

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA  
CAMPUS CHAPECÓ

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**PRODUÇÃO DE ETANOL 2G E XILITOL A PARTIR DE CONSÓRCIOS DE**  
*Saccharomyces, Spathaspora E Scheffersomyces*

ALUNO Larissa Werlang  
ORIENTADOR Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Jr.  
COORIENTADOR Bel. Anderson Giehl

Dezembro – 2024

**LARISSA WERLANG**

**Produção de etanol 2G e xilitol a partir de consórcios de  
*Saccharomyces*, *Spathaspora* e *Scheffersomyce***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito  
para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da  
Universidade Federal da Fronteira Sul.

**Orientador: Prof. Sérgio Luiz Alves Jr.**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e  
aprovado pela banca em: 03.12.2024

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
 **SERGIO LUIZ ALVES JUNIOR**  
Data: 03/12/2024 10:05:27-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Jr - UFFS**

Documento assinado digitalmente  
 **HELEN TREICHEL**  
Data: 03/12/2024 10:08:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Profa. Dra. Helen Treichel – UFFS**

Documento assinado digitalmente  
 **ANGELA ALVES DOS SANTOS**  
Data: 03/12/2024 10:14:24-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dra. Angela Alves dos Santos - Bolsista de Pós-Doutorado - UFFS**

## PRODUÇÃO DE ETANOL 2G E XILITOL A PARTIR DE CONSÓRCIOS DE *Saccharomyces*, *Spathaspora* E *Scheffersomyces*

Larissa Werlang\*

Anderson Giehl\*\*

Sérgio Luiz Alves Jr.\*\*\*

### RESUMO

Desde a Revolução Industrial, a economia linear tem causado sérios impactos ambientais devido à produção e consumo descontrolados de materiais em larga escala e ao esgotamento de recursos não renováveis. Para mitigar esses impactos, surge a proposta da economia circular, que busca reduzir os danos ambientais por meio da reutilização de produtos e da utilização de matérias-primas renováveis. Nesse contexto, os resíduos lignocelulósicos, majoritariamente formados por glicose e xilose, têm se mostrado uma solução viável, sendo utilizados em biorrefinarias para a produção de bioprodutos como o etanol de segunda geração (2G) e o xilitol. Esses açúcares podem ser fermentados por leveduras. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada na produção de etanol, não possui, no entanto, a capacidade de fermentar xilose de forma eficiente, a menos que seja geneticamente modificada. Por outro lado, algumas espécies dos gêneros *Spathaspora* e *Scheffersomyces* têm demonstrado maior potencial biotecnológico diante da xilose, produzindo etanol ou xilitol, dependendo da cepa. Além disso, estudos mostram que a combinação de diferentes leveduras pode melhorar a produção de etanol e xilitol. Portanto, o presente estudo avaliou a eficiência de produção de etanol e xilitol por linhagens de *S. cerevisiae*, *Sathaspora passalidarum*, *Spathaspora brasiliensis* e *Scheffersomyces stipitis*, individualmente e em consórcios com diferentes combinações e substratos. Os resultados mostraram que a *S. cerevisiae* PE-2 foi a mais eficiente na produção de etanol a partir de glicose, enquanto *Sp. passalidarum* se destacou na conversão de xilose em etanol. Em relação ao xilitol, *Sp. brasiliensis* demonstrou potencial de acumular o álcool, especialmente quando cultivada em meio contendo xilose. Embora os consórcios testados tenham apresentado alguns resultados promissores, a produção de etanol e xilitol foi inferior ao esperado quando comparado aos consórcios encontrados na literatura e aos resultados das leveduras analisadas isoladamente. Isso sugere que a combinação de três leveduras, neste caso, não resultou em uma otimização significativa da produção de ambos os bioprodutos.

Palavras-chave: economia circular; consórcio; fermentação; glicose; xilose.

---

\* Discente do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária - Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus* Chapecó, SC, Brasil. E-mail: larissawerlang@gmail.com.

\*\* Mestrando do Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), *Campus* Florianópolis, SC, Brasil. Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária. E-mail: andergiehl@gmail.com.

\*\*\* Docente do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária – Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus* Chapecó, SC, Brasil. Doutor em Ciências. E-mail: slalvesjr@uffs.edu.br.

## 1 INTRODUÇÃO

A economia linear causa problemas desde a revolução industrial, momento em que o homem iniciou com a produção e consumo descontrolado de materiais produzidos em larga escala, eximindo-se da preocupação com o esgotamento dos recursos não renováveis, ao mesmo tempo que gera uma grande quantidade de resíduo que não é aproveitado. A produção descontrolada de resíduos, o aumento de desastres ambientais ligados ao aquecimento e o esgotamento de bens naturais relacionados ao consumismo evidencia a necessidade de mudança da economia linear para uma economia circular, que considera a fabricação de produtos a partir de fontes renováveis. Além disso, a economia circular foca na redução, na reutilização ou até mesmo na substituição de matéria-prima, trazendo assim à tona o uso de resíduos em biorrefinarias. Dentre esses resíduos, destacam-se os de origem vegetal, que podem servir de insumo para a obtenção de bioprodutos como o etanol de segunda geração (2G) e o xilitol (Shi *et al.*, 2024; Ashokkumar *et al.*, 2024; Pacheco *et al.*, 2024; Barros *et al.*, 2024; Feng *et al.*, 2024).

O etanol de primeira geração (etanol 1G) é produzido através de matéria-prima que contém amido ou sacarose. Esse recurso, que também é utilizado para a produção de alimento, cria uma competição entre as duas indústrias. Enquanto isso, o etanol 2G é produzido a partir de resíduo lignocelulósico (Santos *et al.*, 2023). A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por 40% a 60% de celulose, 20% a 40% de hemicelulose e 10% a 24% de lignina, sendo assim fonte de carbono para processos fermentativos (Yogalakshmi *et al.*, 2022; Mujtaba *et al.*, 2023). Após passar por processos termoquímicos, físicos ou biológicos, dispõe de açúcares como glicose e xilose, passíveis de fermentação para produção de biocombustíveis (Sharma *et al.*, 2020; Tadioto *et al.*, 2022).

A fermentação da glicose pode ser realizada com rendimento próximo ao máximo teórico (92% da conversão estequiométrica, que corresponde a 0,511 gramas de etanol por grama de glicose) por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Della-Bianca *et al.*, 2013; Barros *et al.*, 2024). A levedura *S. cerevisiae*, conhecida como espécie modelo para produção de etanol, é altamente eficaz na fermentação de açúcares como glicose, frutose e sacarose (Jawad *et al.*, 2024; Vargas *et al.*, 2023). Por ser uma levedura Crabtree positiva, tende a fermentar carboidratos mesmo em aerobiose, diferentemente de muitos outros microrganismos, que só possuem essa capacidade em condições anaeróbicas. Ela tem como prática produzir etanol, acumular esse álcool (o que torna o meio tóxico para a maioria dos microrganismos) e só então consumi-lo (Parapouli *et al.*, 2020).

