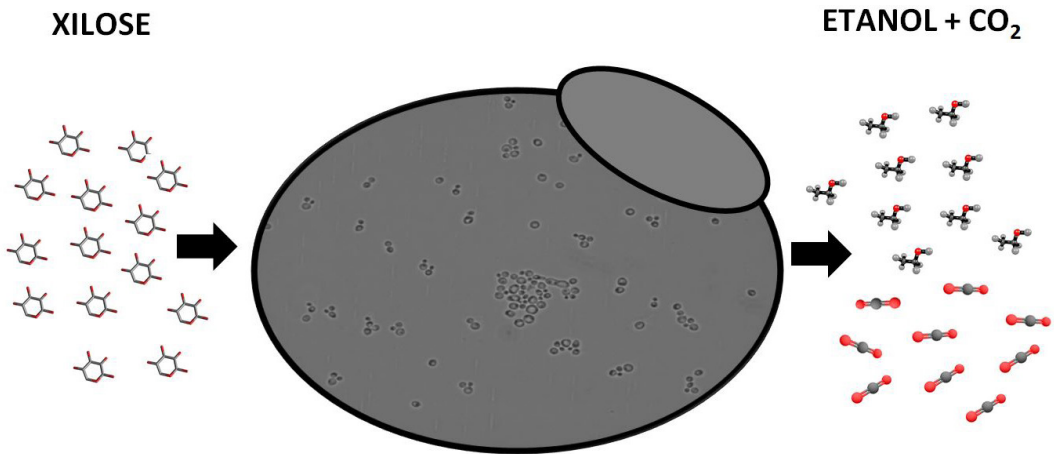


Avaliação Comparativa da Capacidade Fermentativa de Diferentes Leveduras que Consomem Xilose



ISSN 2177-0395

Novembro, 2017

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroenergia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 07

Avaliação Comparativa da Capacidade Fermentativa de Diferentes Leveduras que Consumem Xilose

Henrique César Teixeira Veras
Nádia Skorupa Parachin
João Ricardo Moreira de Almeida

Embrapa Agroenergia
Brasília, DF
2017

Embrapa Agroenergia

Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº.
Ed. Embrapa Agroenergia.
Caixa Postal 40315.
CEP 70770-901, Brasília, DF.
Fone: + 55 (61) 3448-158
Fax: + 55(61)3448-1589
www.embrapa.br
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Alexandre Alonso Alves*

Secretária-executiva: *Marcia Mitiko O. Esquiagola*

Membros: *André Pereira Leão*

Bruno Galvêas Laviola

Emerson Leo Schultz

Luciane Chedid Melo Borges

Maria Iara Pereira Machado

Rosana Falcão

Sílvia Belém Gonçalves

Supervisão editorial e revisão de texto

Luciane Chedid Melo Borges

Normalização bibliográfica

Maria Iara Pereira Machado

Editoração eletrônica e capa

Maria Goreti Braga dos Santos

Figura da capa: *Henrique César*

Teixeira Veras

1ª edição

Publicação digitalizada (2017)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroenergia

Avaliação comparativa da capacidade fermentativa de diferentes leveduras que consomem xilose / autores, Henrique César Teixeira Veras ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2017.

26 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroenergia, INSS 2177-0395 ; 07)

Disponível no endereço eletrônico: www.embrapa.br/agroenergia/publicacoes

1. Fermentação de xilose. 2. Xilose redutase. 3. Bioetanol. 4. Levedura. 5. Disponibilidade de oxigênio. I. Veras, Henrique César Teixeira. II. Série.

662.88 – CDD 22.

© Embrapa 2017

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e métodos	11
Resultados e discussão	14
Conclusões	22
Referências	23

Avaliação Comparativa da Capacidade Fermentativa de Diferentes Leveduras que Consomem Xilose¹

Henrique César Teixeira Veras²

Nádia Skorupa Parachin³

João Ricardo Moreira de Almeida⁴

Resumo

Compreender os efeitos dos níveis de oxigênio no metabolismo de xilose em leveduras beneficiaria a produção de etanol. Neste trabalho, a capacidade fermentativa de xilose de *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum*, *S. arborariae* e *Candida tenuis* foi sistematicamente comparada sob condições aeróbicas, de limitação de oxigênio e anaeróbicas. O desempenho fermentativo das quatro leveduras foi fortemente influenciado pela disponibilidade de oxigênio. *S. stipitis* e *S. passalidarum* apresentaram os maiores rendimentos de etanol (acima de 0,44 g g⁻¹) sob limitação de oxigênio. No entanto, *S. passalidarum* produziu 1,5 vez mais etanol do que *S. stipitis* sob anaerobiose. Enquanto *C. tenuis* mostrou a menor taxa de consumo de xilose e incapacidade de produzir etanol, *S. arborariae* mostrou um desempenho fermentativo intermediário entre as leveduras. A atividade da xilose redutase (XR) dependente de NAD(P)H em extratos de células

¹ Este Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento é uma versão do artigo: VERAS, H. C. T. ; PARACHIN, N. S. ; ALMEIDA, J. R. M. Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. **Microbial Cell Factories**, v. 16, p. 153, 2017.

² Biólogo, doutorando em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), Bolsista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

³ Bióloga, doutora em Engenharia Metabólica, professora da Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

⁴ Biólogo, doutor em Microbiologia Aplicada, pesquisador da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

brutas correlacionou-se com taxas de consumo de xilose e produção de etanol. No geral, o presente trabalho demonstra que a disponibilidade de oxigênio influencia a produção de etanol por leveduras e indica que a atividade XR dependente de NADH é um passo limitante no metabolismo da xilose. *S. stipitis* e *S. passalidarum* têm o maior potencial de produção de etanol a partir da xilose. Ambas as leveduras mostraram rendimentos semelhantes de etanol próximos a teóricos sob condição limitada de oxigênio. Além disso, *S. passalidarum* apresentou o melhor consumo de xilose e produção de etanol sob anaerobiose.

