

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

# Produção de xilitol por linhagens de leveduras do gênero *Cyberlindnera*

Rafael Marques de Souza

Belo Horizonte- MG

2019

**RAFAEL MARQUES DE SOUZA**

**Produção de xilitol por linhagens de leveduras do gênero *Cyberlindnera***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito necessário para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Coorientadoras: Dra. Raquel Miranda Cadete

Dra. Fernanda Palladino Pedroso

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2019

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Xilitol: características e propriedades.....	3
2.1.1 Definição e caracterização.....	3
2.1.2 Aplicações.....	5
2.1.3 Mercado.....	7
2.2 Obtenção de xilitol.....	8
2.2.1 Produção por processo químico.....	8
2.2.2 Produção por processo biotecnológico.....	9
2.3 Produção de xilitol utilizando material lignocelulósico.....	10
2.3.1 Matéria-prima.....	10
2.3.2 Metabolismo de D-xilose.....	14
2.3.3 Leveduras produtoras de xilitol.....	15
2.3.4 Fatores que afetam a produção de xilitol por micro-organismos.....	18
2.4 Gênero <i>Cyberlindnera</i> .....	19
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Geral.....	22
3.2 Específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Espécies de <i>Cyberlindnera</i> .....	23
4.2 Caracterização morfológica.....	24
4.2.1 Teste de esporulação.....	24
4.3 Caracterização bioquímica e fisiológica.....	24
4.4 Ensaio de conversão de D-xilose.....	25
4.4.1 Curva de calibração - peso seco x densidade óptica.....	25
4.4.2 Cultivo em meio complexo (YPX).....	25
4.4.3 Cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	26

4.5 Métodos analíticos .....	27
4.5.1 Determinação de açúcares, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol.....	27
4.5.2 Determinação dos parâmetros de conversão .....	27
4.6 Análises estatísticas .....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5.1 Teste de esporulação .....	29
5.2 Testes bioquímicos e fisiológicos .....	30
5.3 Influência do inóculo inicial na utilização de xilose em meio complexo.....	30
5.4 Cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar .....	35
6. Conclusões.....	39
7. Referências bibliográficas .....	40
APÊNDICE 1 .....	50
APÊNDICE 2 .....	54
APÊNDICE 3 .....	58
APÊNDICE 4 .....	68

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Modelo molecular do xilitol (Arruda, 2011).....	4
<b>Figura 2:</b> Representação da produção de xilitol a partir de biomassa lignocelulósica. (CHEN et al., 2010). .....	12
<b>Figura 3:</b> Estrutura química das principais unidades presentes na parede vegetal (SAKAR et al., 2009; XAVIER, 2016). .....	13
<b>Figura 4:</b> Esquema simplificado da via metabólica de D-xilose em leveduras (LOURENÇO, 2009). .....	15
<b>Figura 5:</b> Reprodução sexuada com formação de ascósporos em forma de chapéu (indicados pelas setas) no cruzamento entre as linhagens UFMG-HMD-8.2 e a YFGJ79F-b, em ágar extrato de malte 5%, após 21 dias a 25 °C. ....	29

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Propriedades físico-químicas do xilitol (adaptado de UR-REHMAN et al., 2013).....	5
<b>Tabela 2:</b> Características dos processos químicos e biológicos para a produção de xilitol.....	10
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros de conversão de xilitol em meio YPX com 50 gl-1 de xilose (inóculo inicial de 1 gl-1, em 60 e 72 horas de cultivo) das linhagens de <i>Cyberlindnera</i> spp.....	32
<b>Tabela 4:</b> Parâmetros de conversão de xilitol em meio YPX com 50 gl-1 de xilose (inóculo inicial de 3 gl-1, em 60 e 72 horas de cultivo) das linhagens de <i>Cyberlindnera</i> spp.....	33
<b>Tabela 5:</b> Dados para cultivo para os tempos de 72, 96 e 144 utilizando hidrolisado hemicelulósico para os isolados de <i>Cyberlindnera</i> estudados.....	38
<b>Tabela 6:</b> Fontes de carbono utilizadas nos testes fisiológicos. ....	50
<b>Tabela 7:</b> Resultados para os testes de assimilação de diferentes fontes de carbono para as leveduras estudadas. ....	51
<b>Tabela 8:</b> Resultados para os testes de fermentação de glicose das leveduras (b e B = bolha de gás).....	53
<b>Tabela 9:</b> Crescimento das leveduras em ágar Sabouraud em diferentes temperaturas. ....	53
<b>Tabela 10:</b> Média dos parâmetros fermentativos utilizando 3 gL-1 de inóculo inicial e 50 gL-1 de xilose. ....	55
<b>Tabela 11:</b> Teste de Tukey para produtividade (Qp) em 60 horas. ....	59
<b>Tabela 12:</b> Teste de Tukey de conversão de xilose em xilitol (Yp/s) em 60 horas.....	60
<b>Tabela 13:</b> Teste de Tukey para concentração de xilitol (gl-1) em 60 horas. ....	61
<b>Tabela 14:</b> Teste de Tukey para produtividade (Qp) em 72 horas. ....	62
<b>Tabela 15:</b> Teste de Tukey para conversão de xilose em xilitol (Yp/s) em 72 horas....	63
<b>Tabela 16:</b> Teste de Tukey para concentração de xilitol (gl-1) em 72 horas. ....	64
<b>Tabela 17:</b> Teste de Tukey para produtividade (Qp) em 144 horas a partir de cultivo em hidrolisado hemicelulósico. ....	65
<b>Tabela 18:</b> Teste de Tukey para conversão de xilose em xilitol (Yp/s) em 144 horas a partir de cultivo em hidrolisado hemicelulósico.....	66
<b>Tabela 19:</b> Teste de Tukey para concentração de xilitol (gl-1) em 144 horas a partir de cultivo em hidrolisado hemicelulósico. ....	67
<b>Tabela 20:</b> Dados de cultivo dos isolados de <i>Cyberlindnera</i> spp. para o tempo de 48	