Outro produto de interesse que pode ser produzido no aproveitamento de resíduos lignocelulósicos por leveduras é o xilitol. Este açúcar-álcool de cinco carbonos é produzido por leveduras durante o metabolismo da xilose, o segundo monossacarídeo mais abundante (atrás apenas da glicose) na biomassa lignocelulósica. Assim que adentra as células das leveduras, a xilose é reduzida a xilitol em uma reação catalisada pela enzima xilose-redutase (XR), utilizando NADH ou NADPH como doador de elétrons. Na sequência, o xilitol pode ser oxidado pela xilitol-desidrogenase (XDH) dependente de  $\text{NAD}^+$ , gerando xilulose. Por fim, a xilulose é fosforilada a xilulose-5-fosfato pela xiluloquinase (XK) antes de seguir para a via das pentoses-fosfato. Esta rota pode promover a fermentação alcoólica, gerando etanol e energia para a célula, ou a respiração, gerando energia e biomassa celular. Contudo, se a XR presente na levedura utilizar NADPH como coenzima, haverá um desbalanço redox na célula (decorrente da falta de reciclagem de cofatores) que acarretará a interrupção do metabolismo da xilose e, consequentemente, o acúmulo de xilitol. Assim sendo, em vez de etanol, obtém-se o açúcar-álcool em questão (Alves *et al.*, 2022; Tadioto *et al.*, 2022; Albarello *et al.*, 2023).

No entanto, leveduras do gênero *Saccharomyces* não possuem a capacidade de produzir etanol a partir de xilose, a menos que a levedura seja modificada geneticamente com introdução de XR, XDH e XK (Talukder *et al.*, 2019). Em contrapartida, a xilose pode ser um substrato com potencial biotecnológico diante de algumas leveduras dos gêneros *Spathaspora* e *Scheffersomyces*, que têm se apresentado como boas fermentadoras e/ou acumuladoras de xilitol (Cadete & Rosa, 2018; Cadete *et al.*, 2017; Tadioto *et al.*, 2022).

Comumente encontradas em besouros perfuradores de madeira e ambientes em que estes insetos habitam, a levedura *Spathaspora passalidarum* possui o etanol como principal produto do metabolismo da xilose, enquanto a levedura *Spathaspora brasiliensis* produz principalmente xilitol diante da referida pentose (Cadete *et al.*, 2016; Cadete & Rosa, 2018; Nguyen *et al.*, 2006). Além dessas espécies, a *Sc. stipitis* possui alto rendimento de etanol em meios com xilose (Cadete *et al.*, 2012; 2017). Essa espécie também é encontrada em troncos em decomposição e em galhos espalhados por florestas (Urbina & Blackwell, 2012).

Por serem aptas a produzir etanol e xilitol a partir da xilose, as leveduras citadas possuem grande interesse a nível industrial. *Spathaspora passalidarum*, por exemplo, é capaz de fermentar toda a glicose e mais de 90% de xilose presente em hidrolisados de biomassa lignocelulósica de cana-de-açúcar, com rendimentos de até 0,46 g de etanol por g de açúcar (Nakanishi *et al.*, 2017). Além disso, de acordo com os mesmos autores, *Sc. stipitis* é capaz de produzir um rendimento máximo de etanol de  $0,32 \text{ gg}^{-1}$  ao utilizar o mesmo meio.

Nesse sentido, um consórcio de leveduras, que consiste na combinação de diferentes cepas ou espécies, pode ser útil para unir suas principais funções e aumentar a eficiência de geração de etanol e xilitol. Um trabalho apresentado por Unrean e Khajeeram (2016) mostrou que um consórcio com 1,94 g de *Sc. stipitis* e 1,94 g de *S. cerevisiae* foi suficiente para aumentar 23% de produtividade de etanol utilizando cana-de-açúcar como matéria-prima. Ao utilizar fermentação em frasco agitado de batelada alimentada, o rendimento de etanol chegou a 70% do teórico, baseado na quantidade total de açúcar do bagaço de cana, com uma produção de 60 g/L de etanol (Unrean & Khajeeram, 2016). Enquanto isso, Suriyachai *et al.* (2013) encontraram, a partir da palha de arroz, 28,6 g/L como máxima concentração de etanol, utilizando o consórcio entre *S. cerevisiae* e *Sc. stipitis*. Hickert *et al.* (2013) utilizaram hidrolisado de casca de arroz e um consórcio entre *S. cerevisiae* e *Sp. arborariae* em biorreatores, com quantidade limitada de oxigênio. O resultado foi a produção de etanol e xilitol, com rendimentos de 0,48 gg<sup>-1</sup> e 0,39 gg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Devido a utilização de consórcios, para a produção de etanol, ser pouco explorada, não há até o presente momento, estudos de produção de etanol e xilitol a partir do consórcio contendo os três gêneros *Saccharomyces*, *Scheffersomyces* e *Spathaspora* juntos. No entanto, os trabalhos científicos já publicados demonstram a vasta oportunidade de desenvolvimento de novas pesquisas utilizando consórcios. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de produção de etanol e xilitol mediante o consórcio das leveduras *S. cerevisiae*, *Sp. passalidarum*, *Sp. brasiliensis* e *Sc. stipitis* em diferentes combinações e em diferentes açúcares (glicose e xilose).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 LEVEDURAS UTILIZADAS

Foram utilizadas cinco cepas cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras (LBMBL) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): duas linhagens de *S. cerevisiae* (PE-2 e JDY-01), previamente descritas como produtoras de xilitol e etanol, respectivamente (Tadioto *et al.*, 2023), uma linhagem *Sc. stipitis* (HM 45.1) produtora de etanol (Cadete *et al.*, 2012) e duas linhagens do gênero *Spathaspora* (*Sp. passalidarum* HMD 2.1 e *Sp. brasiliensis* HMD 19.3) produtoras, respectivamente, de etanol e xilitol a partir da xilose (Cadete *et al.*, 2012; 2016). Todas essas cepas foram preservadas em ultrafreezer a uma temperatura de -80 °C em criotubos contendo glicerol 30% (v/v).

## 2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Antes de cada ensaio, foram realizados pré-cultivos das linhagens em meio sólido inclinado (*slant*) constituído de YP (10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona) com 20 g/L de glicose e 20 g/L de ágar. Os tubos foram mantidos em estufa microbiológica durante 48 h a 30 °C para os ensaios posteriores (descritos abaixo).

Inicialmente, a análise do crescimento das leveduras foi realizada em microplacas de 96 poços com o equipamento Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) por meio de leitura de densidade óptica com comprimento de onda de 600 nm a cada 15 minutos durante 30 horas. Para isso, 1 µL de biomassa celular foi transferido (com alça calibrada) de cada pré-cultivo para 1 mL de água destilada. Após, inoculou-se 1 µL dessa suspensão de células em cada poço da microplaca contendo 100 µL de meio YP (pH 5,0) acrescido de 20 g/L de glicose (YPD), 20 g/L de xilose (YPX) ou 10 g/L de glicose e 10 g/L de xilose conjuntamente (YPDX). A microplaca foi mantida a 30°C sob agitação de 180 rpm. Os cultivos de cada levedura nos diferentes meios foram realizados em duplicata.

