHEN, L.F.; FLINCKINGER, 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, n.2, p.430-436, 1981.
- GOVINDASWAMY, S.; VANE, L. M. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. *Bioresource Technology*. v. 98, p. 677-685, 2007.
- HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.; KEWELO, H.; DE BONT, J. A. M. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology*, v. 12, p. 409-615, 1994.
- HONG, S. G.; CHUN, J.; OH, H. W.; BAE, K. S. *Metschnikowia koreensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 51, p. 1927-1931, 2001.
- JACKSON, S.; NICOLSON, S.W. Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v. 131p. 613-620, 2002.
- JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 17, p.320-326, 2006.

- KIPPER, P. G. *Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus**. 2009. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2009.
- KURTZMAN, C. P. ; FELL, J. W. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, 4nd Edition, 1055 p. 1998.
- LHENINGER , A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 1009p. 2002.
- LOURENÇO, M. V. M. *Seleção de leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol*. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP, Piracicaba, 2009.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. São Paulo, Ed.Pearson, Prentice Hall, ed 10, 2004.
- MARTÍN, J. F. G.; 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.
- MARTÍN,C.; ALMAZÁN, O.; MARCET, M.; JONSSON, L.J. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. *International Sugar Journal*, v. 109, p. 1267, 2007.
- MARTINS, L. F. *Caracterização do Complexo Celulásico de *Penicillium echinulatum**. 2005. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- McMILLAN, J.D. *Xylose Fermentation to Ethanol: A Review*. Springfield: National Technical Information Service, 1993.
- MILLER, G.L. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for fetermination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428, 1959.
- MODING, T., LIDEN, G.; TAHERZADEH, M.J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemistry Journal*,v.363, p.769–776, 2002.
- MORAES, D. C.; PEREZ, C. A.; DORTA, C. Seleção de microrganismos fermentadores de xilose. *Revista Analytica*. v.47, p. 59-67, 2010.
- 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 ad lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p.71-177, 2001.

- NIGAM, J.N., IRELAND, R.S., MARGARITIS, A. AND LACHANCE, M.A. Isolation and screening of yeasts that ferment d-xylose directly to ethanol. *Appl Environ Microbiol.* v. 50, p. 1486–1489, 1985.
- PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI JUNIOR, M. Yeasts and filamentous fungi carried by gynes of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 94, p. 517-526, 2008.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, v. 24, p. 25-33, 2000 b.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 17-24, 2000 a.
- PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. v. 2, 2 ed. São Paulo, Ed. Pearson Education do Brasil, 1997.
- 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*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 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.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.
- 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.
- 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.
- SCHÜLLER, H. J. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* v. 43, p. 139–160, 2003.
- SILVA, J. P. A. *Estudo da produção de etanol por Pichia stipitis empregando hidrolisado de palha de arroz*. 2007. 144 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.
- SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. *Quim. Nova*, v. 32, p. 661-671, 2009.
- SREENATH, H.K.; JEFFRIES, T.W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. *Bioresource Technology*, v. 72, p. 253-260, 2000.
- STAMBUK, B.U.; FRANDEN, M.A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-Xilose Transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105-108, p. 255-263, 2003.

- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores Technol*, v.83, p. 1-11, 2002.
- TOIVOLA, A.; YARROW, D.; VAN DEN BOSCH, E.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Alcoholic Fermentation of D-Xylose by Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, n. 6, p. 1221-1223, 1984.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.; CASE, C.L. *Microbiologia*, 6 ed. Porto Alegre, Ed. ArtMed, 1206 p. 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.
- VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*, John Wiley & Sons; 2nd Edition, 1361p. 1995.

APÊNDICE

Padronização do inóculo

Encontra-se a seguir as curvas e equações obtidas, de cada cepa de levedura, para a calibração da concentração celular a ser utilizada como inóculo, pelo método da absorbância a 600 nm em função do peso seco (item 4.4).

A1. *Pichia kluyveri* G1.1

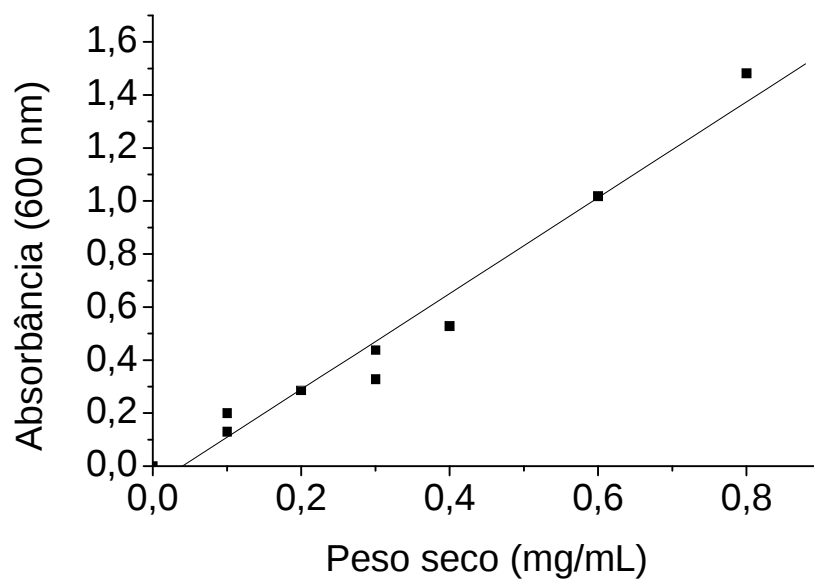
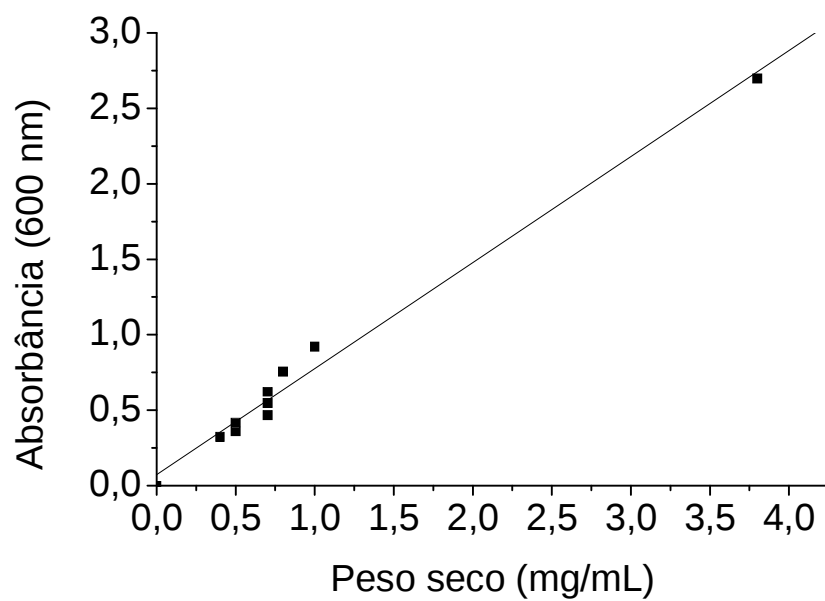