horas utilizando hidrolisado hemicelulósico. .... 68

**Tabela 21:** Dados de cultivo dos isolados de *Cyberlindnera* spp. para o tempo de 72

horas utilizando hidrolisado hemicelulósico. .... 68

**Tabela 22:** Dados de cultivo dos isolados de *Cyberlindnera* spp. para o tempo de 120

horas utilizando hidrolisado hemicelulósico. .... 69

## RESUMO

No Brasil, subprodutos oriundos do setor agrícola são exemplos de materiais lignocelulósicos que podem ser utilizados como matérias-primas promissoras para aplicações biotecnológicas, como na produção de etanol de segunda geração e também de xilitol. A biomassa vegetal consiste de três componentes principais, sendo que é da fração hemicelulósica que são liberados, após pré-tratamento, açúcares fermentescíveis como a D-xilose que pode ser convertida em xilitol. Este composto é um produto de elevado valor agregado com destaque para uso alimentício e farmacêutico. Dentre os microrganismos produtores de xilitol, as leveduras são apontadas como as melhores, sendo as linhagens dos gêneros *Candida*, *Meyerozyma*, *Spathaspora* e *Cyberlindnera* as mais extensivamente estudadas quanto a essa propriedade. A necessidade de novas linhagens ou espécies de leveduras produtoras de xilitol têm aumentado nos últimos anos, principalmente linhagens que sejam capazes de produzir este composto a partir de resíduos lignocelulósicos. Neste sentido, este trabalho teve como proposta avaliar a produção de xilitol por sete linhagens de leveduras do gênero *Cyberlindnera* por meio de ensaios de conversão de D-xilose em meio complexo e em meio contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar (HHBC). Inicialmente, foram feitos cultivos em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio YPX (D-xilose 50g<sup>l</sup><sup>-1</sup>, peptona 20g<sup>l</sup><sup>-1</sup>, extrato de levedura 10g<sup>l</sup><sup>-1</sup>) com inóculos iniciais de 1 g<sup>L</sup><sup>-1</sup> e 3 g<sup>L</sup><sup>-1</sup> de células. A linhagem UFMG-HMD 19.1 foi a melhor produtora de xilitol em ambos os inóculos iniciais, sendo que com inoculo de 3 g<sup>L</sup><sup>-1</sup>, a produção deste composto foi de 29,2 g<sup>L</sup><sup>-1</sup> (Y<sub>p/s</sub>= 0,624 gg<sup>-1</sup>; Q<sub>p</sub>= 0,487 g<sup>L</sup><sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>). Essa linhagem foi selecionada, juntamente com as linhagens UFMG-HMD 8.2, YFGJ 79F-b e YP5.1-b, para o cultivo em HHBC. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo e utilizando as condições de crescimento referentes aos melhores resultados obtidos com o inóculo inicial de 1 g<sup>L</sup><sup>-1</sup> com o meio YPX. Nestas condições, os melhores resultados para a produção de xilitol foram obtidos pela linhagem UFMG-HMD 8.2, cuja produção foi de 15,22 g<sup>L</sup><sup>-1</sup> de xilitol com consumo de xilose de 54,95%, fator de conversão de xilose em xilitol de 0,603 gg<sup>-1</sup>, produtividade de 0,105 g<sup>L</sup><sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e eficiência de 65,75% em 144 horas de fermentação. Portanto, esta linhagem tem potencial para ser utilizada em processos industriais para a obtenção de xilitol a partir de resíduos lignocelulósicos.



## ABSTRACT

In Brazil, by-products from the agricultural sector are examples of lignocellulosic materials that can be used as promising raw materials for biotechnological applications, such as the production of second-generation ethanol and xylitol. The biomass consists of three main components, and it is from the hemicellulosic fraction that are liberated, after pretreatment, fermentable sugars such as D-xylose that can be converted to xylitol. This compound is a high added value product with emphasis on food and pharmaceutical use. Among the xylitol-producing microorganisms, yeasts are identified as the best, and the strains of the genera *Candida*, *Meyerozyma*, *Spathaspora* and *Cyberlindnera* are the most extensively studied for this property. The need for new strains or species of xylitol-producing yeasts has increased in recent years, especially strains that are capable of producing this compound from lignocellulosic residues. In this sense, this work had as proposal to evaluate the production of xylitol by seven strains of yeasts of the genus *Cyberlindnera* by means of D-xylose conversion tests in complex medium and in medium containing hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolyzate (HSBH). Initially, cultures were made in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of YPX medium (D-xylose 50g $l^{-1}$ , 20g $l^{-1}$  peptone, yeast extract 10g $l^{-1}$ ) with initial inoculums of 1 g $L^{-1}$  and 3 g $L^{-1}$  of cells. The strain UFMG-HMD 19.1 was the best producer of xylitol in both initial inocula, and with inoculum of 3 g $L^{-1}$ , the production of this compound was 29.2 g $L^{-1}$  ( $Y_p / s = 0.624$  gg $^{-1}$ ;  $Q_p = 0.487$  g $L^{-1}h^{-1}$ ). This lineage was selected, along with the lines UFMG-HMD 8.2 and YFGJ 79F-b, for the cultivation in HSBH. The assays were conducted in 125 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of culture medium and using the growth conditions referring to the best results obtained with the initial inoculum of 3 g $L^{-1}$  with the YPX medium. Under these conditions, the best results for the production of xylitol were obtained by the strain UFMG-HMD 8.2, whose production was 15.22 g $L^{-1}$  of xylitol with xylose consumption of 54.95%, xylose conversion factor in xylitol of 0.603 gg $^{-1}$ , yield of 0.105 g $L^{-1}h^{-1}$  and efficiency of 65.75% in 144 hours of fermentation. Therefore, this lineage has the potential to be used in industrial processes to obtain xylitol from lignocellulosic residues.