Termos para indexação: fermentação de xilose, xilose redutase, bioetanol, levedura, disponibilidade de oxigênio.

Comparative Assessment of Fermentative Capacity of Different Xylose-Consuming Yeasts

Abstract

Understanding the effects of oxygen levels on yeast xylose metabolism would benefit ethanol production. In this work, xylose fermentative capacity of *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum*, *S. arborariae* and *Candida tenuis* was systematically compared under aerobic, oxygen-limited and anaerobic conditions. Fermentative performances of the four yeasts were greatly influenced by oxygen availability. *S. stipitis* and *S. passalidarum* showed the highest ethanol yields (above 0.44 g g⁻¹) under oxygen limitation. However, *S. passalidarum* produced 1.5 times more ethanol than *S. stipitis* under anaerobiosis. While *C. tenuis* showed the lowest xylose consumption rate and incapacity to produce ethanol, *S. arborariae* showed an intermediate fermentative performance among the yeasts. NAD(P)H xylose reductase (XR) activity in crude cell extracts correlated with xylose consumption rates and ethanol production. Overall, the present work demonstrates that the availability of oxygen influences the production of ethanol by yeasts and indicates that the NADH-dependent XR activity is a limiting step on the xylose metabolism. *S. stipitis* and *S. passalidarum* have the greatest potential for ethanol production from xylose. Both yeasts showed similar ethanol yields near theoretical under oxygen-limited condition. Besides that, *S. passalidarum* showed the best xylose consumption and ethanol production under anaerobiosis.

Index terms: xylose fermentation, xylose reductase, bioethanol, yeast fermentation, oxygen availability.

Introdução

A conversão de todos os açúcares presentes nas frações de celulose e hemicelulose da biomassa aumentaria a produção e diminuiria o custo do etanol de segunda geração (HOU, 2012; ARORA et al., 2015). *Saccharomyces cerevisiae* é a principal levedura utilizada na produção de álcool em todo o mundo, mas não consegue produzir etanol a partir da xilose, o segundo açúcar mais abundante na natureza, a menos que seja geneticamente modificada (MOYSES et al., 2016; SKORUPA-PARACHIN et al., 2011). Apesar do sucesso relativo das cepas recombinantes de *S. cerevisiae*, estas mostram taxas de fermentação menores e menor tolerância aos inibidores de fermentação quando fermentam xilose em vez de glicose (KUYPERS et al., 2005; LI et al., 2015). Assim, o isolamento, a identificação e a caracterização de leveduras nativas fermentadoras de xilose têm recebido grande atenção nos últimos anos (CADETE et al., 2009; CADETE et al., 2013; JEFFRIES et al., 2007; KRAHULEC et al., 2012; NGUYEN et al., 2006; WOLHBACH et al., 2011).

Entre as poucas espécies de leveduras naturalmente fermentadoras de xilose, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* é uma das mais estudadas (KRAHULEC et al., 2012; JEFFRIES et al., 2007; PARAMBIL; SARKAR, 2014). Foi isolada do intestino de insetos e sua capacidade de fermentação foi avaliada em diferentes hidrolisados lignocelulósicos (SLININGER et al., 2015). Mais recentemente, as leveduras dos gêneros *Spathaspora* e *Candida*, como *S. passalidarum*, *S. arborariae* e *C. tenuis* foram isoladas de amostras de madeira podre ou de insetos que vivem de madeira e caracterizadas como leveduras fermentadoras de xilose (CADETE et al., 2009; NGUYEN et al., 2006; WOHLBACH et al., 2011). Tal como *S. stipitis*, *S. passalidarum* apresentou rendimentos de fermentação de xilose acima de 0,40 g de etanol por g de açúcar tanto em meio definido como em hidrolisado lignocelulósico (LONG et al., 2012; SLININGER et al., 2015). Em geral, as leveduras que naturalmente fermentam xilose são capazes de fermentar a xilose

somente quando o fluxo de oxigênio é bem regulado. O alto nível de oxigenação leva ao crescimento aeróbio e ao baixo rendimento de etanol, enquanto o oxigênio dissolvido limitado diminui a taxa de fermentação e aumenta a acumulação de xilitol, provocando uma baixa produtividade de etanol (HOUX, 2012; JEFFRIES et al., 2007; LONG et al., 2012; SKOOG; HAHN-HAGERDAL, 1990; SU et al., 2014).

Nas leveduras, a xilose é primeiro reduzida a xilitol, uma reação catalisada por uma xilose redutase (XR) dependente de NAD(P)H. Então, uma xilitol desidrogenase (XDH) dependente de NAD⁺ oxida xilitol em xilulose (BRUINENBERG et al., 1984; JEFFRIES; JIN, 2004; CADETE et al., 2016). Posteriormente, a xilulose entra na via das pentoses fosfato e glicólise, sendo finalmente convertida em etanol. Recentemente, foi demonstrado que *S. passalidarum* possui, excepcionalmente, duas XRs, e uma delas preferencialmente usa NADH como cofator (CADETE et al., 2016).