Figura A1: Curva de calibração de biomassa da cepa *Pichia kluyveri* G1.1

Equação de calibração de biomassa para *Pichia kluyveri* G1.1:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,072}{1,8075} \quad (R^2 = 0,983)$$

A2. *Pichia guilliermondii* G1.2**Figura A2:** Curva de calibração de biomassa da cepa *Pichia guilliermondii* G1.2

Equação de calibração de biomassa para *Pichia guilliermondii* G1.2:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} - 0,07242}{0,7025} \quad (R^2 = 0,993)$$

A3. *Hanseniaspora sp.* G1.3

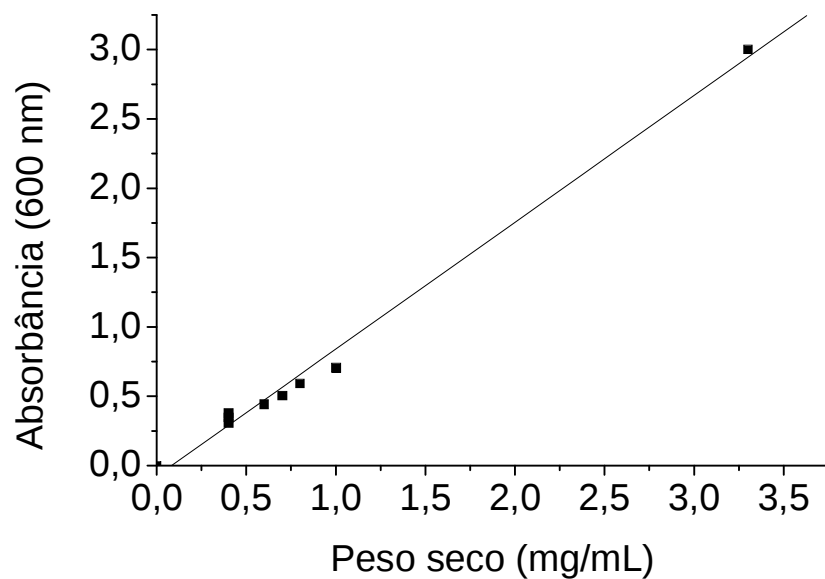


Figura A3: Curva de calibração de biomassa da cepa *Hanseniaspora sp.* G1.3

Equação de calibração de biomassa para *Hanseniaspora sp.* G1.3:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,07554}{0,91512} \quad (R^2 = 0,996)$$

A4. *Hanseniaspora sp* G2.1

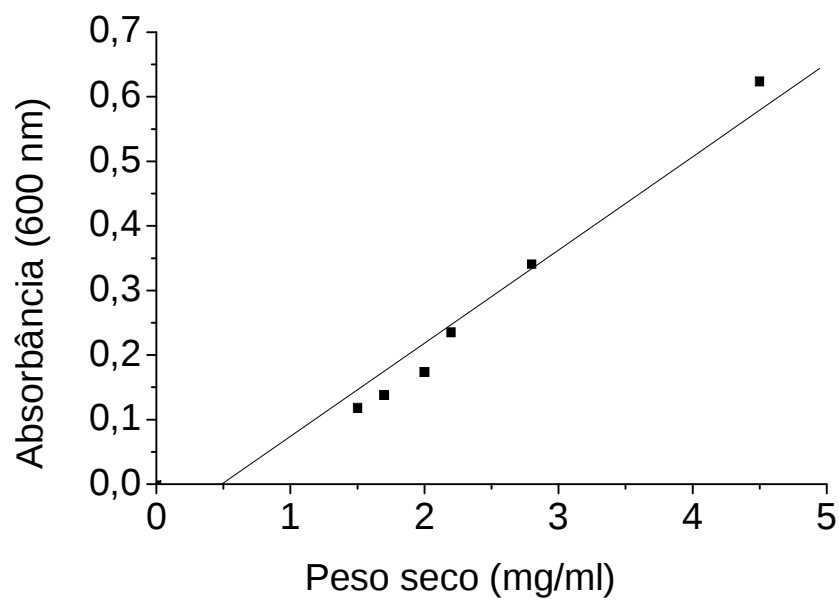


Figura A4: Curva de calibração de biomassa da cepa *Hanseniaspora sp.* G2.1

Equação de calibração de biomassa para *Hanseniaspora sp.* G2.1:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,07022}{0,14432} \quad (R^2 = 0,977)$$

A5. *Hanseniaspora sp* G4.1

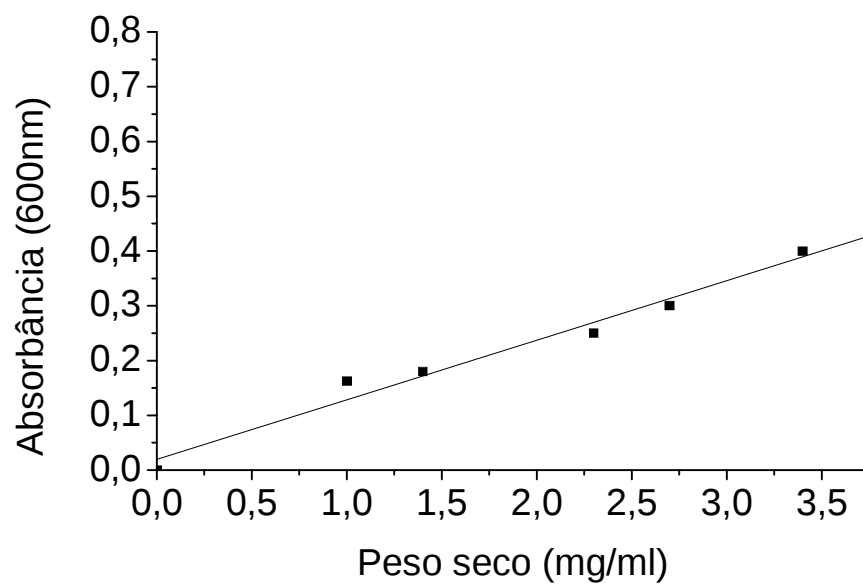


Figura A5: Curva de calibração de biomassa da cepa *Hanseniaspora sp.* G4.1

Equação de calibração de biomassa para *Hanseniaspora sp.* G4.1:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} - 0,0195}{0,1088} \quad (R^2 = 0,988)$$