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O elevado consumo de açúcar pela população mundial, bem como a falta de comportamentos adequados diante desse consumo—têm sido a causa da incidência de cáries e diabetes em todo o mundo. A sacarose, um dissacarídeo facilmente absorvido e metabolizado pela microbiota bucal, principalmente por bactérias do gênero *Streptococcus*, é o açúcar mais utilizado como adoçante de produtos alimentícios. Quanto maior o consumo de açúcar, associado à falta de uma limpeza adequada da cavidade bucal, maior será a disponibilidade de sacarose para os microrganismos presentes e, dessa forma, estes poderão se multiplicar e conseqüentemente desencadear um quadro cariogênico. De acordo com Trachootham e colaboradores (2017), a substituição de açúcares como glicose e sacarose por xilitol pode até mesmo suprimir a proliferação de células cancerosas no trato oral. Além disto, como o metabolismo da sacarose é dependente de insulina, o consumo desse glicídio, ainda que em pequenas porções, pode ser altamente prejudicial a um diabético. Outro fator negativo em relação à sacarose é o seu alto teor calórico (podendo chegar a até quatro calorias por grama), ponto importante a ser considerado em casos de desenvolvimento da obesidade e da ocorrência de disfunções metabólicas, como a diabetes.

A fim de propiciar a redução da ocorrência de cáries, diabetes e obesidade, bem como de outros quadros clínicos, é necessária a busca por alternativas que sejam viáveis em substituir a sacarose. Uma dessas alternativas é o xilitol, um poliálcool composto de cinco átomos de carbono e cinco grupos hidroxila que pode ser encontrado em baixas quantidades em frutas e vegetais. A importância desse poliálcool é direcionada não apenas para o âmbito social e para a área da saúde, mas também economicamente, uma vez que desperta interesse de diferentes setores industriais. No setor odontológico, as propriedades e características que dão destaque ao xilitol são o seu poder anticariogênico e efeito refrescante, sendo empregado, por exemplo, na fabricação de cremes dentais e gomas de mascar. A indústria alimentícia tem no xilitol uma boa alternativa para a fabricação de adoçantes, sendo que seu potencial de dulçor é semelhante ao da sacarose e com a vantagem de ser em torno de 40% menos calórico (contendo 2,4 calorias por grama). O fato de sua absorção e, conseqüentemente, seu metabolismo serem mais lentos em comparação com a sacarose propicia o controle do índice glicêmico na corrente sanguínea. Este poliálcool é capaz também de se ligar a alguns

cátions e esta propriedade o torna importante para a manutenção de um equilíbrio eletrolítico e osmótico de forma geral no organismo. A absorção de cálcio no sistema digestivo é relevante para a manutenção da saúde dental e prevenção de casos de osteoporose. A utilização de xilitol também está relacionada à redução nos casos de formação de placa bacteriana causada por *Streptococcus mutans* já que o aumento da salivagem e do pH da saliva provocados por este poliol dificultam a aderência dessa bactéria à superfície dental. Há estudos que apontam que o xilitol também apresenta ação no sistema imunológico, prevenindo doenças crônicas e apresentando propriedades de combate ao envelhecimento.

O xilitol é comumente produzido na indústria por processos químicos, que são caros e demandam muitas etapas e reagentes, o que torna o processo dispendioso, além do rendimento ser baixo (50 a 60%). Por essas razões, tem se buscado alternativas para a produção desse poliol, com o objetivo de tornar o processo, como um todo, menos custoso. Uma opção à obtenção química é a produção microbiana por meio de bioconversão da matéria-prima lignocelulósica em xilitol. Dentre os microrganismos, as leveduras têm-se mostrado eficientes nessa bioconversão, com rendimento e produtividade adequados para utilização industrial. No entanto, esta capacidade varia entre diferentes espécies e também entre linhagens de uma mesma espécie.