Para a avaliação da capacidade de produção de etanol e xilitol, as leveduras também foram avaliadas em frascos agitados, individualmente e em consórcio. Para isso, foram inoculados 3 µL de cada cepa em Erlenmeyers estéreis de 50 mL com 10 mL de meio YP acrescido de 20 g/L de glicose (YPD), 20 g/L de xilose (YPX) ou 10 g/L de glicose e 10 g/L de xilose conjuntamente (YPDX). Além disso, inoculou-se 1 µL de cada cepa, nos meios citados anteriormente, combinadas da seguinte maneira:

- PE-2 + HMD 2.1 + HM 45.1;
- PE-2 + HMD 19.3 + HM 45.1;
- JDY-01 + HMD 2.1 + HM 45.1;
- JDY-01 + HMD 19.3 + HM 45.1;
- PE-2 + HMD 2.1 + HMD 19.3.

Os frascos foram mantidos sob agitação de 145 rpm a uma temperatura de 30 °C durante 24 h. Após 12 h e 24 h de cultivo, coletaram-se amostras para leitura de densidade óptica (em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm — DO<sub>570nm</sub>) e para posterior determinação do consumo de açúcares e da produção de etanol e xilitol. Para isso, as amostras foram centrifugadas e seus sobrenadantes foram filtrados (em filtros de poros de 0,45 µm) e transferidos para vials antes de serem encaminhados às análises cromatográficas, conforme descrito abaixo. Os ensaios em frascos agitados foram realizados em triplicata.

## 2.3 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE AÇÚCARES E DA PRODUÇÃO DE ETANOL E XILITOL

A análise do consumo de glicose e xilose e da produção de etanol e xilitol pelas leveduras foi realizada conforme descrito por Albarello *et al.* (2023). As concentrações foram determinadas a partir de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; LCMS-2020, Shimadzu) com detector de índice de refração RID-10A (Refractive Index – IR, Shimadzu) e coluna AMINEX HPX-87P Bio-Rad, com respectivo pré-filtro e holder. A fase móvel utilizou 5,0 mM de ácido sulfúrico a 50 °C, com fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> durante 25 minutos por amostra. Para todas as amostras, as curvas de calibração variaram em sete concentrações para uma faixa de 0,25 a 20 g/L para carboidratos e 0,125 a 10 g/L para etanol e xilitol.

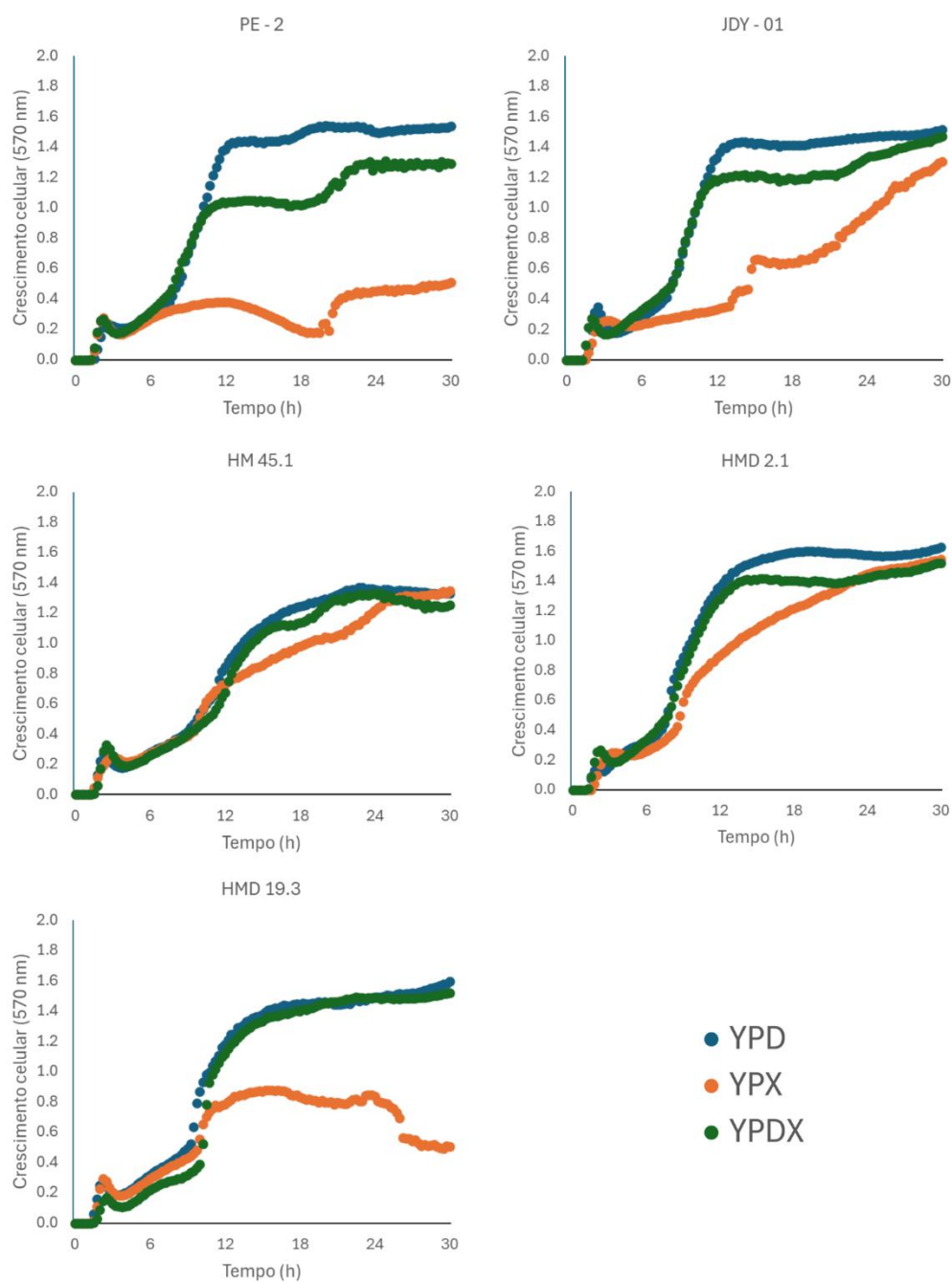
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 CULTIVO EM MICROESCALA

Com a finalidade de analisar o crescimento das leveduras em diferentes carboidratos, as linhagens supracitadas foram cultivadas em microescala em meios com glicose, xilose ou glicose mais xilose (Figura 1). Todas as cepas demonstraram capacidade de crescimento no meio contendo glicose como carboidrato (YPD), atingindo a fase estacionária em aproximadamente 12 h de cultivo. No meio contendo exclusivamente xilose (YPX), no entanto, os perfis de crescimento foram bastante variáveis. Neste caso, apenas três cepas (JDY-01, HM 45.1 e HMD 2.1) apresentaram biomassa celular em níveis semelhantes aos seus respectivos crescimentos em YPD. Ainda assim, seus crescimentos em xilose foram mais lentos do que em glicose, especialmente para a cepa JDY-01, que apresentou fase *lag* de aproximadamente 12 h. Nota-se também que a cepa PE-2 não foi capaz de crescer em xilose e que, nesta fonte de carbono, a HMD 19.3 atingiu apenas metade da densidade óptica observada no meio com a hexose.