Como condições fermentativas, tais como composição de meio, densidade celular e disponibilidade de oxigênio, são geralmente diferentes (HOUX, 2012; WOHLBACH et al., 2011; CADETE et al., 2016), uma avaliação comparativa entre leveduras que consomem xilose com base em dados da literatura torna-se difícil. Além disso, poucos estudos sobre fisiologia de *C. tenuis* e *S. arborariae* estão disponíveis (WOHLBACH et al., 2011; CADETE et al., 2016; CADETE et al., 2012). Assim, uma comparação sistemática da fisiologia fermentativa de *S. stipitis*, *S. passalidarum*, *S. arborariae* e *C. tenuis* ainda não foi realizada e pode ajudar a elucidar passos importantes no metabolismo da xilose.

O objetivo deste estudo foi comparar a capacidade fermentativa alcoólica de quatro leveduras naturalmente consumidoras de xilose em diferentes condições de oxigenação. A fisiologia de *S. stipitis*, *S. passalidarum*, *S. arborariae* e *C. tenuis* em meio mineral definido contendo xilose como única fonte de carbono foi avaliada em condições aeróbicas, com limitação de oxigênio e anaeróbicas. Os resultados distinguem claramente a levedura com melhor desempenho para cada

condição e ressalta a importância do uso de diferentes cofatores na produção de etanol a partir da xilose.

Material e métodos

Linhagens

As leveduras empregadas neste estudo foram *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124, *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907, *Spathaspora arboraria* NRRL Y-48658 e *Candida tenuis* NRRL Y-1498. Todas as leveduras foram preservadas em 30% de glicerol a -80 °C.

Fermentações de xilose sob diferentes condições de oxigênio

Os experimentos de fermentação de xilose foram realizados em biorreatores (Multifors 2, Infors HT) com 500 mL de volume de trabalho. As células de um estoque a -80 °C foram inicialmente cultivadas em meio YPD sólido (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona, 20 g L⁻¹ de glicose), durante a noite a 28 °C. Uma única colônia foi utilizada para inocular 50 mL de meio mineral definido (VERDUYN et al., 1992), contendo por litro: (NH₄)₂SO₄, 12,5 g; KH₂PO₄, 7,5 g; MgSO₄·7H₂O, 1,25 g; EDTA, 37,5 mg; ZnSO₄·7H₂O, 11,25 mg; MnCl₂·2H₂O, 2,5 mg; CoCl₂·6H₂O, 0,75 mg; CuSO₄·5H₂O, 0,75 mg; Na₂MoO₄·H₂O, 1,0 mg; CaCl₂·2H₂O, 11,25 mg; FeSO₄·7H₂O, 7,5 mg; H₃BO₃, 2,5 mg; KI, 0,25 mg. As vitaminas esterilizadas por filtragem foram adicionadas ao meio após esterilização por calor. As concentrações finais de vitamina por litro foram: biotina, 0,125 mg; Ca-pantotenato 2,5 mg; ácido nicotínico 2,5 mg; inositol 62,5 mg; tiamina-HCl 2,5 mg; piridoxina-HCl 2,5 mg; ácido p-aminobenzóico 0,5 mg; riboflavina 0,5 g e; ácido fólico 0,005 g. A fonte de carbono consistiu em 40 g L⁻¹ de xilose.

O cultivo no biorreator foi iniciado com OD_{600nm} de 0,5. As culturas foram mantidas com pH 5,5, por adição de KOH 3 M, sob agitação – agitador a 400 rpm e temperatura de 28 °C. Primeiro, o desempenho das leveduras foi avaliado sob condições aeróbicas e com oxigênio limitado. Para experiências aeróbicas, o ar sintético (20% de oxigênio puro e 80% de nitrogênio puro) foi injetado no reator a 0,5 L/min. O oxigênio dissolvido medido no reator (Sensors METTLER TOLEDO) foi superior a 60% durante todo o período de fermentação. Para os experimentos com limitação de oxigênio, o fluxo de ar sintético foi ajustado para 0,05 L/min, o que resultou em oxigênio dissolvido abaixo de 10% nas primeiras 10 horas de fermentação e zero depois disso. Mas o fluxo de ar foi mantido constante em uma taxa mínima, indicando que todo o oxigênio que estava entrando no biorreator foi prontamente consumido. Todas as fermentações foram realizadas em triplicadas biológicas.

As fermentações anaeróbicas com as quatro leveduras foram realizadas em frascos tipo penicilina selados com tampas de borracha, equipados com uma agulha para remoção de dióxido de carbono. As células de uma reserva de -80 °C foram inicialmente cultivadas em meio YPD sólido, durante a noite a 28 °C. Uma única colônia foi utilizada para inocular 50 mL de meio mineral definido como descrito acima. A cultura começou com densidade celular igual a OD_{600nm} de 2.0. O pH foi ajustado para 5,5 e os frascos foram incubados sob agitação – agitador a 400 rpm e temperatura de 28 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas.

Métodos analíticos

Para monitorar o crescimento das leveduras, as amostras foram retiradas regularmente durante as fermentações e a biomassa foi medida por densidade óptica a 600 nm, com utilização de espectrofotômetro (SpectraMax® M3, Molecular Devices). Para a medição do peso seco celular, foram retirados e centrifugados (12.000 xg, 5 min) 5 mL da cultura de pré-inóculo e da fase estacionária do crescimento durante todas as fermentações. Antes

da pesagem, o sedimento foi incubado em tubo de vidro durante pelo menos 48 h a 60 °C. O peso seco das células foi correlacionado com OD600 nm medido nos mesmos intervalos de tempo. Cada medida foi realizada em duplicata.

O consumo de açúcar e os produtos formados durante as experiências de fermentação foram medidos usando um sistema de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Inicialmente, as amostras retiradas regularmente durante as fermentações foram centrifugadas (12.000 xg, 5 min) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. As concentrações de xilose, xilitol, glicerol, acetato e etanol em sobrenadantes foram medidas pelo sistema HPLC (Acquity UPLC H Class, Waters), equipado com um detector de índice de refração e uma coluna Aminex® HPX-87H (Bio-Rad) a 45 °C. A fase móvel foi ácido sulfúrico 5 mM a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min. Os resultados são apresentados como média \pm desvios-padrão.