Tendo em vista a potencial utilização de leveduras produtoras de xilitol em futuras aplicações industriais para a obtenção deste produto de elevado valor agregado, este projeto visa avaliar a capacidade e eficiência de produção de xilitol por espécies novas de leveduras do gênero *Cyberlindnera*, utilizando subprodutos agroindustriais, uma vez que trabalhos anteriores, principalmente com *Cy. xylosilytica*, têm mostrado que espécies deste gênero apresentam excelente rendimento e produtividade em xilitol a partir da xilose.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

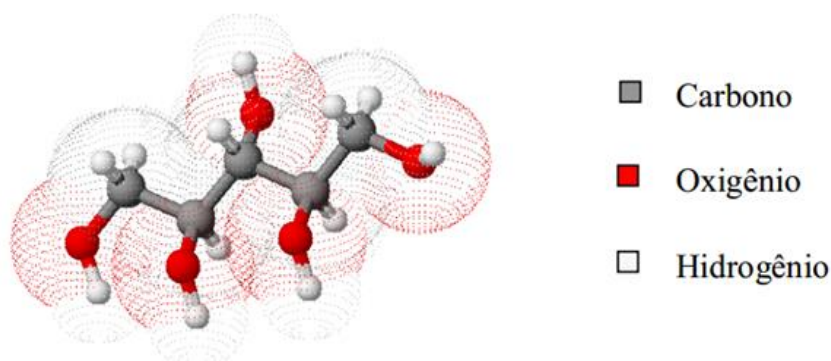
### 2.1 Xilitol: características e propriedades

#### 2.1.1 Definição e caracterização

Xilitol é um poliol que, comercialmente, apresenta a aparência de um pó branco cristalino. Sua fórmula química é  $C_5H_{12}O_5$ , na qual os cinco carbonos se associam a cinco grupos hidroxila (figura 1). É uma substância de ocorrência natural, sendo encontrada, ainda que em quantidade pequenas, em frutas como ameixa, morango e framboesa, e em vegetais como couve-flor, abóbora e espinafre, dentre outros. Além disso, é um metabólito intermediário no metabolismo de carboidratos em mamíferos, cuja produção, que varia de 5 a 15 g por dia em humanos adultos saudáveis, é seguida de assimilação pelo próprio organismo (CANILHA et al., 2013; GUPTA, 2018). A descoberta do xilitol ocorreu em 1891, por cientistas alemães e franceses, que conseguiram sintetizá-lo pela primeira vez (UR-REHMAN et al., 2015). Porém, esta descoberta não teve muito destaque, de forma que por aproximadamente 50 anos a aplicação biotecnológica desse poliálcool não prosperou. Durante a Segunda Guerra Mundial, porém, a Finlândia passou por uma séria crise de escassez de açúcar, o que estimulou a pesquisa por fontes alternativas de açúcares. Assim, os pesquisadores finlandeses redescobriram o xilitol, que passou então a ser o principal adoçante utilizado em gastronomia do país, uma vez que se assemelha bastante à sacarose no que diz respeito ao dulçor (XYLITOL CANADA, 2013). O xilitol apresenta um valor energético menor que o da sacarose, cerca de  $2,4 \text{ calorias.grama}^{-1}$  em comparação a  $4,0 \text{ calorias.grama}^{-1}$  da sacarose (CHEN et. al., 2010), além de não deixar gosto após o consumo (MUSSATO, 2012). Essa e outras propriedades físico-químicas do xilitol estão apresentadas na tabela 1. A ligação do xilitol com a Finlândia é tão particular que o mesmo é, em muitos casos, considerado um símbolo nacional, tamanha a representatividade de sua redescoberta e importância (PEPPERSMITH, 2015).

Devido a estrutura química, o xilitol tem atividade quelante para alguns cátions como  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Fe^{2+}$ , formando, assim, complexos com esses íons (CHEN et al., 2010). Além disso, o número ímpar de átomos em sua composição molecular torna-se um empecilho à atividade microbiana (MUSSATO, 2012). A ausência de um grupo

carbonila redutor diminui a capacidade reativa da molécula em comparação às hexoses tornando-o menos acidogênico e cariogênico (MÄKINEN, 2010). Essa propriedade é de grande importância para aplicação na indústria farmacêutica para uso no tratamento de algumas doenças, como por exemplo, na osteoporose, estimulando a absorção e a manutenção de cálcio nos ossos. O xilitol é capaz de facilitar a passagem desse mineral, presente na corrente sanguínea, para o tecido ósseo. Isso acontece pelo aumento da razão  $\text{NADH/NAD}^+$  durante seu metabolismo, fato esse que está intimamente relacionado ao processo de calcificação óssea (MUSSATO, 2012). Tal capacidade quelante, a fim de formar compostos complexos, se dá em função de sua estrutura polióxí, que permite estabelecer ligações químicas com diferentes íons. Devido à sua natureza polioliol, o xilitol tem sido investigado por ter capacidade de se ligar em radicais livres em sistemas biológicos (MÄKINEN, 2010). Além disso, outras propriedades de relevância, como anticariogenicidade, metabolismo independente de insulina e outras propriedades terapêuticas, fazem com que exista bastante interesse no uso comercial de xilitol (RAFIQUL et al., 2012).