A6. *Pichia guilliermondii* G4.2

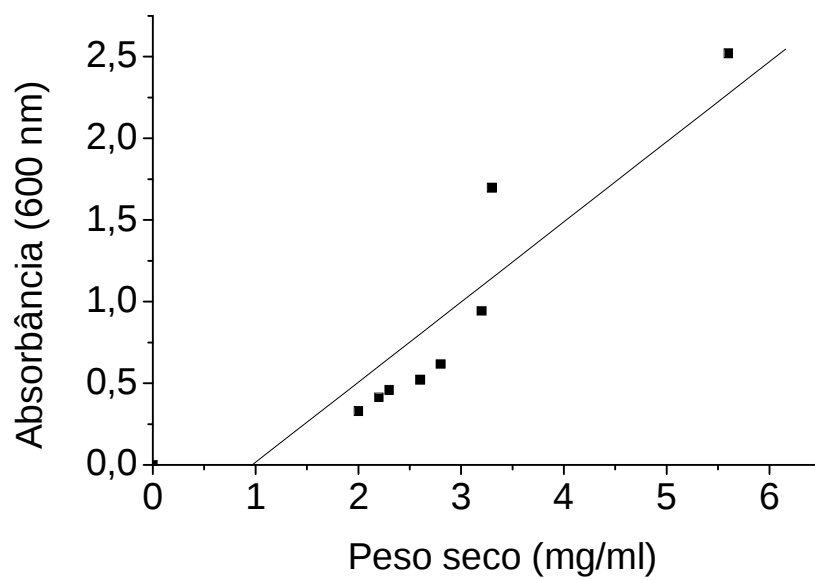


Figura A6: Curva de calibração de biomassa da cepa *Pichia guilliermondii* G4.2

Equação de calibração de biomassa para *Pichia guilliermondii* G4.2:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,47385}{0,49053} \quad (R^2 = 0,908)$$

A7. *Hanseniaspora sp* G7.1

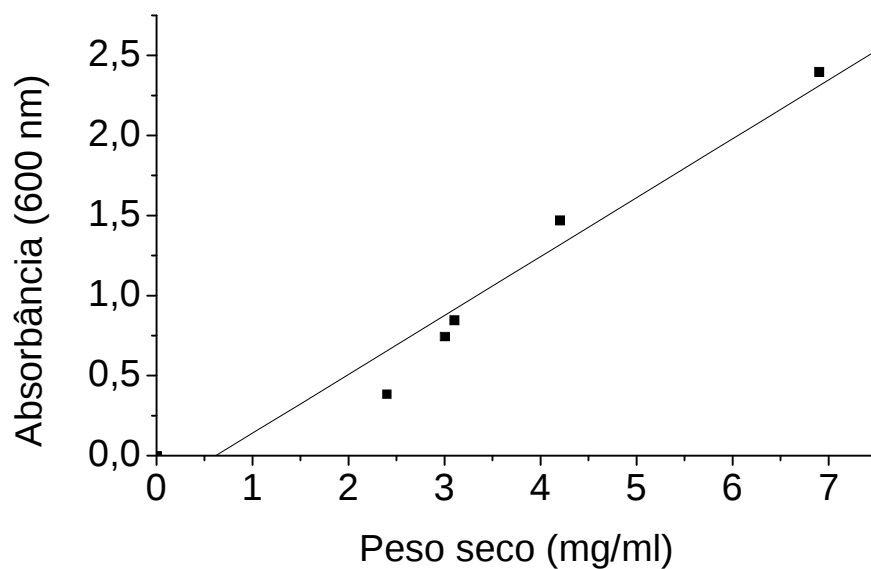


Figura A7: Curva de calibração de biomassa da cepa *Hanseniaspora sp* G7.1

Equação de calibração de biomassa para *Hanseniaspora sp* G7.1:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,22729}{0,36769} \quad (R^2 = 0,975)$$

A8. *Rhodotorula mucilaginosa* G7.2

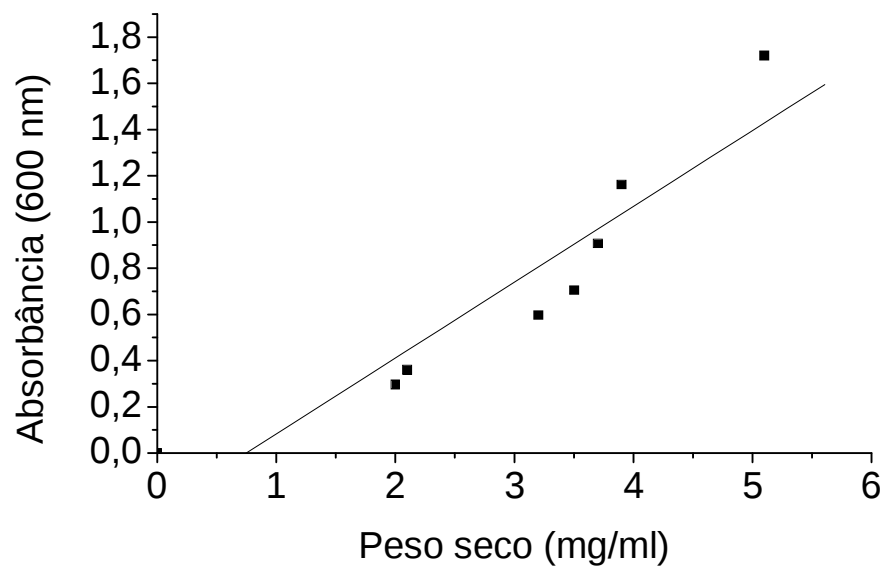
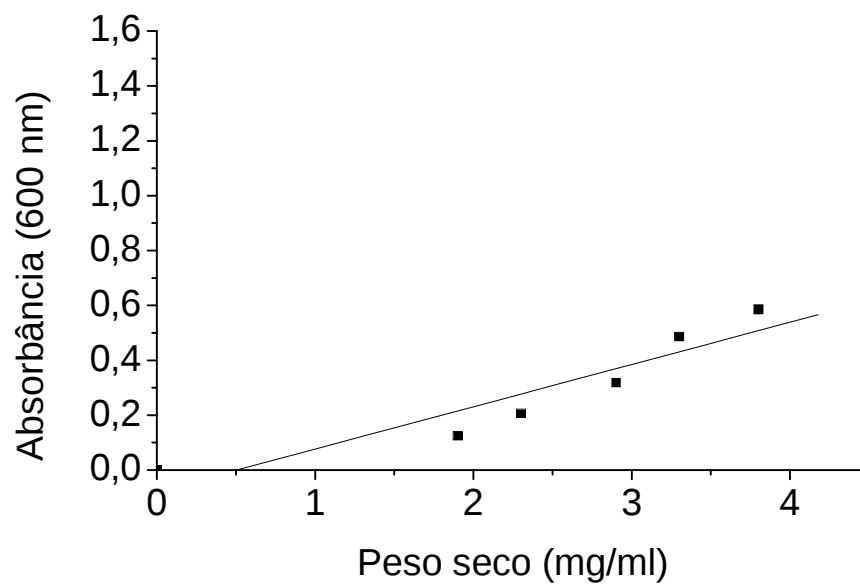