Ensaio enzimático para XR e XDH

A atividade enzimática da xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) em extratos brutos de células foi medida de acordo com (SMILEY; BOLEN, 1982). Para isso, foram coletados 5 mL de suspensão celular de *S. stipitis*, *S. passalidarum*, *S. arborariae* e *C. tenuis* no meio da fase exponencial de crescimento durante fermentações aeróbicas e limitadas de oxigênio. As células foram sedimentadas por centrifugação, lavadas com água estéril e lisadas com Y-PER® Reagente de Extração de Proteínas de Leveduras (Pierce, Rockford, EUA), para obter extratos brutos. As concentrações de proteína nos extratos brutos foram determinadas pelo Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories Ltda., EUA), seguindo as instruções do fabricante.

A mistura reacional de XR continha tampão de trietanolamina 100 mM (pH 7,0), NADH 0,2 mM ou NADPH, xilose 350 mM. A reação de XDH continha tampão de trietanolamina 100 mM (pH 7,0), NAD⁺ 0,3 mM, xilitol 300 mM. Todas as reações foram iniciadas com adição de

substratos limitantes. Os ensaios foram realizados a 30 °C e a oxidação de NADH / NADPH e a redução de NAD⁺ foram seguidas com a alteração na absorbância a 340 nm. O valor de 6,22 mL/(μ mol*cm) foi utilizado como o coeficiente de absorção molar de coenzimas por minuto. As atividades específicas de XR e XDH foram administradas em unidades por mg de proteína (U mg⁻¹). A unidade enzimática é definida como um μ mol de cofator reduzido ou oxidado por minuto. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados são mostrados como médias \pm desvios-padrão.

Resultados e discussão

Fermentação de xilose em meio mineral definido

A capacidade de fermentação das quatro leveduras que consumiram xilose naturalmente, *S. stipitis*, *S. passalidarum*, *S. arborariae* e *C. tenuis* foram avaliadas em condições aeróbicas, com limitação de oxigênio e anaeróbicas. O consumo de xilose variou consideravelmente entre as quatro leveduras, tanto sob condições aeróbicas quanto com oxigênio limitado (Figura 1). *S. stipitis*, *S. passalidarum* e *S. arborariae* foram capazes de consumir completamente a xilose e apresentaram taxa de consumo de xilose específica pelo menos seis vezes maior do que *C. tenuis* sob condição aeróbica (Figura 1, Tabela 1). Mesmo depois de mais de 120 horas de fermentação, *C. tenuis* consumiu cerca de 34 g L⁻¹ e 28 g L⁻¹ de xilose sob condições aeróbicas e limitadas de oxigênio, respectivamente (Figura 1d). Quando cultivada sob limitação de oxigênio, *S. stipitis* e *S. passalidarum* apresentaram taxas de consumo semelhantes de xilose, porém a taxa foi duas vezes menor para *S. arborariae* (Tabela 1). Como esperado, os rendimentos de biomassa sob condição aeróbica para todas as leveduras foram duas vezes maiores que sob condições limitadas de oxigênio. No entanto, o rendimento de biomassa foi duas vezes maior para *S. passalidarum* do que *S. stipitis*. Isso pode explicar a menor taxa de produtividade

de etanol dessa levedura em comparação com *S. stipitis* sob condição aeróbica (Tabela 1).

O crescimento e a produção de etanol por essas leveduras foram fortemente influenciados pela disponibilidade de oxigênio. A formação de biomassa foi favorecida na presença de oxigênio, enquanto a produção de etanol foi favorecida sob uma menor disponibilidade de oxigênio. A biomassa produzida variou de um mínimo de 6,7 g L⁻¹ para *S. stipitis* até um máximo de 13,9 g L⁻¹ para *C. tenuis* sob condição aeróbica (Figura 1). Apesar da variação na biomassa total, a taxa de crescimento específico de *S. stipitis*, *S. passalidarum* e *S. arborariae* variou de 0,15 h⁻¹ a 0,18 h⁻¹. Essa taxa é cerca de duas vezes maior do que a de *C. tenuis* em condições aeróbicas, que atingiu uma taxa de crescimento específica de 0,08 h⁻¹. A formação de biomassa foi cerca de duas vezes menor sob condição de oxigênio limitado do que em condição aeróbica, variando de 3,0 g L⁻¹ a 7,0 g L⁻¹ (Figura 1). Em condições anaeróbicas, a formação máxima de biomassa alcançada foi de 3,5 g L⁻¹ para *S. stipitis*, 2,4 g L⁻¹ para *S. passalidarum*, 1,3 g L⁻¹ para *S. arborariae* e 1,2 g L⁻¹ para *C. tenuis* (Figura 2).