**Figura 1:** Modelo molecular do xilitol (Arruda, 2011).

**Tabela 1:** Propriedades físico-químicas do xilitol (adaptado de UR-REHMAN et al., 2013).

Fórmula	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
Peso molecular	152,15
Aparência	Pó branco, cristalino
Odor	Nenhum (inodoro)
Solubilidade a 20°C	169 g/100 g H <sub>2</sub> O
pH em água (1 g/10 mL)	5-7
Ponto de fusão (°C)	93–94,5
Ponto de ebulição (a 760 mmHg)	216°C
Densidade (densidade aparente) (15°C)	1,50g <sup>-1</sup>
Valor calórico 4,06 cal/g	16,88 J/g
Absorção de umidade (%) (4 dias, 20-22°C);	
a 60% de umidade relativa	0,05
a 92% de umidade relativa	90
Densidade (gravidade específica) de solução aquosa (20°C);	
10%	1,03
60%	1,23
Calor de solução	Endotérmico
Viscosidade (CP) (20°C);	
10%	1,23
40%	4,18
50%	8,04
60%	20,63
Doçura relativa	Igual à da sacarose, maior que do sorbitol e manitol
Rotação específica	Opticamente inativo

### 2.1.2 Aplicações

Após a descoberta e primeira síntese, o xilitol foi utilizado primariamente como adoçante devido à sua semelhança com a sacarose e seu potencial em substituí-la. Posteriormente, observou-se que além de ser um adoçante eficiente, o xilitol apresentava efeitos benéficos em prevenir cáries dentárias (GRANSTRÖM et al., 2007). Essa ação se dá pelo fato de a principal bactéria causadora de cáries, *Streptococcus mutans*, não se aderir à superfície do dente na presença de xilitol. Como a bactéria é incapaz de assimilar xilitol, não consegue proliferar pela cavidade bucal o que impede a

formação de biofilmes e placas bacterianas (MUSSATTO et al., 2002; CHEN et al., 2010; SALLI et al., 2017). O xilitol também é capaz de promover um aumento da salivação (GUEIMONDE et al., 2016) e do pH, e redução da acidez da saliva que, sendo rica em cálcio e fosfato, estimula a remineralização dos dentes e previne o desgaste do esmalte (GUNNARS et al., 2012). Já foi observado que, o uso do xilitol, em associação à clorexidina para inibir o crescimento de estreptococos orais formadores de biofilmes dentários, foi eficaz em comparação ao uso dessas substâncias isoladamente. Essa ação sinérgica pode ser empregada em pacientes com cariogênese de alto risco ou para reduzir a transmissão de estreptococos cariogênicos de mãe para filho (NAYAK et al., 2014). Outro exemplo de sinergismo é o uso do xilitol associado a probióticos, apresentando influência positiva na microflora intestinal e bucal e na redução de patógenos orais. Maden et al. (2018) mostram que probióticos são usados em cremes dentais e enxaguantes bucais como métodos mecânicos e têm efeitos significantes na saúde oral, bem como em prevenir cáries e doenças orais. Estes autores apontam o decréscimo de *S. mutans* e *Lactobacillus* na cavidade oral de crianças após 6 semanas de uso de cremes dentais com xilitol e probióticos. O consumo tanto de iogurtes probióticos quanto de gomas de mascar contendo xilitol também têm relação com a redução da prevalência de *S. mutans* na cavidade oral após quatro semanas de intervenção, além de reduzir o limite de sobrevivência de patógenos orais (GHASEMI et al., 2017). Devido às suas propriedades químicas e fisiológicas, é um composto que apresenta ampla aplicabilidade, abrangendo os setores alimentício, farmacêutico e de cosméticos (MUSSATO et al., 2002; CANILHA et al., 2013; UR-REHMAN et al., 2015; MORALES-RODRIGUEZ et al., 2015). Por ser tão eficiente quanto a sacarose em relação ao potencial adoçante, mas menos calórico e com metabolismo independente de insulina, o xilitol tem tido uma demanda crescente para o consumo por diabéticos (DASGUPTA et al., 2017; YOUSOFF et al., 2017). Com isto, é possível evitar picos de açúcar na corrente sanguínea, consequentemente baixando o índice glicêmico (PRAKASHAM et al., 2009; GHINDEA et al., 2010; ALBUQUERQUE et al., 2014).

Casos de otite média aguda, principalmente em crianças, já são tratadas com xilitol, com redução da infecção. A ação do xilitol está relacionada ao bloqueio da aderência dos agentes infecciosos ao epitélio do ouvido médio, como *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (VERNACCHIO et al., 2014; SAKALLIOGLU et al., 2014). No caso de outras doenças do trato respiratório, como sinusite,

rinossinusite e fibrose (cística e não-cística), o xilitol é útil no estímulo ao sistema imune inato por reduzir a concentração de sal no líquido da superfície das vias aéreas (SAKALLIOGLU et al., 2014). Essa redução se dá pelo fato de bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* não serem capazes de metabolizar o xilitol (bem como outras bactérias causadoras de infecções pulmonares), o que contribui com a defesa natural dos pulmões, diminuindo ou prevenindo infecções, incluindo pneumonia (MUSSATO, 2012). Isso impede a aderência das bactérias que causam esses quadros, principalmente pneumococos.

O xilitol apresenta atividade quelante sobre alguns cátions. Quando essa atividade se dá sobre o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sua absorção é estimulada, o que contribui para o bom funcionamento e equilíbrio eletrolítico do sistema digestivo (em alguns casos sendo considerado até mesmo como um prebiótico), proporcionando boa saúde dental, contribuindo com a composição dos dentes e também ajudando a prevenir casos de osteoporose (ALBUQUERQUE et al., 2014). Uma aplicação que tem sido recentemente estudada é sobre o potencial inseticida do xilitol contra moscas da espécie *Musca domestica* (BURGESS e KING, 2017). De maneira geral, as aplicações do xilitol vêm ampliando e ganhando destaque em diferentes áreas de consumo e produção no mundo, em função da versatilidade funcional deste poliól.