No meio contendo conjuntamente glicose e xilose (YPDX), todas as leveduras analisadas foram capazes de crescer. Com exceção da linhagem PE-2, cuja densidade óptica em YPDX foi aproximadamente 85% daquela observada em YPD, as demais cepas atingiram níveis de biomassa semelhantes nos dois meios ao fim dos cultivos. Esse perfil distinto da PE-2 acontece pois, apesar de a *S. cerevisiae* não ser capaz de fermentar a xilose, ela consegue aumentar sua biomassa celular na presença dela, ainda mais em co-fermentação com outros açúcares — neste caso, a glicose (Van Zyl *et al.*, 1989; Talukder *et al.*, 2019).

Figura 1 – Crescimento celular em microescala das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (PE – 2 e JDY – 01), *Scheffersomyces stipitis* (HM 45.1), *Spathaspora passalidarum* (HMD 2.1) e *Spathaspora brasiliensis* (HMD 19.3) em meios YP contendo 2% de glicose (YPD), 2% de xilose (YPX) ou 1% de glicose e 1% de xilose (YPDX) como fontes de carbono.



Fonte: Os autores (2024).

Todas as linhagens testadas cresceram mais em meio YPD e YPDX do que em meio contendo apenas xilose. De acordo com Agbogbo & Coward-Kelly (2008), a *Sc. stipitis* prefere glicose a xilose para produzir etanol. Esses autores apontaram também que a taxa de consumo de glicose é maior do que a de xilose em condições parecidas de crescimento.

As cepas JDY-01 e HMD 2.1 precisaram de mais tempo em YPDX para atingir biomassa semelhante àquela observada em YPD. Segundo Nakanishi *et al.* (2017) e Ribeiro *et al.* (2021), na presença de glicose e hexoses em geral, o consumo de xilose diminui, pois os monossacarídeos que contêm seis átomos de carbono podem reprimir a atividade de XR e XDH. Além disso, sob altas concentrações de glicose, o repressor Mig1 da *S. cerevisiae* inibe genes que codificam enzimas responsáveis pelo metabolismo de outros açúcares, que assim precisam de mais tempo para serem fermentados (como a xilose, por exemplo). À medida que a disponibilidade de glicose no meio diminui, ocorre o aumento da fosforilação do Mig1 pela proteína quinase Snf1, que acaba reduzindo o efeito desse repressor (Schüller, 2003; Klein *et al.*, 1998). Além disso, os dois monossacarídeos em questão competem pelo mesmo transportador de açúcar, que possui preferência por glicose, ocasionando a inibição de captação de xilose (Subtil & Boles, 2012; Farwick *et al.*, 2014).

### 3.2 CULTIVO EM FRASCO AGITADO

O cultivo em frasco agitado foi utilizado para analisar o consumo de açúcar e a produção de etanol e xilitol pelas leveduras e pelos consórcios. Antes disso, analisou-se o crescimento celular das cepas (Tabela 1) e seus consórcios (Tabela 2) através de densidade óptica às 12 e 24 horas depois do inóculo.

A levedura que mais cresceu, em todos os meios, foi a *Sp. passalidarum*, tanto nas 12 quanto nas 24 horas depois do inóculo (Tabela 1). Ainda, a maior quantidade de biomassa celular produzida em YPD reforça dados demonstrados por Ribeiro *et al.* (2021), que afirmam que, em aerobiose, a levedura *Sp. passalidarum* produz mais biomassa em glicose, se comparado com xilose.

Os consórcios 3 e 5 tiveram valores de crescimento parecidos nos três meios, apesar do consórcio 5 se sobressair nos dois momentos analisados (Tabela 2). Os consórcios não demonstraram o crescimento celular esperado, o que pode ocorrer em razão de uma levedura ter inibido o consumo de açúcar da outra (Chen, 2011; Unrean e Khajeeram, 2015).

Tabela 1 – Crescimento celular das leveduras em culturas puras em meios YP contendo 2% de glicose (YPD), 2% de xilose (YPX) ou 1% de glicose e 1% de xilose (YPDX)

| Leveduras                        | Crescimento celular (DO 570 nm) nos meios: |            |            |
|----------------------------------|--------------------------------------------|------------|------------|
|                                  | YPD                                        | YPX        | YPDX       |
| 12 h:                            |                                            |            |            |
| <i>S. cerevisiae</i> PE-2        | 7.85±0.59                                  | 1.17±0.08  | 5.93±0.10  |
| <i>S. cerevisiae</i> JDY-01      | 8.17±0.68                                  | 6.37±0.13  | 7.40±0.98  |
| <i>Sc. stipitis</i> HM 45.1      | 15.18±0.85                                 | 10.22±0.14 | 10.02±0.93 |
| <i>Sp. passalidarum</i> HMD 2.1  | 20.80±0.75                                 | 15.22±1.18 | 16.82±1.01 |
| <i>Sp. brasiliensis</i> HMD 19.3 | 13.63±0.50                                 | 8.83±0.60  | 11.45±0.55 |
| 24 h:                            |                                            |            |            |
| <i>S. cerevisiae</i> PE-2        | 9.75±1.26                                  | 1.65±0.13  | 8.45±0.49  |
| <i>S. cerevisiae</i> JDY-01      | 13.82±1.54                                 | 15.95±1.45 | 16.02±3.49 |
| <i>Sc. stipitis</i> HM 45.1      | 24.43±1.07                                 | 26.20±1.52 | 22.88±2.78 |
| <i>Sp. passalidarum</i> HMD 2.1  | 30.48±0.81                                 | 26.68±0.90 | 27.33±1.31 |
| <i>Sp. brasiliensis</i> HMD 19.3 | 24.15±1.84                                 | 18.62±0.18 | 20.45±0.98 |

Fonte: Os autores (2024).

Tabela 2 – Crescimento celular dos consórcios em meios YP contendo 2% de glicose (YPD), 2% de xilose (YPX) ou 1% de glicose e 1% de xilose (YPDX)

| Consórcios                                | Crescimento celular (DO 570 nm) nos meios: |            |            |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------|------------|------------|
|                                           | YPD                                        | YPX        | YPDX       |
| 12 h:                                     |                                            |            |            |
| Consórcio 1 (PE-2 + HMD 2.1 + HM 45.1)    | 14.00±1.00                                 | 10.43±0.55 | 11.90±0.52 |
| Consórcio 2 (PE-2 + HMD 19.3 + HM 45.1)   | 11.47±0.15                                 | 9.47±0.99  | 9.12±1.20  |
| Consórcio 3 (JDY-01 + HMD 2.1 + HM 45.1)  | 15.03±0.89                                 | 12.60±0.73 | 13.27±0.28 |
| Consórcio 4 (JDY-01 + HMD 19.3 + HM 45.1) | 12.10±0.23                                 | 9.93±0.71  | 10.52±1.03 |
| Consórcio 5 (PE-2 + HMD 19.3 + HMD 2.1)   | 18.17±0.73                                 | 13.40±0.78 | 15.15±0.88 |
| 24 h:                                     |                                            |            |            |
| Consórcio 1 (PE-2 + HMD 2.1 + HM 45.1)    | 20.85±0.92                                 | 21.95±0.19 | 22.75±0.50 |
| Consórcio 2 (PE-2 + HMD 19.3 + HM 45.1)   | 19.80±0.98                                 | 21.80±0.13 | 20.07±1.43 |
| Consórcio 3 (JDY-01 + HMD 2.1 + HM 45.1)  | 24.25±1.22                                 | 25.38±1.65 | 24.23±0.65 |
| Consórcio 4 (JDY-01 + HMD 19.3 + HM 45.1) | 19.50±0.74                                 | 23.48±2.43 | 21.40±1.24 |
| Consórcio 5 (PE-2 + HMD 19.3 + HMD 2.1)   | 27.58±0.64                                 | 29.40±2.07 | 25.90±1.21 |

Fonte: Os autores (2024).