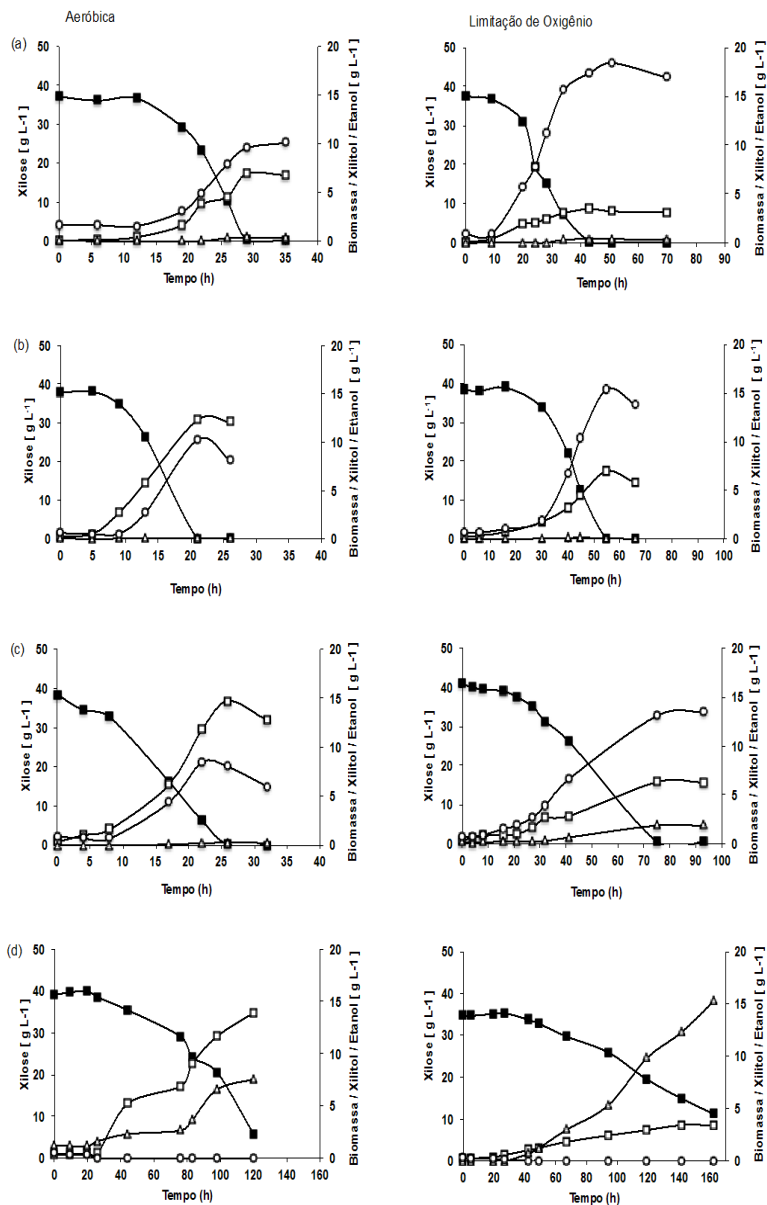


Figura 1. Fermentação com xilose sob diferentes condições de nível de oxigênio.

Esquerda: aeróbica, e direita: limitada em oxigênio. *S. stipitis* (a); *S. passalidarum* (b); *S. arborariae* (c) e; *C. tenuis* (d). Xilose (quadrado fechado), biomassa (quadrado aberto), xilitol (triângulo aberto) e etanol (círculo aberto). As diferentes escalas no eixo x destacam diferentes taxas de fermentação.

Tabela 1. Parâmetros calculados para a fermentação de xilose*.

Leveduras	Condições	Xilitol		Etanol		Rendimento		Rendimento		Consumo		Produtividade	
		Produzido [g L ⁻¹]	Produzido [g L ⁻¹]	Produzido [g L ⁻¹]	Produzido [g L ⁻¹]	Xilitol [Y _{xib} (g g ⁻¹)]	Etilol [Y _{etis} (g g ⁻¹)]	Biomassa [Y _{bis} (g g ⁻¹)]	Xilose [(g g ⁻¹ cdw h ⁻¹)]	Etilol [(g g ⁻¹ cdw h ⁻¹)]			
<i>S. stipitis</i>		0,41 ± 0,06	8,05 ± 0,91	0,01 ± 0,00	0,24 ± 0,02	0,16 ± 0,04	0,30 ± 0,09	0,08 ± 0,03					
<i>S. passalidarum</i>		0,04 ± 0,00	10,06 ± 0,48	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,04 ± 0,01					
<i>S. arborariae</i>	Aeróbica	0,27 ± 0,08	8,65 ± 1,16	0,01 ± 0,00	0,25 ± 0,02	0,31 ± 0,05	0,13 ± 0,02	0,03 ± 0,01					
<i>C. tenuis</i>		8,03 ± 1,48	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,43 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00					
<i>S. stipitis</i>		0,37 ± 0,01	16,48 ± 0,83	0,01 ± 0,00	0,45 ± 0,04	0,09 ± 0,02	0,29 ± 0,09	0,10 ± 0,02					
<i>S. passalidarum</i>	Limitação de	0,05 ± 0,02	16,36 ± 1,40	0,00 ± 0,01	0,44 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,22 ± 0,10	0,10 ± 0,05					
<i>S. arborariae</i>	Oxigênio	1,82 ± 0,66	11,47 ± 2,37	0,04 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,03 ± 0,01					
<i>C. tenuis</i>		15,43 ± 1,90	0,00 ± 0,00	0,62 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,00 ± 0,00					

* As capacidades de fermentação foram medidas em condições aeróbicas e com oxigênio limitado. Os valores são calculados considerando a fase de crescimento exponencial.