Figura A8: Curva de calibração de biomassa da cepa *Rhodotorula mucilaginosa* G7.2

Equação de calibração de biomassa para *Rhodotorula mucilaginosa* G7.2:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,24543}{0,32824} \quad (R^2 = 0,933)$$

A9. *Hanseniaspora guilliermondii* G9.1**Figura A9:** Curva de calibração de biomassa da cepa *Hanseniaspora guilliermondii* G9.1

Equação de calibração de biomassa para *Hanseniaspora guilliermondii* G9.1:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,07727}{0,15399} \quad (R^2 = 0,935)$$

A10. *Candida oleophila* G10.1

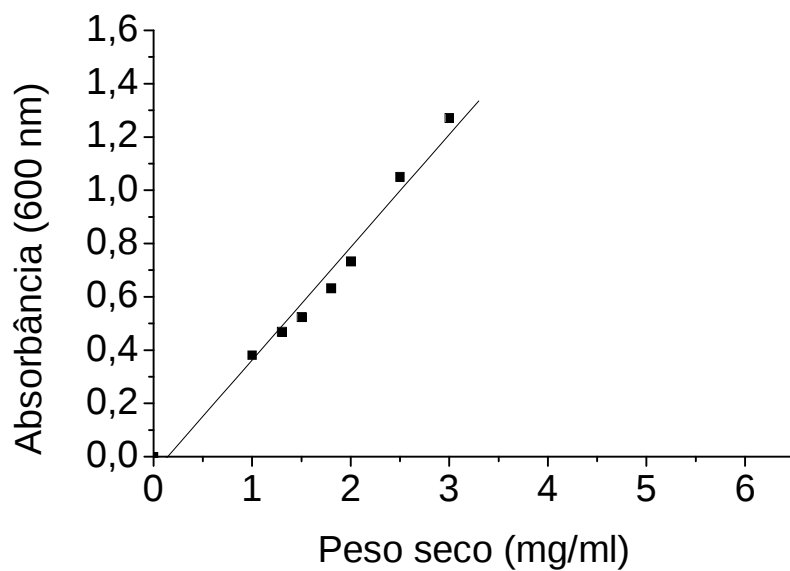


Figura A10: Curva de calibração de biomassa da cepa *Candida oleophila* G10.1

Equação de calibração de biomassa para *Candida oleophila* G10.1:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,06067}{0,42331} \quad (R^2 = 0,990)$$

A11. *Rhodotorula* sp. G10.2

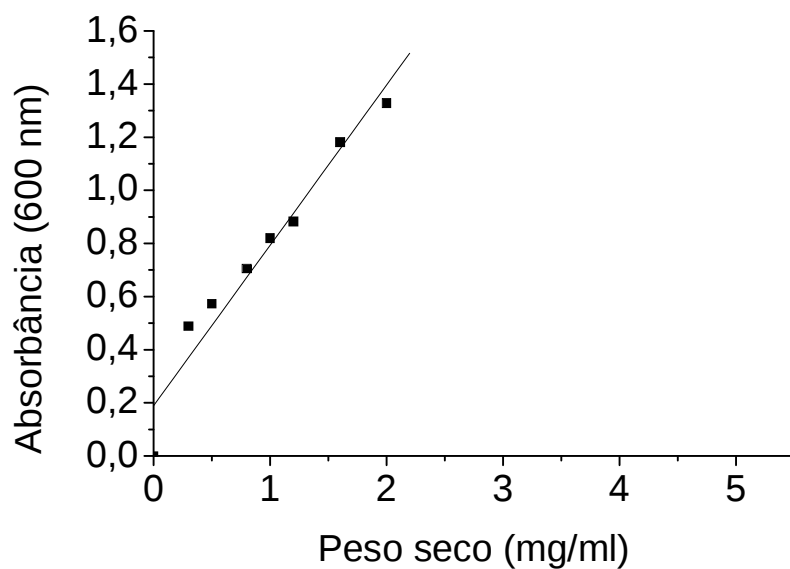


Figura A11: Curva de calibração de biomassa da cepa *Rhodotorula* sp. G10.2

Equação de calibração de biomassa para *Rhodotorula* sp.G10.2:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} - 0,18927}{0,60363} \quad (R^2 = 0,973)$$