Além disso, analisou-se o percentual de consumo de açúcar das leveduras individualmente (Tabela 3) e em consórcio (Tabela 4). As leveduras PE-2, JDY-01 e HMD 2.1 consumiram toda glicose disponível dentro das primeiras 12 horas após o inóculo (Tabela 3). O consumo rápido de glicose da PE-2 e uma maior demora de consumo pela HM 45.1 é descrito por Unrean e Khajeeram (2015) e Nakanishi *et al.* (2017), assim como o rápido consumo de glicose pela JDY-01 e HMD 2.1 foi demonstrado por Tadioto *et al.* (2023) e Nakanishi *et al.* (2017), respectivamente. Cadete *et al.* (2013) comprovaram que HMD 19.3 leva mais tempo para consumir a glicose do meio.

Tabela 3 – Percentual de consumo de açúcar pelas leveduras em culturas puras em meios YP contendo 2% de glicose (YPD), 2% de xilose (YPX) ou 1% de glicose e 1% de xilose (YPDX).

| Leveduras                        | % Consumo de glicose em: |            | % Consumo de xilose em: |             |
|----------------------------------|--------------------------|------------|-------------------------|-------------|
|                                  | YPD                      | YPDX       | YPX                     | YPDX        |
| 12 h:                            |                          |            |                         |             |
| <i>S. cerevisiae</i> PE-2        | 100.00                   | 100.00     | 0.00                    | 0.00        |
| <i>S. cerevisiae</i> JDY-01      | 100.00                   | 100.00     | 9.45±2.84               | 21.37±1.37  |
| <i>Sc. stipitis</i> HM 45.1      | 94.52±5.21               | 100.00     | 35.13±2.64              | 37.12±3.77  |
| <i>Sp. passalidarum</i> HMD 2.1  | 100.00                   | 100.00     | 74.86±8.35              | 62.07±11.32 |
| <i>Sp. brasiliensis</i> HMD 19.3 | 63.17±1.11               | 97.47±4.38 | 38.30±1.04              | 46.23±3.27  |
| 24 h:                            |                          |            |                         |             |
| <i>S. cerevisiae</i> PE-2        | 100.00                   | 100.00     | 0.00                    | 0.00        |
| <i>S. cerevisiae</i> JDY-01      | 100.00                   | 100.00     | 85.58±0.54              | 87.13±1.09  |
| <i>Sc. stipitis</i> HM 45.1      | 100.00                   | 100.00     | 100.00                  | 100.00      |
| <i>Sp. passalidarum</i> HMD 2.1  | 100.00                   | 100.00     | 100.00                  | 100.00      |
| <i>Sp. brasiliensis</i> HMD 19.3 | 100.00                   | 100.00     | 99.48±0.91              | 100.00      |

Fonte: Os autores (2024).

Enquanto isso, o consumo de xilose foi maior no meio que continha glicose para as leveduras JDY-01, HM 45.1 e HMD 19.3 nas 12 horas após o inóculo, o que evidencia que a hexose não interferiu no consumo da pentose (Tabela 3). A PE-2 não demonstrou capacidade de consumir a xilose.

A Tabela 4 demonstra que os consórcios que melhor consumiram a glicose, individualmente e em concomitante com a xilose, foram os consórcios 1, 3 e 5, visto que no ponto 12 horas o açúcar já foi consumido totalmente. O consórcio que demonstrou maior

consumo de xilose, tanto individualmente quanto em conjunto com a glicose foi o consórcio 3, seguido do consórcio 5, confirmando o melhor crescimento celular destes conjuntos se comparado com os demais consórcios. No meio contendo os dois açúcares, os consórcios 1, 3 e 5 também consumiram melhor a xilose do que no meio contendo apenas xilose.

Tabela 4 – Percentual de consumo de açúcar pelos consórcios em meios YP contendo 2% de glicose (YPD), 2% de xilose (YPX) ou 1% de glicose e 1% de xilose (YPDX)

| Consórcios                                | % Consumo de glicose |        | % Consumo de xilose |            |
|-------------------------------------------|----------------------|--------|---------------------|------------|
|                                           | nos meios:           |        | nos meios:          |            |
|                                           | YPD                  | YPDX   | YPX                 | YPDX       |
| 12 h:                                     |                      |        |                     |            |
| Consórcio 1 (PE-2 + HMD 2.1 + HM 45.1)    | 100.00               | 100.00 | 45.26±2.39          | 50.60±2.66 |
| Consórcio 2 (PE-2 + HMD 19.3 + HM 45.1)   | 97.50±4.33           | 100.00 | 43.87±3.02          | 41.57±1.62 |
| Consórcio 3 (JDY-01 + HMD 2.1 + HM 45.1)  | 100.00               | 100.00 | 63.90±2.15          | 68.55±2.86 |
| Consórcio 4 (JDY-01 + HMD 19.3 + HM 45.1) | 99.41±1.02           | 100.00 | 47.06±2.22          | 35.07±4.26 |
| Consórcio 5 (PE-2 + HMD 19.3 + HMD 2.1)   | 100.00               | 100.00 | 54.20±2.14          | 57.48±3.34 |
| 24 h:                                     |                      |        |                     |            |
| Consórcio 1 (PE-2 + HMD 2.1 + HM 45.1)    | 100.00               | 100.00 | 100.00              | 100.00     |
| Consórcio 2 (PE-2 + HMD 19.3 + HM 45.1)   | 100.00               | 100.00 | 100.00              | 100.00     |
| Consórcio 3 (JDY-01 + HMD 2.1 + HM 45.1)  | 100.00               | 100.00 | 100.00              | 100.00     |
| Consórcio 4 (JDY-01 + HMD 19.3 + HM 45.1) | 100.00               | 100.00 | 99.25±1.30          | 100.00     |
| Consórcio 5 (PE-2 + HMD 19.3 + HMD 2.1)   | 100.00               | 100.00 | 100.00              | 100.00     |

Fonte: Os autores (2024).

Ao comparar com as leveduras individualmente, os consórcios com a presença da PE-2 (1, 2 e 5) demonstraram capacidade de consumo da xilose, evidenciando que as outras duas linhagens presentes nestas uniões tiveram a oportunidade de utilizar este açúcar. Além disso, a capacidade de crescimento celular dos consórcios 1, 2 e 5 nos meios contendo a referida pentose estão em consonância com a capacidade de crescimento. Ao substituir a PE-2 pela levedura JDY-01 o consumo de xilose aumentou (Tabela 4). Esse fenômeno também pode ser visualizado na Tabela 3, em que a JDY-01 individualmente consome xilose, enquanto a outra *S. cerevisiae* não possui essa habilidade. Já o consumo de glicose ocorreu rapidamente, tanto nas leveduras testadas individualmente, quanto em consórcios.