S. stipitis, *S. passalidarum* e *S. arborariae* produziram predominantemente etanol a partir de xilose (Figura 1a-c). A limitação do oxigênio aumentou a produção de etanol e os rendimentos por *S. stipitis*, *S. passalidarum* e *S. arborariae*. De fato, as concentrações aumentaram aproximadamente 2 vezes em comparação com a condição aeróbica (Tabela 1). *S. stipitis* e *S. passalidarum* atingiram os maiores rendimentos de etanol ($0,45 \text{ g g}^{-1}$ e $0,44 \text{ g g}^{-1}$) entre as quatro leveduras que consomem xilose empregadas neste estudo (Tabela 1). Esses valores estão em boa concordância com estudos anteriores, que mostraram rendimentos de etanol variando de $0,40 \text{ g g}^{-1}$ a $0,48 \text{ g g}^{-1}$ a *S. stipitis* (SKOOG; HAHN-HAGERDAL, 1990; PAPINI et al., 2012) e de $0,43 \text{ g g}^{-1}$ a $0,48 \text{ g g}^{-1}$ para *S. passalidarum* (SU et al., 2015; CADETE et al., 2016) sob níveis limitados de oxigenação. Por sua vez, o rendimento de etanol para *S. arborariae* foi apenas de $0,31 \text{ g g}^{-1}$ (Tabela 1), o que também foi observado anteriormente em um estudo independente (CADETE et al., 2016). A formação de xilitol, glicerol e acetato por *S. stipitis*, *S. passalidarum* e *S. arborariae* foi mínima e não mostrou diferenças significativas entre elas (Figura 1 e Tabela 1). Por outro lado, *C. tenuis* não produziu etanol sob nenhuma condição avaliada. Ela produziu principalmente xilitol durante a fermentação sob condição de oxigênio limitado ($0,62 \text{ g g}^{-1}$) (Tabela 1).

A taxa de consumo de xilose foi menor em condições anaeróbicas em todas as leveduras avaliadas (Figura 2). Somente *S. stipitis* e *S. passalidarum* foram capazes de produzir etanol, e, mesmo assim, a formação de xilitol também aumentou quando comparada às condições aeróbicas e limitadas de oxigênio (Figura 1a-b e 2a-b). Foi relatado que uma taxa de oxigênio insuficiente aumenta o acúmulo de xilitol e causa uma baixa produtividade de etanol em *S. stipitis* e *S. passalidarum* (SU et al., 2015). Apesar dos desempenhos fermentativos semelhantes de *S. stipitis* e *S. passalidarum* sob condição de oxigênio limitado, *S. passalidarum* consumiu mais xilose e produziu 50% mais de etanol do que *S. stipitis* em condição anaeróbica (Figura 2a, b). Esses resultados estão de acordo com os observados em trabalhos anteriores, quando *S. passalidarum* mostrou uma conversão eficiente de xilose em etanol sob

condição anaeróbica, enquanto *S. stipitis* quase não fermentou xilose (HOU, 2012). Outro estudo que avaliou o efeito de aeração na fermentação de xilose também mostrou que *S. passalidarum* (rendimento de etanol 0,43 g g⁻¹) é uma levedura naturalmente capaz de fermentar xilose melhor que *S. stipitis* (rendimento de etanol 0,39 g g⁻¹) quando uma menor taxa de transferência de oxigênio é empregada (SU et al., 2015).

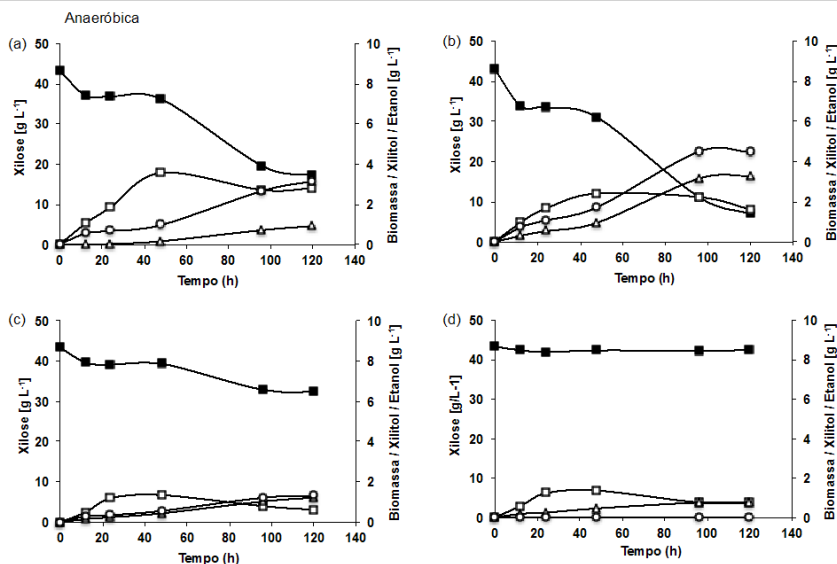


Figura 2. Fermentação com xilose em condições anaeróbicas.

S. stipitis (a); *S. passalidarum* (b); *S. arborariae* (c) e; *C. tenuis* (d). Xilose (quadrado fechado), biomassa (quadrado aberto), xilitol (triângulo aberto) e etanol (círculo aberto).

Embora tenha sido proposto que *C. tenuis* seja capaz de fermentar xilose (WOHLBACH et al., 2011), essa levedura apresentou as taxas de consumo de xilose mais baixas entre as quatro leveduras avaliadas e não foi capaz de produzir etanol em qualquer condição avaliada neste estudo (Figuras 1 e 2). No trabalho anterior, Wohlbach e colaboradores (2011) mostraram que *C. tenuis* produziu cerca de 2,0 g L⁻¹ de etanol durante a fermentação microaeróbica com 8% de

xilose e alta densidade celular inicial (OD_{600nm} de 10) em um frasco Erlenmeyer. Em nosso estudo, algumas mudanças de parâmetros podem ter influenciado o metabolismo de *C. tenuis*, de modo que a formação de xilitol por essa levedura foi significativa (até $15,4 \text{ g L}^{-1}$) e o etanol não foi detectado (Figura 1 e 2, Tabela 1). A densidade celular inicial aproximadamente 20 vezes menor (OD_{600nm} de 0,5, igual a $0,2 \text{ g L}^{-1}$), a baixa taxa de fluxo de ar durante a fermentação com oxigênio limitado e a utilização de meio mineral definido em vez de extrato de levedura e peptona podem ter dificultado a detecção de etanol neste trabalho.