A12. *Hanseniaspora sp.* G11.1

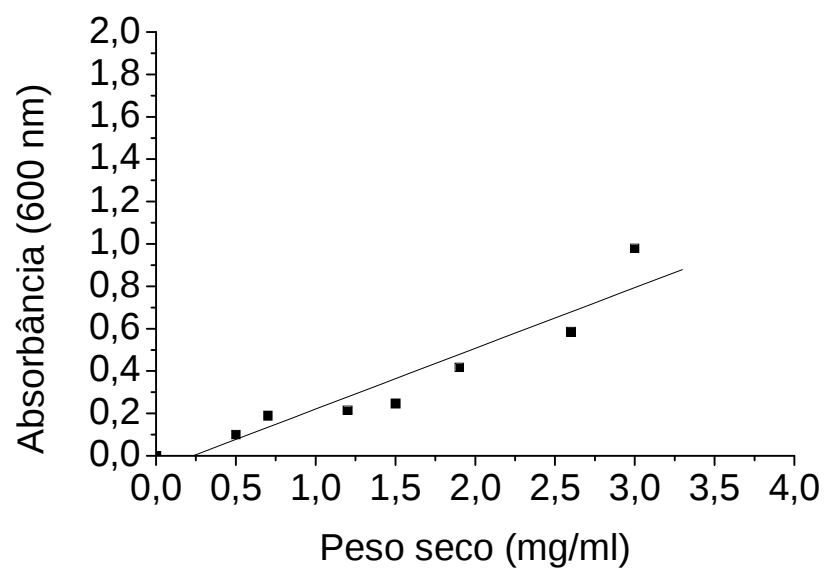


Figura A12: Curva de calibração de biomassa da cepa *Hanseniaspora sp.* G11.1

Equação de calibração de biomassa para *Hanseniaspora sp.* G11.1:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,06338}{0,28676} \quad (R^2 = 0,947)$$

A13. *Rhodotorula mucilaginosa* G11.2

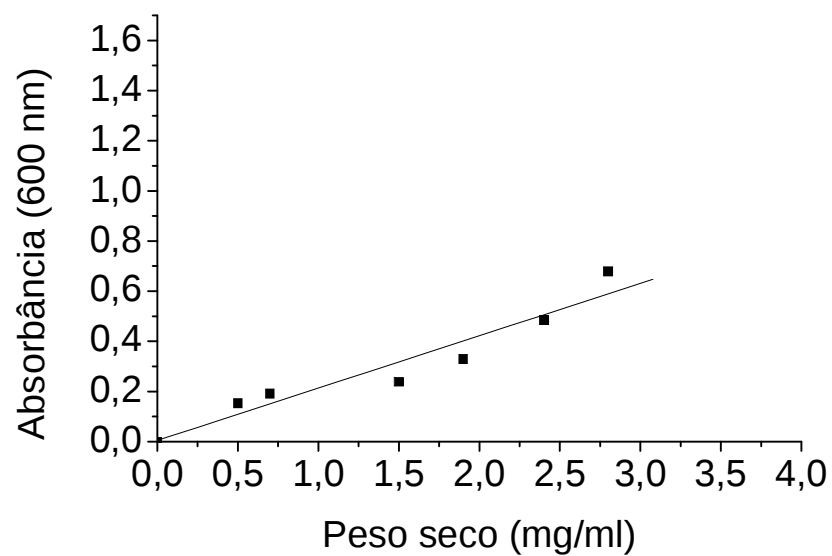


Figura A13: Curva de calibração de biomassa da cepa *Rhodotorula mucilaginosa* G11.2

Equação de calibração de biomassa para *Rhodotorula mucilaginosa*. G11.2:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} - 0,00485}{0,20878} \quad (R^2 = 0,960)$$

A14. *Hanseniaspora sp.* G13

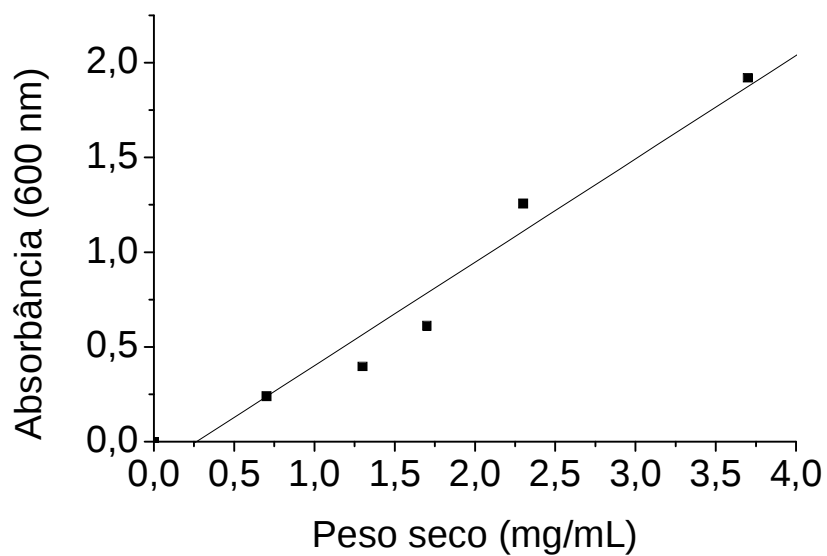


Figura A14: Curva de calibração de biomassa da cepa *Hanseniaspora sp.* G13

Equação de calibração de biomassa para *Hanseniaspora sp.* G13:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,14448}{0,54566} \quad (R^2 = 0,980)$$

A15. *Hanseniaspora* sp. G14

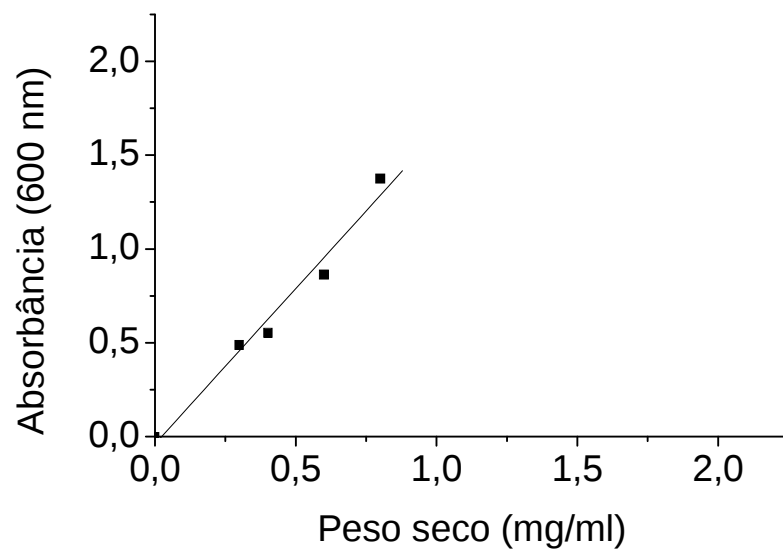


Figura A15: Curva de calibração de biomassa da cepa *Hanseniaspora* sp. G14

Equação de calibração de biomassa para *Hanseniaspora* sp. G14:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,03884}{1,65533} \quad (R^2 = 0,988)$$