A produção de etanol e xilitol também foi analisada através de cromatografia líquida de alta performance, e as concentrações em gramas por litro desses produtos estão apresentadas na

Tabela 5 para as leveduras em culturas puras e na Tabela 6 para os consórcios. A produção de etanol pelas leveduras foi predominantemente maior no meio que se utilizou glicose como carboidrato, 12 horas após o inóculo (Tabela 5). Depois de 24 horas de inóculo, a quantidade de etanol presente no meio foi reduzida nos cultivos realizados com as linhagens PE-2, JDY-01, HM 45.1 e HMD 2.1. Isso era de fato esperado pois, se compararmos com a Tabela 3, a glicose disponível já havia se esgotado, o que forçou as leveduras a utilizarem o etanol como fonte de carbono.

Tabela 5 – Produção de etanol e xilitol pelas leveduras em culturas puras em meios YP contendo 2% de glicose (YPD), 2% de xilose (YPX) ou 1% de glicose e 1% de xilose (YPDX).

| Leveduras                        | Produção de etanol (g/L) nos meios: |           |           | Produção de xilitol (g/L) nos meios |           |           |
|----------------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|-------------------------------------|-----------|-----------|
|                                  | YPD                                 | YPX       | YPDX      | YPD                                 | YPX       | YPDX      |
| 12 h:                            |                                     |           |           |                                     |           |           |
| <i>S. cerevisiae</i> PE-2        | 8.55±2.47                           | 0.00      | 4.04±0.56 | 0.00                                | 0.00      | 0.00      |
| <i>S. cerevisiae</i> JDY-01      | 7.62±0.75                           | 0.00      | 4.45±0.63 | 0.00                                | 0.00      | 0.00      |
| <i>Sc. stipitis</i> HM 45.1      | 6.07±1.31                           | 2.80±0.47 | 3.26±0.13 | 0.00                                | 0.00      | 0.45±0.06 |
| <i>Sp. passalidarum</i> HMD 2.1  | 5.53±0.36                           | 4.87±1.58 | 4.82±0.44 | 0.00                                | 0.00      | 0.00      |
| <i>Sp. brasiliensis</i> HMD 19.3 | 2.65±0.36                           | 0.19±0.32 | 1.55±0.31 | 0.00                                | 1.56±0.32 | 0.89±0.28 |
| 24 h:                            |                                     |           |           |                                     |           |           |
| <i>S. cerevisiae</i> PE-2        | 5.76±0.69                           | 0,00      | 2.85±0.41 | 0.00                                | 0.00      | 1.12±0.16 |
| <i>S. cerevisiae</i> JDY-01      | 5.42±0.50                           | 2.52±0.19 | 4.07±0.46 | 0.00                                | 0.84±0.05 | 0.00      |
| <i>Sc. stipitis</i> HM 45.1      | 4.63±0.58                           | 4.02±0.39 | 3.75±0.57 | 0.00                                | 0.00      | 0.00      |
| <i>Sp. passalidarum</i> HMD 2.1  | 3.31±0.34                           | 4.08±0.75 | 3.72±0.63 | 0.00                                | 0.00      | 0.00      |
| <i>Sp. brasiliensis</i> HMD 19.3 | 3.06±0.41                           | 1.90±0.62 | 2.10±0.52 | 0.00                                | 8.12±1.52 | 4.27±1.34 |

Fonte: Os autores (2024).

No meio com xilose, a produção de etanol foi maior nas 24 horas após a inoculação, exceto para a levedura HMD 2.1, que produziu mais etanol nas primeiras 12 horas (Tabela 5). Além disso, as cepas HM 45.1 e HMD 2.1 demonstraram maior afinidade com a pentose para a produção de etanol que as demais cepas testadas. Trabalhos como de Laplace *et al.* (1991) e Gírio *et al.* (2010) afirmam a capacidade da *Sc. stipitis* de utilizar xilose para produção de etanol. Além disso, Su *et al.* (2014) também confirmam a preferência da *Sp. passalidarum* por xilose para produção de etanol.

A quantidade de etanol produzido no meio contendo glicose e xilose diminuiu para as duas linhagens de *S. cerevisiae* se comparado com a fermentação em YPD (já que a disponibilidade de glicose também diminuiu). Além disso, se considerarmos as 20 g/L de açúcar disponível (glicose e xilose juntas), as cepas PE-2 e JDY-01 converteram apenas 50% dos carboidratos (possivelmente só a glicose) em etanol, o que representa um rendimento fermentativo muito distante do máximo teórico para os padrões de *S. cerevisiae*. Embora isso já fosse aguardado para a cepa PE-2, esperava-se melhor desempenho da JDY-01, que foi geneticamente modificada com vistas a uma eficiente fermentação de xilose (Tadioto *et al.*, 2023). As demais espécies também diminuíram a produção de etanol se comparado com a produção apenas em glicose. Apesar disso, ao comparar com a produção de etanol em xilose, ocorreu um aumento de produção de etanol no meio com glicose e xilose pelas leveduras analisadas.

Enquanto isso, o xilitol foi acumulado principalmente pela cepa HMD 19.3, com quase 50% de conversão de xilose nas 24 horas após o inóculo, tanto individualmente (no meio YPX) como em conjunto com a glicose (YPDX) (Tabela 5). Além disso, este acúmulo confirma o baixo crescimento celular demonstrado na Figura 1: se a levedura está acumulando xilitol no meio, a xilose não está sendo utilizada por ela como fonte de carbono (Alves *et al.*, 2022). A cepa PE-2 também produziu uma pequena quantidade xilitol em YPDX após 24 horas de inoculação. De acordo com Vargas *et al.* (2023), o acúmulo de xilitol pela PE-2 acontece de forma facilitada com a utilização de um co-substrato, que no caso do presente trabalho é a glicose.

Todos os consórcios produziram etanol nos três meios utilizados (Tabela 6). Maior quantidade do álcool foi produzida no ponto 12 horas em YPD, seguido de YPDX. Já nas 24 horas após o inóculo, a quantidade de etanol diminuiu nos meios supracitados e aumentou em xilose, evidenciando o consumo de etanol para produção de energia e a lentidão de fermentação da xilose. A *S. cerevisiae* PE-2 e o consórcio 1 tiveram valores muito parecidos de produção de etanol em YPD e YPDX (ao analisar também o desvio padrão), apesar do crescimento celular ter sido maior pelo consórcio do que pela levedura sozinha (ver Tabela 1 e Tabela 2). Outro ponto a ser analisado é o fato de o consórcio 1 não ter acumulado xilitol apesar de ter consumido toda a xilose do meio, evidenciando que as leveduras testadas neste caso apenas utilizaram o açúcar como fonte de carbono para produção de energia e biomassa.