Atividades de Xilose Reductase (XR) e Xilitol Desidrogenase (XDH)

As atividades de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) foram medidas em extratos brutos de *S. stipitis*, *S. passalidarum*, *S. arborariae* e *C. tenuis* a partir de células que cresceram sob condições aeróbicas e de limitação de oxigênio. *S. stipitis*, *S. passalidarum* e *S. arborariae* apresentaram atividade de XR dependente de NADH e NADPH, enquanto a XR de *C. tenuis* mostrou-se estritamente dependente de NADPH (Tabela 2). *S. stipitis* e *S. arborariae* apresentaram maior atividade XR dependente de NADPH, à medida que *S. passalidarum* apresentou 1,5 vez maior atividade de XR dependente de NADH.

Os desempenhos fermentativos de leveduras sob condição limitada de oxigênio puderam ser diretamente correlacionadas com a capacidade de usar NADH na redução de xilose (Tabelas 1 e 2). De fato, *S. passalidarum* mostrou a maior proporção de atividade de XR NADH/NADPH (cerca de 1,30) e o melhor desempenho de fermentação, ou seja, maior taxa de consumo de xilose e maior concentração de etanol, sob condição anaeróbica; seguido de *S. stipitis* e *S. arborariae* com índices de 0,6 e 0,4, respectivamente (Tabela 2). *C. tenuis*, a qual a XR prefere 33 vezes NADPH sobre NADH (PETSCHACHER et al., 2005) não produziu etanol. Em concordância, recentemente foi mostrado que *S. passalidarum* possui duas XR (genes XIL1.1 e XIL1.2) e um deles usa preferencialmente NADH como cofator (CADETE et al., 2016).

Tabela 2. Atividades específicas de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) em extratos brutos de *S. stipitis*, *S. passalidarum*, *S. arborariae* e *C. tenuis*. As leveduras foram cultivadas sob condições aeróbicas e limitadas de oxigênio e as amostras foram retiradas no meio da fase de crescimento exponencial.

Leveduras	Condições	XR [U/mg ⁻¹]			XDH [U/mg ⁻¹]
		NADH	NAD(P)H	Razão NADH/NAD(P)H	NAD ⁺
<i>S. stipitis</i>	Aeróbica	0,17 ± 0,06	0,23 ± 0,05	0,74 ± 0,13	0,23 ± 0,11
<i>S. passalidarum</i>		2,96 ± 0,40	2,15 ± 0,12	1,38 ± 0,16	0,30 ± 0,05
<i>S. arborariae</i>		0,88 ± 0,13	3,10 ± 0,29	0,29 ± 0,05	0,65 ± 0,07
<i>C. tenuis</i>		-	0,35 ± 0,07	-	0,25 ± 0,05
<i>S. stipitis</i>	Limitação de oxigênio	0,26 ± 0,07	0,45 ± 0,11	0,59 ± 0,16	0,19 ± 0,08
<i>S. passalidarum</i>		0,60 ± 0,08	0,46 ± 0,04	1,29 ± 0,07	0,21 ± 0,03
<i>S. arborariae</i>		0,77 ± 0,17	1,86 ± 0,25	0,43 ± 0,16	0,12 ± 0,04
<i>C. tenuis</i>		-	0,27 ± 0,05	-	0,28 ± 0,06

A preferência de XR por NADH foi previamente correlacionada com a produção de etanol melhorada por cepas recombinantes de *S. cerevisiae* (BRUINENBERG et al., 1984; BENGSSON et al., 2009; JEFFRIES; SHI, 1999). O uso de NADH na redução da xilose é vantajoso porque o equilíbrio redox nas vias catabólicas de xilose é otimizado, uma vez que XDH, a próxima enzima na via, é estritamente dependente de NAD⁺ (Tabela 2) (BRUINENBERG et al., 1984). O excesso de NAD⁺ regenerado durante a redução da xilose reduziria a formação de xilitol devido à maior taxa de consumo de xilose, que afeta positivamente o rendimento e a produtividade do etanol (CADETE et al., 2016; HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). De fato, estratégias que visam aumentar a disponibilidade de NAD⁺ durante a fermentação aumentam a taxa de consumo de xilose e a produção de etanol. Isso inclui mutações para alterar a preferência do cofator de XRs de NADPH para NADH (DASGUPTA et al., 2017), adição de doador de

elétrons externos (WAHLBOM; HAHN-HÄGERDAL, 2002) ou expressão de reações adicionais que geraram maior disponibilidade de NAD^+ (ALMEIDA et al., 2009). Nenhuma atividade enzimática foi realizada na condição anaeróbica porque o crescimento foi muito lento e não houve uma fase exponencial de crescimento. Assim, apenas a capacidade fermentativa foi comparada.

Conclusões

A avaliação comparativa das quatro leveduras que naturalmente consomem xilose mostrou que *S. stipitis* e *S. passalidarum* possuem o maior potencial de produção de etanol a partir da xilose. Ambas as leveduras mostraram rendimentos semelhantes de etanol próximos a teóricos sob condição limitada de oxigênio. Além disso, *S. passalidarum* apresentou o melhor consumo de xilose e produção de etanol sob anaerobiose. As leveduras com melhor desempenho, isto é, com maior taxa de consumo de xilose e maior concentração de etanol, durante a fermentação anaeróbica de xilose, apresentaram maior proporção de atividade de XR NADH/NADPH .