### 2.1.3 Mercado

A produção de xilitol em escala industrial teve início na Finlândia, em 1975, pela Finnish Sugar Co. Ltda. em Helsinque (ALBUQUERQUE et al., 2014). Em termos de valores de mercado, estima-se que o xilitol movimente, de maneira geral, mais de 340 milhões de dólares por ano, sendo o valor por quilo em torno de 6 a 7 dólares (RAFIQUL et al., 2013; MORALEZ-RODRIGUEZ et al., 2016). Por ser considerado um produto típico dos países escandinavos, uma vez que é extraído de uma árvore chamada bétula, comum nessa região da Europa, a produção de xilitol tem-se concentrado principalmente na Finlândia. No entanto, a produção ao redor do mundo tem crescido expressivamente, e calcula-se que já ultrapasse 100.000 toneladas por ano, com uma demanda direcionada para os setores alimentício, farmacêutico e de cosméticos (CANILHA et al., 2013). Rueda et al. (2015) estimam que o mercado global



de xilitol passará de 1 bilhão de dólares, o equivalente a 242.000 toneladas em 2020. A utilização deste poliol na indústria se dá na formulação de muitos produtos, como adoçantes em confeitarias; cremes dentais e enxaguantes bucais no caso de produtos de cuidados pessoais pelo setor odontológico; também como adoçante em substituição à sacarose na indústria farmacêutica para casos de administração a pacientes diabéticos e também como um agente de revestimento em pílulas e pastilhas (RAFIQUL et al., 2013). Outros exemplos de produtos que comumente apresentam xilitol em sua composição são gomas de mascar, bebidas (como refrigerantes e bebidas alcoólicas) (RAFIQUL et al., 2012), balas e produtos alimentícios (MUSSATO et al., 2002), chocolates, sorvetes, gelatinas e marmeladas (ALBUQUERQUE et al., 2014).

## **2.2 Obtenção de xilitol**

### **2.2.1 Produção por processo químico**

Na década de 70 teve início o processo químico de produção do xilitol, que, de maneira geral, envolve a hidrogenação (um processo de redução da D-xilose) com a catalisação por um metal (usualmente níquel), sob alta pressão e temperatura (GRANSTRÖM et al., 2007; PRAKASHAM et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2014; YEWALE et al., 2017; GUPTA, 2018). Esta produção química é um processo que envolve, primordialmente, quatro etapas: (1) hidrólise ácida da matéria-prima lignocelulósica rica em xilana para obtenção da xilose; (2) separação e purificação do hidrolisado, a fim de se obter a xilose pura ou cristalizada; (3) hidrogenação ou redução catalítica da xilose pura a xilitol; (4) cristalização do xilitol obtido e separação (DUSSÁN et al., 2016; RAO et al., 2016; THANCHAROEN et al., 2016; YEWALE et al., 2017).. Inicialmente, a xilose é extraída do material hemicelulósico por hidrólise catalisada por compostos ácidos, processo que é facilitado pela natureza não cristalina e amorfa da hemicelulose. O hidrolisado obtido é rico em açúcares, dentre eles a xilose, o que torna necessária uma etapa de separação e purificação desta pentose do hidrolisado para que seja possível a obtenção da xilose pura, sem qualquer outro açúcar hemicelulósico. Uma vez obtida a xilose, é realizada, então, a etapa de redução desse açúcar a xilitol, quando ocorre a hidrogenação catalisada por metais, principalmente níquel. Essa reação ocorre sob temperaturas e valores de pressão atmosféricas elevadas,

numa variação de 80-140°C, com registros de até 50 atm. Finalmente, o xilitol é recuperado da reação por meio de redução cromatográfica e cristalização (RAFIQUL et al., 2013). As vantagens do processo químico de produção do xilitol são o tempo, pois o mesmo é relativamente rápido, a não interferência dos compostos gerados na hidrólise no restante do processo, a obtenção de uma solução de xilose suficientemente pura para produzir xilitol em escala comercial e uma separação eficiente de outros açúcares (CHENG et al., 2014). Por outro lado, o rendimento da produção não é alto, em torno de 50-60%, o custo é elevado, tendo em conta a série de etapas a serem realizadas e os reagentes e máquinas utilizadas além da baixa eficiência. Este processo também gera poluição ambiental pelos produtos químicos utilizados (RAFIQUL et al., 2013; UR-REHMAN et al., 2015).