Tabela 6 – Produção de etanol e xilitol pelos consórcios em meios YP contendo 2% de glicose (YPD), 2% de xilose (YPX) ou 1% de glicose e 1% de xilose (YPDX).

|                                           | Produção de etanol (g/L) nos meios: |           |           | Produção de xilitol (g/L) nos meios: |           |           |
|-------------------------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------|--------------------------------------|-----------|-----------|
|                                           | YPD                                 | YPX       | YPDX      | YPD                                  | YPX       | YPDX      |
| 12 h:                                     |                                     |           |           |                                      |           |           |
| Consórcio 1 (PE-2 + HMD 2.1 + HM 45.1)    | 5.49±0.39                           | 1.77±0.35 | 4.05±0.35 | 0.00                                 | 0.00      | 0.00      |
| Consórcio 2 (PE-2 + HMD 19.3 + HM 45.1)   | 4.95±0.81                           | 1.16±0.18 | 2.87±0.21 | 0.00                                 | 1.11±0.30 | 0.28±0.26 |
| Consórcio 3 (JDY-01 + HMD 2.1 + HM 45.1)  | 4.75±0.80                           | 2.47±0.22 | 3.76±0.80 | 0.00                                 | 0.00      | 0.00      |
| Consórcio 4 (JDY-01 + HMD 19.3 + HM 45.1) | 4.70±0.49                           | 1.12±0.26 | 2.17±0.25 | 0.00                                 | 1.29±0.16 | 0.00      |
| Consórcio 5 (PE-2 + HMD 19.3 + HMD 2.1)   | 6.22±0.28                           | 2.03±0.11 | 4.03±0.54 | 0.00                                 | 0.71±0.03 | 0.89±0.11 |
| 24 h:                                     |                                     |           |           |                                      |           |           |
| Consórcio 1 (PE-2 + HMD 2.1 + HM 45.1)    | 3.97±0.20                           | 4.09±0.36 | 3.77±0.15 | 0.00                                 | 0.00      | 0.00      |
| Consórcio 2 (PE-2 + HMD 19.3 + HM 45.1)   | 3.12±0.52                           | 2.27±0.10 | 2.83±0.33 | 0.00                                 | 2.38±0.32 | 1.07±0.18 |
| Consórcio 3 (JDY-01 + HMD 2.1 + HM 45.1)  | 2.49±0.17                           | 3.21±0.15 | 2.96±0.31 | 0.00                                 | 0.00      | 0.00      |
| Consórcio 4 (JDY-01 + HMD 19.3 + HM 45.1) | 2.92±0.35                           | 1.90±0.21 | 2.89±0.75 | 0.00                                 | 2.54±0.28 | 1.48±0.41 |
| Consórcio 5 (PE-2 + HMD 19.3 + HMD 2.1)   | 2.49±0.13                           | 2.65±0.15 | 2.89±0.62 | 0.00                                 | 0.64±0.04 | 0.67±0.08 |

Fonte: Os autores (2024).

Os consórcios 3 e 4, em que uma das cepas presentes era a *S. cerevisiae* JDY-01, também produziram menos etanol do que a JDY-01 individualmente nos meios YPD e YPDX. O contrário ocorre no meio YPX, em que os consórcios produzem etanol a partir da xilose e a cepa individualmente não apresentou esta capacidade. Além disso, os consórcios 3 e 4 tiveram uma densidade óptica maior e consumiram mais açúcares que a JDY-01, o que mostra que os açúcares foram utilizados para o crescimento das células.

Apesar do trabalho de Kalyani *et al.* (2013) descrever que um consórcio entre *S. cerevisiae* e *Sc. stipitis* produziu 23% a mais de etanol do que a *S. cerevisiae* individualmente, além de ter uma produção de etanol 38% maior que a *Sc. stipitis* isoladamente, o consórcio testado que mais produziu o álcool citado não possuía a presença de *Sc. stipitis*. Portanto, a adição de uma terceira cepa no consórcio não aumentou a eficiência de produção de etanol.

Além disso, o xilitol foi produzido por três consórcios (2, 4 e 5). Das leveduras presentes nesses consórcios, todas demonstraram capacidade de acumular xilitol, individualmente, em algum dos pontos analisados (12 e 24 horas). Além disso, a xilose dos meios foi totalmente consumida após 24 horas de inóculo, assim como o crescimento celular dos consórcios foi maior que das leveduras em culturas puras. Portanto, nesses casos, a xilose foi utilizada tanto como fonte de carbono quanto para fermentação. O consórcio mais eficiente quanto ao acúmulo de xilitol foi o consórcio 4, que possuía uma levedura de cada espécie dos gêneros testados,

incluindo a *Sp. brasiliensis* HMD 19.3, que apresentou melhor desempenho nesse quesito quando em cultura pura.

## CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de produção de etanol e xilitol pelas leveduras *Saccharomyces*, *Spathaspora* e *Scheffersomyces*, isoladamente e em consórcio. Dentre as leveduras analisadas, quatro delas consumiram os açúcares dispostos nos meios de cultura, sendo elas: JDY-01, HM 45.1, HMD 2.1 e HMD 19.3. A linhagem PE-2 não conseguiu utilizar a xilose como fonte de carbono para produção de energia. Além disso, os consórcios testados também consumiram os açúcares disponíveis.

A levedura que mais produziu etanol a partir de glicose foi a *S. cerevisiae* PE-2, que depois consumiu o etanol produzido para produzir energia, visto que não havia mais açúcar disponível no meio. A partir de xilose, a *Sp. passalidarum* foi a levedura que demonstrou maior capacidade de produção de etanol. O consórcio que mais produziu etanol foi o consórcio 5, sobressaindo nos três meios oferecidos.

O acúmulo de xilitol foi expressivamente maior para a cepa *Sp. brasiliensis* HMD 19.3, tanto no meio YPX quanto no meio YPDX. Os consórcios que demonstraram maior capacidade de acumular xilitol foram o consórcio 4, seguido do consórcio 2, que contavam com a presença da HMD 19.3.

Os valores de etanol e xilitol produzidos pelos consórcios foram menores do que se esperavam, ao comparar com os consórcios encontrados na literatura, com a quantidade de açúcar consumido e com os resultados das leveduras testadas individualmente. Isto evidencia que a união de três leveduras não otimiza a geração de xilitol e etanol.