A16. *Hanseniaspora* sp. G15

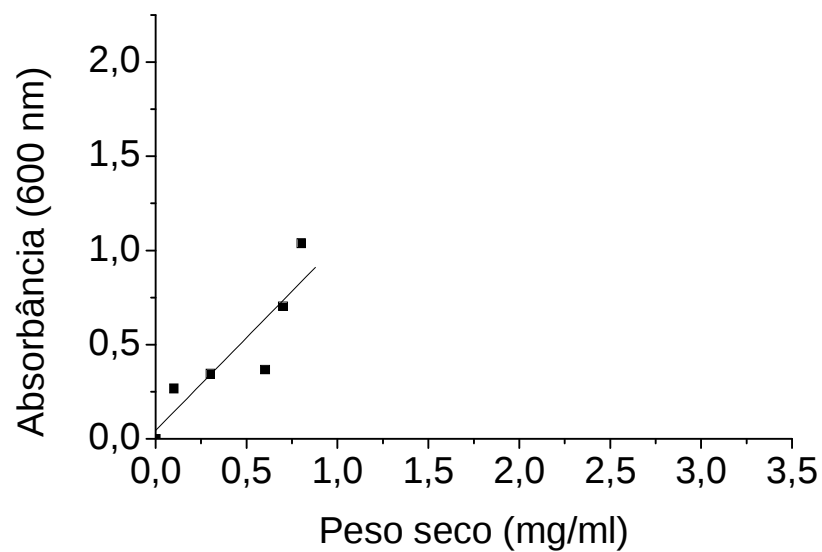


Figura A16: Curva de calibração de biomassa da cepa *Hanseniaspora* sp. G15

Equação de calibração de biomassa para *Hanseniaspora* sp. G15:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} - 0,04433}{0,9852} \quad (R^2 = 0,894)$$

A17. *Hanseniaspora* sp. G17

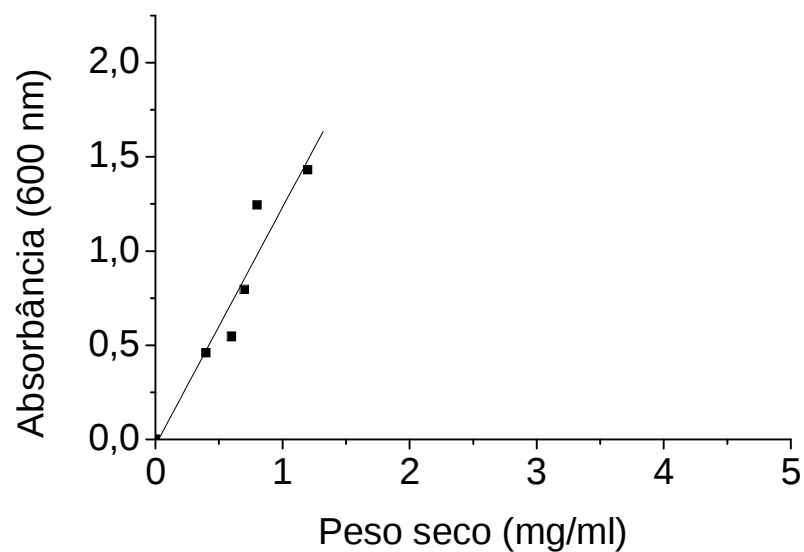


Figura A17: Curva de calibração de biomassa da cepa *Hanseniaspora* sp. G17

Equação de calibração de biomassa para *Hanseniaspora* sp. G17:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,03167}{1,26353} \quad (R^2 = 0,959)$$

A18. *Metschnikowia koreensis* G18

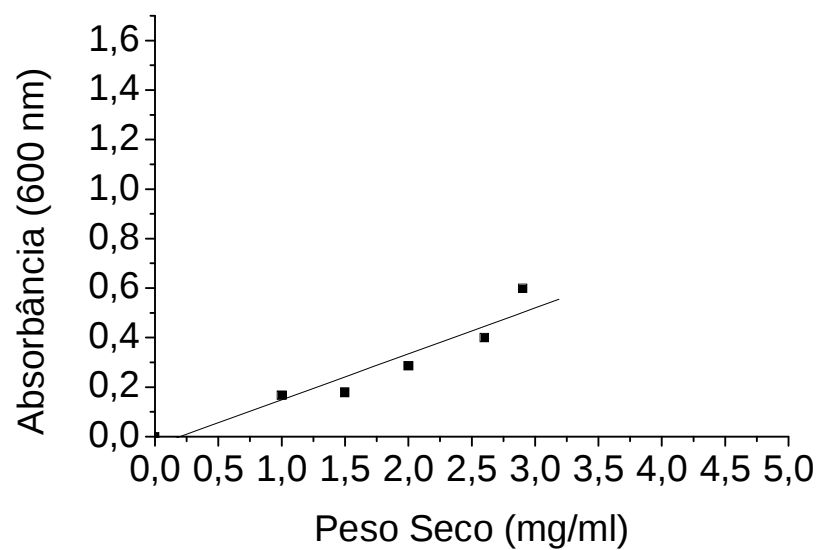


Figura A18: Curva de calibração de biomassa da cepa *Metschnikowia koreensis* G18

Equação de calibração de biomassa para *Metschnikowia koreensis* G18:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,0366}{0,18546} \quad (R^2 = 0,954)$$