### **2.2.2 Produção por processo biotecnológico**

No processo biotecnológico de obtenção de xilitol, a matéria-prima utilizada é a porção hemicelulósica rica em xilana. Nesse caso, a produção é baseada na utilização de microrganismos ou enzimas microbianas responsáveis pelas reações de conversão da xilose em xilitol (RAFIQUL et al., 2013; YEWALE et al., 2017). Em leveduras capazes de produzir xilitol, o processo se dá pela redução da D-xilose pela enzima xilose redutase (EC 1.1.1.21, uma aldose redutase). Essa enzima é dependente dos cofatores NADH ou NADPH (PRAKASHAM et al., 2009). Em seguida, o xilitol pode ser secretado ou oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase com a presença do cofator NAD<sup>+</sup>. Essas duas reações são consideradas etapas limitantes do processo de metabolismo de xilose e produção de xilitol (RAFIQUL et al., 2013). O processo biotecnológico é consideravelmente mais barato que o químico por não necessitar do investimento em insumos e equipamentos de elevado valor; é mais facilmente controlado pelo fato de ser geralmente desenvolvido em escalas reduzidas; não é um processo poluente e não necessita de condições extremas de temperatura e pressão para ser conduzido. As desvantagens dessa produção são a sensibilidade das leveduras utilizadas aos compostos presentes no hidrolisado, que são tóxicos, o que impede que as mesmas metabolizem a xilose caso não haja uma etapa de destoxificação; podem ocorrer limitações na reação caso ocorra um desbalanço dos cofatores enzimáticos, essenciais às atividades das enzimas; e, é um processo que envolve muitas variáveis,

como a espécie ou a linhagem da levedura utilizada, nível de oxigenação, concentração do substrato, fontes de carbono, inóculo, grau de aeração, temperatura e pH (GHINDEA et al., 2010; MARTÍNEZ-CORONA et al., 2015; MOHAMAD et al., 2015.). A Tabela 2 mostra um comparativo da produção de xilitol pelas vias química e microbiológica.

**Tabela 2:** Características dos processos químicos e biológicos para a produção de xilitol.

Fatores	Processo biológico	Processo químico
Fonte de carbono	Xilose a partir da lignocelulose	Xilose pura ou xilose a partir da lignocelulose
Catalisador	Leveduras/bactérias/fungos que apresentam atividade das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase	Níquel e hidrogenação
Etapas do Processo	1. Hidrólise ácida ou enzimática da lignocelulose 2. Destoxificação do hidrolisado 3. Fermentação do hidrolisado -produção de xilitol	1. Hidrólise ácida da lignocelulose 2. Purificação do hidrolisado para obtenção da xilose pura 3. Hidrogenação de xilose – produção de xilitol.
Purificação	Processo complexo, devido a diferentes subprodutos microbianos	Resinas de troca iônica
Custo	Baixo -pouca energia e temperatura amena	Alto –energia, pressão e temperatura elevadas

Fonte: MOHAMAD et al. (2015).

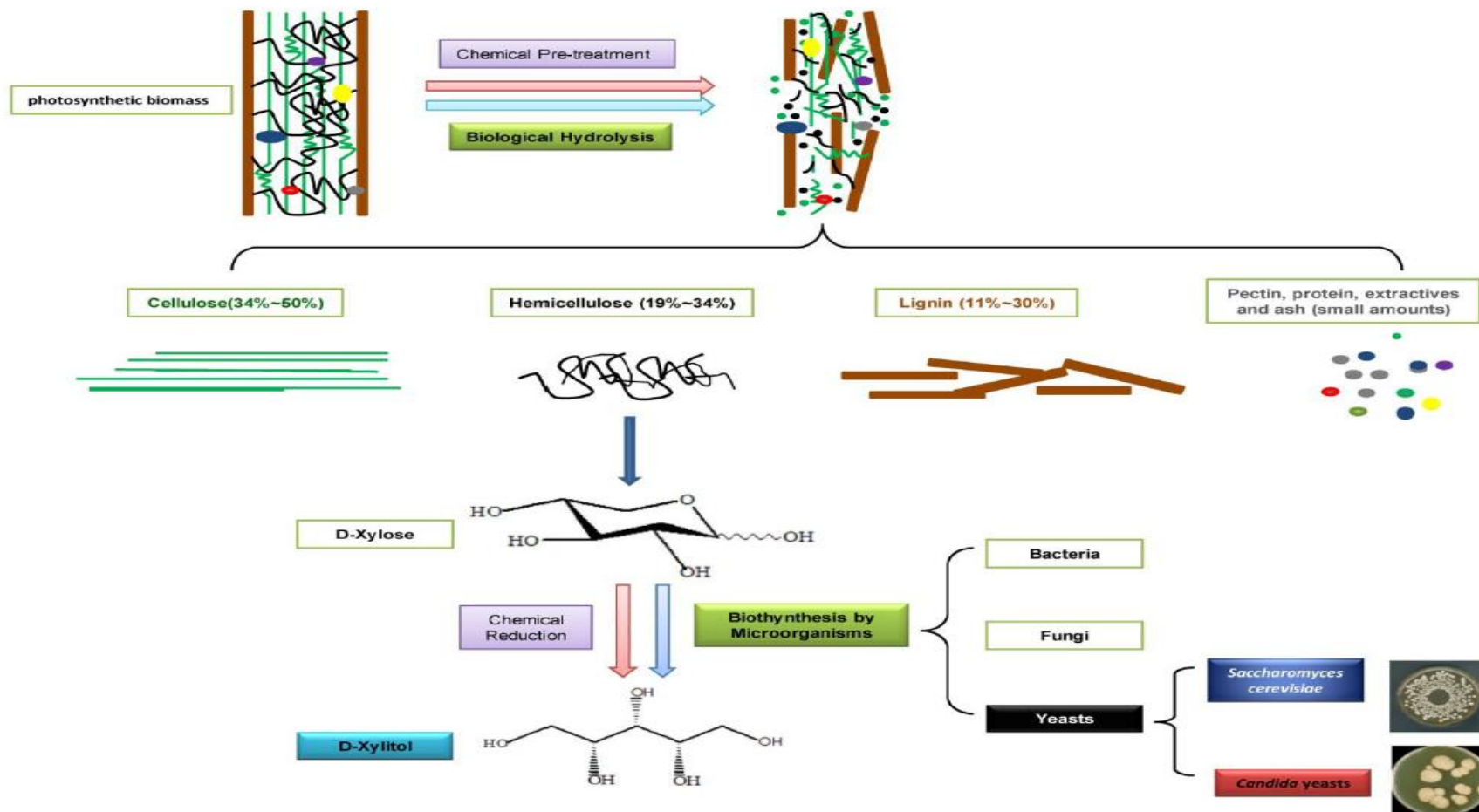
## 2.3 Produção de xilitol utilizando material lignocelulósico