## REFERÊNCIAS

- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1515–1524, 2008. DOI: 10.1007/s10529-008-9728-z.
- ALBARELLO, M. L. R. *et al.* Analysis of the Holocellulolytic and Fermentative Potentials of Yeasts Isolated from the Gut of *Spodoptera frugiperda* Larvae. **BioEnergy Research**, v. 16, n. 4, p. 2046–2057, 2023. DOI: 10.1007/s12155-023-10616-4

ALVES JR, S. L. et al. Engineered *Saccharomyces* or Prospected non-*Saccharomyces*: Is There Only One Good Choice for Biorefineries? **Yeasts: From Nature to Bioprocesses**, p. 243–283, 2022. DOI: 10.2174/9789815051063122020011

ASHOKKUMAR, V. et al. Advancements in lignocellulosic biomass: A critical appraisal of fourth-generation biofuels and value-added bioproduct. **Fuel**, v. 365, p. 130751, ISSN 0016-2361 2024. DOI: 10.1016/j.fuel.2023.130751

BARROS, K. O. et al. Oxygenation influences xylose fermentation and gene expression in the yeast genera *Spathaspora* and *Scheffersomyces*. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 17, 20, 2024. DOI: 10.1186/s13068-024-02467-8

CADETE, R. M. et al. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, v 7, n. 8, ed. 43135, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0043135

CADETE, R. M. et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel d-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 2, p. 421–431, 2013. DOI: 10.1007/s10482-012-9822-z

CADETE, R. M. et al. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: *XYL1.2* from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v 9, p. 167, 2016. DOI: 10.1186/s13068-016-0570-6

CADETE, R. M. et al. Production of bioethanol in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Scheffersomyces parashehatae*, *Scheffersomyces illinoisensis* and *Spathaspora arborariae* isolated from Brazilian ecosystems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 5, p. 1203–1213, 2017. DOI: 10.1111/jam.13559

CADETE, R. M.; ROSA, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. **Yeast**, v. 35, n. 2, p. 191–199, 2018. DOI: 10.1002/yea.3279

CHEN, Y. Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: a systematic review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 581–597, 2011. DOI: 10.1007/s10295-010-0894-3

DELLA-BIANCA, B. E. *et al.* What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry?. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 979–991, 2013. DOI: 10.1007/s00253-012-4631-x

FARWICK, A. *et al.* Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 14, p. 5159–5164, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1323464111

FENG, J. *et al.* Utilization of agricultural wastes for co-production of xylitol, ethanol, and phenylacetylcarbinol: A review. **Bioresource Technology**, v. 392, p. 129926, ISSN 0960-8524, 2024. DOI: 10.1016/j.biortech.2023.129926

GÍRIO, F.M. *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.088

HICKERT, L. R. *et al.* Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 112–116, ISSN 0960-8524, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.123

JAWAD, M. *et al.* Lignocellulosic ethanol and butanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Clostridium beijerinckii* co-culture using non-detoxified corn stover hydrolysate. **Journal of Biotechnology**, v. 379, p. 1–5, ISSN 0168-1656, 2024. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2023.11.002

KALYANI, Dayanand *et al.* Microbial consortia for saccharification of woody biomass and ethanol fermentation. **Fuel**, v. 107, p. 815–822, 2013. DOI: 10.1016/j.fuel.2013.01.037

KLEIN, C. J. L. *et al.* Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of MIG1 in metabolic functions. **Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 13–24, 1998. DOI: 10.1099/00221287-144-1-13

LAPLACE, J. M. *et al.* Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: Process considerations in relation to ethanol tolerance. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 6, p. 445–450, 1991. DOI: 10.1007/BF01030999

MUJTABA, M. *et al.* Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. **Journal of Cleaner Production**, v. 402, p. 136815, ISSN 0959-6526, 2023. DOI: 10.1016/j.jclepro.2023.136815

- NAKANISHI, S. C *et al.* Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2211–2221, 2017. DOI: 10.1002/bit.26357
- NGUYEN, N. H. *et al.* 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**, v. 110, n. 10, p. 1232–1241, 2006. DOI: 10.1016/j.mycres.2006.07.002
- PACHECO, D. A. de J. *et al.* From linear to circular economy: The role of BS 8001:2017 for green transition in small business in developing economies. **Journal of Cleaner Production**, v. 439, p. 140787, ISSN 0959-6526, 2024. DOI: 10.1016/j.jclepro.2024.140787
- PARAPOULI, M. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1–32, 2020. DOI: 10.3934/microbiol.2020001
- RIBEIRO, L. E. *et al.* Influence of glucose on xylose metabolization by *Spathaspora passalidarum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 157, p. 103624, 2021. DOI: 10.1016/j.fgb.2021.103624
- SANTOS, P. *et al.* Brazil and the world market in the development of technologies for the production of second-generation ethanol. **Alexandria Engineering Journal**, v. 67, p. 153-170, ISSN 1110-0168, 2023. DOI: 10.1016/j.aej.2022.09.004
- SHARMA, B *et al.* Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 313, p. 123630, ISSN 0960-8524, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123630
- SHI, X. *et al.* Perspectives on sustainable plastic treatment: A shift from linear to circular economy. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 173, p. 117631, ISSN 0165-9936, 2024. DOI: 10.1016/j.trac.2024.117631
- SCHÜLLER, H.-J. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 43, n. 3, p. 139–160, 2003. DOI: 10.1007/s00294-003-0381-8
- SU, Y.-K. *et al.* Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 457–469, 2015. DOI: 10.1002/bit.25445

SUBTIL, T.; BOLES, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 14, 2012. DOI: 10.1186/1754-6834-5-14

SURIYACHAI, N. *et al.* Optimized simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture using design of experiments. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 171–178, ISSN 0960-8524, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.003

TADIOTO, V. *et al.* Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 1–14, 2022. DOI: 10.1007/s11274-021-03221-0

TADIOTO, V. *et al.* Prospecting and engineering yeasts for ethanol production under inhibitory conditions: an experimental design analysis. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 46, p. 1133–1145, 2023. DOI: 10.1007/s00449-022-02812-x

TALUKDER, A. A. *et al.* Fuel ethanol production using xylose assimilating and high ethanol producing thermosensitive *Saccharomyces cerevisiae* isolated from date palm juice in Bangladesh. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 101029, ISSN 1878-8181, 2019. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101029

UNREAN, P.; KHAJEERAM, S. Model-based optimization of *Scheffersomyces stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae* co-culture for efficient lignocellulosic ethanol production. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 1, p. 41, 2015. DOI: 10.1186/s40643-015-0069-1

UNREAN, P.; KHAJEERAM, S. Optimization and techno-economic assessment of high-solid fed-batch saccharification and ethanol fermentation by *Scheffersomyces stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae* consortium. **Renewable Energy**, v. 99, p. 1062–1072, ISSN 0960-1481, 2016. DOI: 10.1016/j.renene.2016.08.019

URBINA, H.; BLACKWELL, M. Multilocus Phylogenetic Study of the *Scheffersomyces* Yeast Clade and Characterization of the N-Terminal Region of Xylose Reductase Gene. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39128, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0039128

VAN ZYL, C. *et al.* D-Xylose Utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 135, n. 11, p. 2791–2798, 1989. DOI: 10.1099/00221287-135-11-2791

VARGAS, A. C. G. *et al.* Batch Fermentation of Lignocellulosic Elephant Grass Biomass for 2G Ethanol and Xylitol Production. **BioEnergy Research**, v. 16, n. 4, p. 2219–2228, 2023. DOI: 10.1007/s12155-022-10559-2

YOGALAKSHMI, K. N. *et al.* Lignocellulosic biomass-based pyrolysis: A comprehensive review. **Chemosphere**, v. 286, p. 131824, ISSN 0045-6535, 2022. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131824

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho contou com o apoio da Universidade Federal da Fronteira Sul por meio do Edital nº 31/PROGRAD/UFFS/2024 – Processo seletivo de concessão de auxílio a estudantes dos cursos de graduação da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), para apoio aos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC) – PAFEP-TCC.