A19. *Aureobasidium pullulans* G19

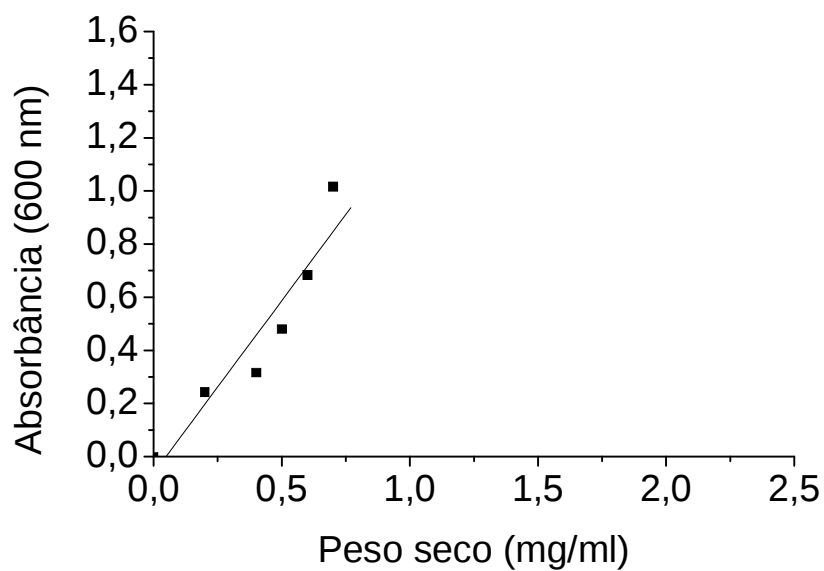


Figura A19: Curva de calibração de biomassa da cepa *Aureobasidium pullulans* G19

Equação de calibração de biomassa para *Aureobasidium pullulans* G19:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,06246}{1,29824} \quad (R^2 = 0,946)$$

A20. *Issatchenkia terricola* G20

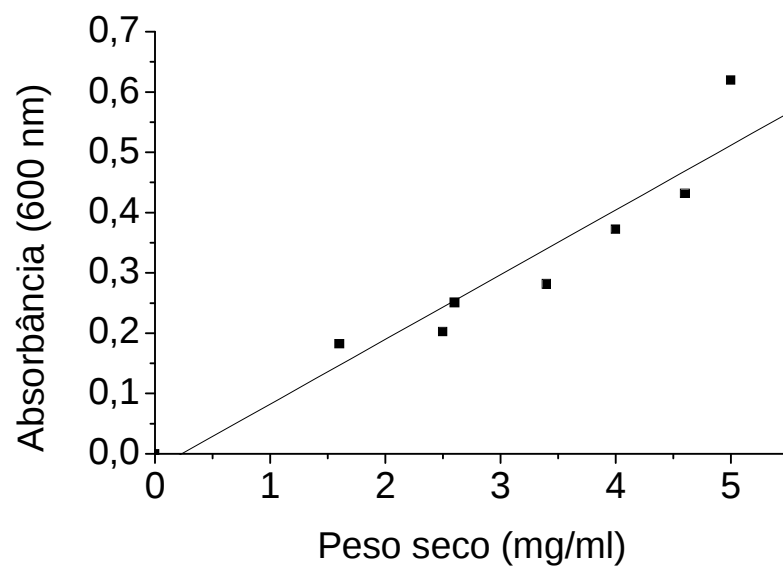


Figura A20: Curva de calibração de biomassa da cepa *Issatchenkia terricola* G20

Equação de calibração de biomassa para *Issatchenkia terricola* G20:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,02482}{0,10728} \quad (R^2 = 0,955)$$

A21. *Trichosporon multisporon* 1A-10

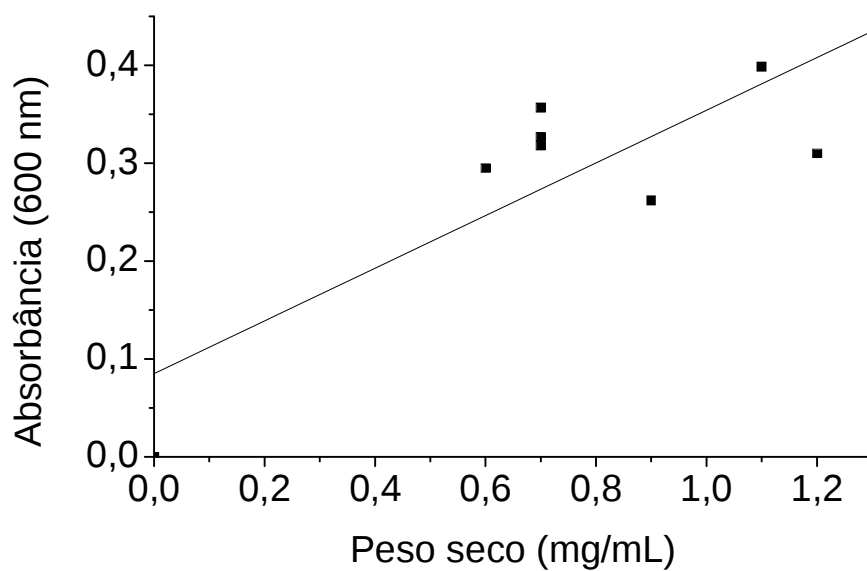


Figura A21: Curva de calibração de biomassa da cepa *Trichosporon multisporon* 1A-10

Equação de calibração de biomassa para *Trichosporon multisporon* 1A-10:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} - 0,08517}{0,26892} \quad (R^2 = 0,810)$$

A22. *Trichosporon laibachii* 1A-8

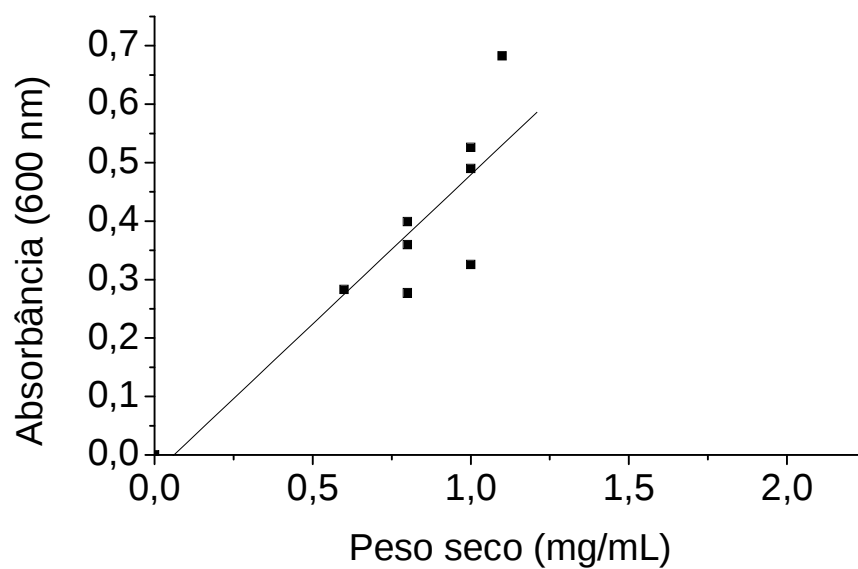


Figura A22: Curva de calibração de biomassa da cepa *Trichosporon laibachii* 1A-8