Referências

- ALMEIDA, J. R.; BERTILSSON, M.; HAHN-HAGERDAL, B.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Carbon fluxes of xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strains are affected differently by NADH and NADPH usage in HMF reduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 84, n. 4, p. 751-761, 2009.
- ARORA, R.; BEHERA, S.; KUMAR, S. Bioprospecting thermophilic/thermotolerant microbes for production of lignocellulosic ethanol: A future perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 51, p. 699-717, 2015.
- BENGTSSON, O.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 2, artigo 9, 2009.
- BRUINENBERG, P. M.; DE BOT, P. H. M.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. NADH-linked aldose reductase - the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v. 19, n. 4, p. 256-260, 1984.
- CADETE, R. M.; DE LAS HERAS, A. M.; SANDSTROM, A. G.; FERREIRA, C.; GIRIO, F.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; ROSA, C. A.; FONSECA, C. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Biofuels**, London, v. 9, artigo 167, 2016.
- CADETE, R. M.; MELO, M. A.; DUSSAN, K. J.; RODRIGUES, R. C.; SILVA, S. S.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J.; GOMES, F. C.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 8, artigo e43135, 2012.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J.; MOURO, A.; PROMPT, A. H.; GOMES, F. C.; STAMBUK, B. U.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel (D)-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 103, n. 2, p. 421-431, 2013.

CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONCALVES, D. L.; STAMBUK, B. U.; GOMES, F. C.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Malden, v. 9, n. 8, p. 1338-1342, 2009.

DASGUPTA, D.; BANDHU, S.; ADHIKARI, D. K.; GHOSH, D. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: a review. **Microbiological Research**, Jena, v. 197, p. 9-21, 2017.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 94, n. 1, p. 205-214, 2012.

JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y.-S.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 3, p. 319-326, 2007.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 63, n. 5, p. 495-509, 2004.

JEFFRIES, T. W.; SHI, N. Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 65, p. 117-161, 1999.

KRAHULEC, S.; KRATZER, R.; LONGUS, K.; NIDETZKY, B. Comparison of *Scheffersomyces stipitis* strains CBS 5773 and CBS 6054 with regard to their xylose metabolism: implications for xylose fermentation. **Microbiologyopen**, Hoboken, v. 1, n. 1, p. 64-70, 2012.

KUYPER, M.; TOIRKENS, M. J.; DIDERICH, J. A.; WINKLER, A. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, n. 10, p. 925-934, 2005.

LI, H.; WU, M.; XU, L.; HOU, J.; GUO, T.; BAO, X.; SHEN, Y. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production. **Microbial Biotechnology**, Hoboken, v. 8, n. 2, p. 266-274, 2015.

LONG, T. M.; SU, Y. K.; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 78, n. 16, p. 5492-5500, 2012.

MOYSES, D. N.; REIS, V. C.; DE ALMEIDA, J. R.; DE MORAES, L. M.; TORRES, F. A. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 3, artigo 207, 2016.

NGUYEN, N. H.; SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, Cambridge, v. 110, p. 1232-1241, 2006.

PAPINI, M.; NOOKAEW, I.; UHLÉN, M.; NIELSEN, J. *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 11, artigo 136, 2012.

PARAMBIL, L. K.; SARKAR, D. Probing the bioethanol production potential of *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* using validated genome-scale model. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 36, n. 12, p. 2443-2451, 2014.

PETSCHACHER, B.; LEITGEB, S.; KAVANAGH, K. L.; WILSON, D. K.; NIDETZKY, B. The coenzyme specificity of *Candida tenuis* xylose reductase (AKR2B5) explored by site-directed mutagenesis and X-ray crystallography. **Biochemical Journal**, London, v. 385, parte 1, p. 75-83, 2005.

SKOOG, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Lund, v. 56, n. 11, p. 3389-3394, 1990.

SKORUPA-PARACHIN, N.; HAHN-HAGERDAL, B.; BETTIGA, M. A microbial perspective on ethanolic lignocellulose fermentation. In: MOO-YOUNG, M. [Ed.]. **Comprehensive biotechnology**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 2011. p. 605-614.

SLININGER, P. J.; SHEA-ANDERSH, M. A.; THOMPSON, S. R.; DIEN, B. S.; KURTZMAN, C. P.; BALAN, V.; SOUSA, L. C.; UPPUGUNDLA, N.; DALE, B. E.; COTTA, M. A. Involved strains of *Scheffersomyces stipitis* achieving high ethanol productivity on acid and base pretreated biomass hydrolyzate at high solids loading. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 8, n. 60, p. 1-27, 2015.

SMILEY, K. L.; BOLEN, P. L. Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, London, v. 4, n. 9, p. 607-620, 1982.

SU, Y.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 112, n. 3, p. 457-469, 2015.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, Delft, v. 8, n. 7, p. 501-517, 1992.

WAHLBOM, C. F.; HAHN-HAGERDAL, B. Furfural, 5-hydroxymethyl furfural, and acetoin act as external electron acceptors during anaerobic fermentation of xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 78, n. 2, p. 172-178, 2002.

WOHLBACH, D. J.; KUO, A.; SATO, T. K.; POTTS, K. M.; SALAMOV, A. A.; LABUTTI, K. M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGILINAN, J. L.; LINDQUIST, E. A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; JIN, M. J.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. E.; JEFFRIES, T. W.; ZINKEL, R.; BARRY, K. W.; GRIGORIEV, I. V.; GASCH, A. P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 108, n. 32, p. 13212-13217, 2011.

Embrapa

Agroenergia

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**



CGPE 14051