Equação de calibração de biomassa para *Trichosporon laibachii* 1A-8:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} + 0,03124}{0,51059} \quad (R^2 = 0,890)$$

A23. *Pichia ofunaensis* 1A-14

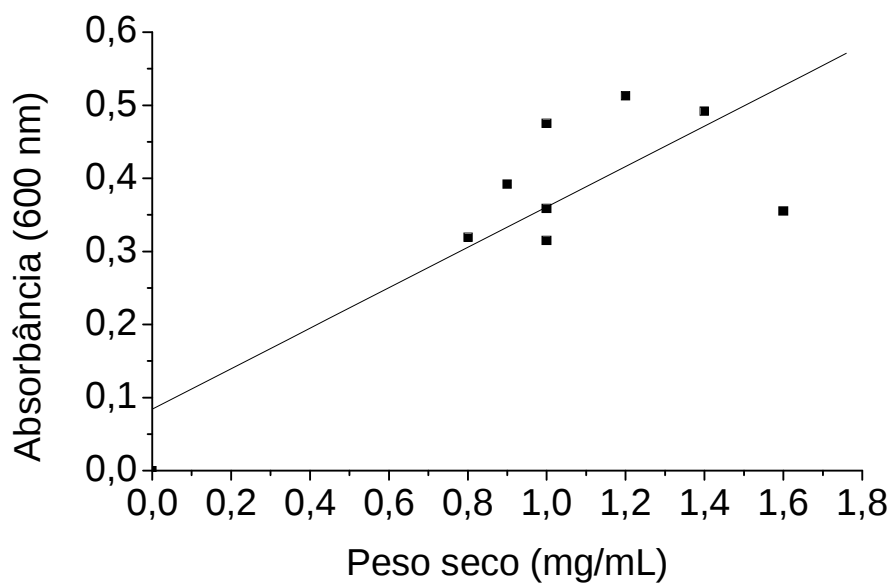


Figura A23: Curva de calibração de biomassa da cepa *Pichia ofunaensis* 1A-14

Equação de calibração de biomassa para *Pichia ofunaensis* 1A-14:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} - 0,08415}{0,2767} \quad (R^2 = 0,809)$$

A24. *Candida shehatae* BR6-2AY

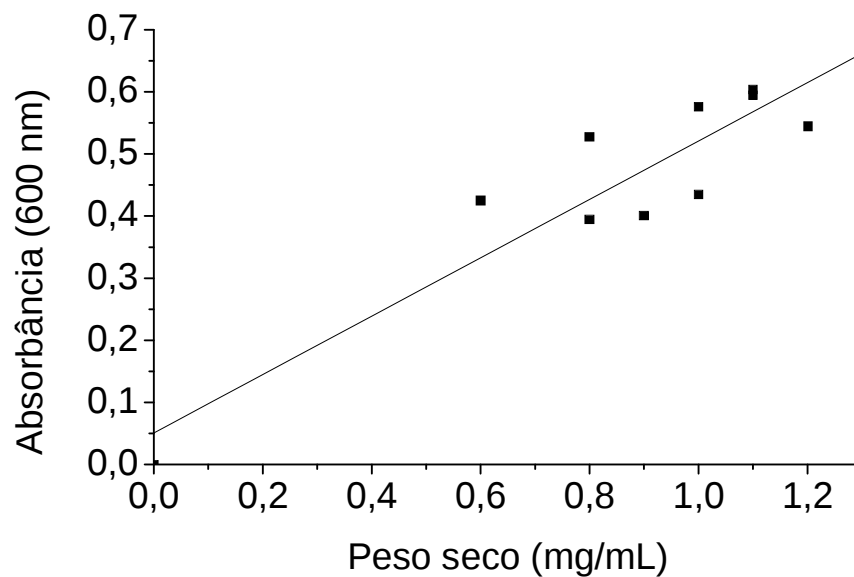


Figura A24: Curva de calibração de biomassa da cepa *Candida shehatae* BR6-2AY

Equação de calibração de biomassa para *Candida shehatae* BR6-2AY:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} - 0,05088}{0,46991} \quad (R^2 = 0,918)$$

A25. *Candida shehatae* BR6-2AI

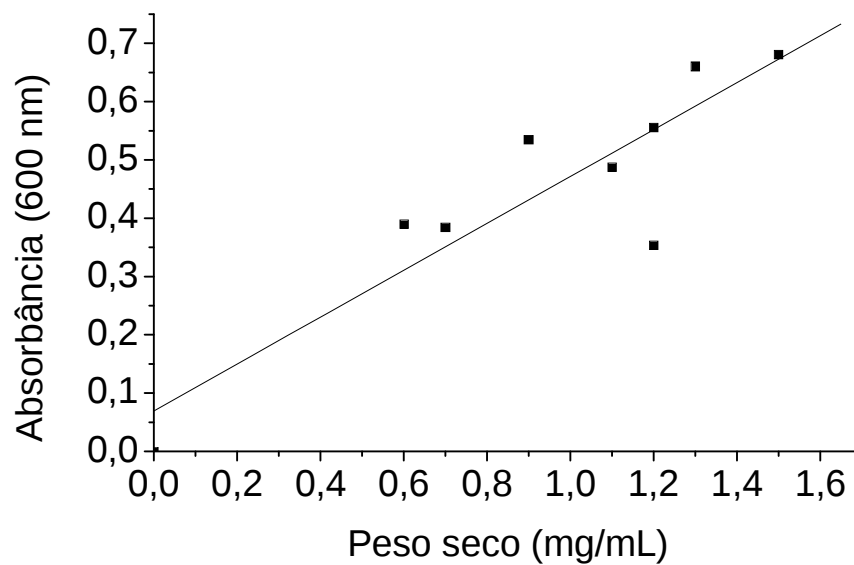


Figura A25: Curva de calibração de biomassa da cepa *Candida shehatae* BR6-2AI

Equação de calibração de biomassa para *Candida shehatae* BR6-2AI:

$$\text{Peso seco (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância a 600 nm} - 0,06933}{0,40224} \quad (R^2 = 0,894)$$