### 2.3.1 Matéria-prima

O material lignocelulósico é o principal constituinte da biomassa vegetal, podendo variar de acordo com a espécie de planta. A lignocelulose, por sua importância, é tida como o principal bloco de sustentação da parede celular dos vegetais em função de sua firmeza e estabilidade (KUMAR et. al., 2009). Resíduos agrícolas e agroindustriais são exemplos de materiais lignocelulósicos que podem ser utilizados como matérias-primas promissoras para aplicações biotecnológicas, como na produção

de etanol de segunda geração e também de xilitol (HÉRNANDEZ-PÉREZ et al., 2016; THANCHAROEN et al., 2016; LÓPEZ-LINAREZ et al., 2018). Isto é devido à sua disponibilidade no ambiente e ao seu baixo custo de mercado. Além de abundantes, tais resíduos são consideravelmente subutilizados ou mal utilizados, sendo em grande parte desprezados. Como exemplos desses substratos estão, resíduos vegetais, bambu, (ALBUQUERQUE et al., 2014), espiga de milho, bagaço de cana, palha de arroz e casca de arroz (PRAKASHAM et al., 2009; IQBAL et al., 2013; ERYASAR et al., 2016; RAO et al., 2016; GHAFFAR et al., 2017), dentre outras fontes de biomassa.

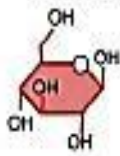
A biomassa vegetal consiste de três componentes principais: a celulose (40-50% da lignocelulose), hemicelulose (25-30%) e lignina (15-20%,) além de outros elementos extraíveis presentes em menores quantidades (MENON e RAO, 2012). Assim como o amido, a celulose é um polímero de glicose, porém com uma organização diferente. Na celulose, a organização polimérica das moléculas de glicose se dá na orientação  $\beta$ -1,4 por ligações glicosídicas, formando microfibrilas com um alto grau de compactação, o que caracteriza a forma cristalina da celulose. A hemicelulose é um heteropolímero ramificado em cuja composição açúcares diferentes são encontrados que se dispõem lateralmente nessas ramificações, sendo eles D-xilose, D-ramnose e D-arabinose (pentoses, ou seja, compostos por cinco átomos de carbono), D-glicose, D-manose e D-galactose (hexoses, seis átomos de carbono) e ácidos urônicos, como o D-glicurônico e D-galactourônico (KUMAR et. al., 2009; IQBAL et al., 2013; SOUZA et al., 2014). A composição da hemicelulose pode variar de acordo com a origem, sendo que em resíduos agrícolas (como palha e bagaço) ela é composta principalmente de xilana, enquanto em árvores (como gimnospermas, por exemplo) o principal composto é a glucomanana (UR-REHMAN et al., 2015). A lignina por sua vez, é um complexo bastante hidrofóbico, cuja resistência e recalcitrância tornam-se um problema ao acesso às partes fermentescíveis da biomassa (celulose e hemicelulose). Em sua composição estão presentes compostos fenólicos como os álcoois  $p$ -coumaril, coniferil e sinapil (IQBAL et al., 2013). Sua rigidez e impermeabilidade têm um lado positivo, que é de oferecer resistência ao estresse oxidativo pela planta e a ataques de agentes microbianos. A lignina se associa intimamente às microfibrilas de celulose, e também a hemicelulose, formando um complexo firme e rígido (AGBOR et. al., 2011). A composição da biomassa lignocelulósica e os processos de produção de xilitol a partir deste material vegetal estão representados na figura 3. Já a Figura 4 apresenta as estruturas das principais unidades presentes na parede vegetal da biomassa.



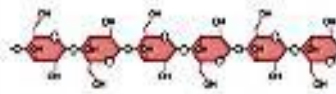
**Figura 2:** Representação da produção de xilitol a partir de biomassa lignocelulósica. (CHEN et al., 2010).

## Celulose

Glicose



Celulose

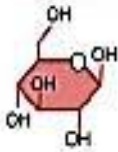


Microfibrilas de Celulose

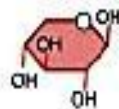


## Hemicelulose

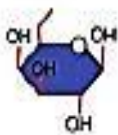
Glicose



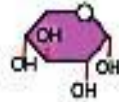
Xilose



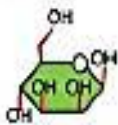
Galactose



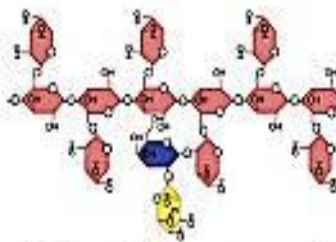
Arabinose



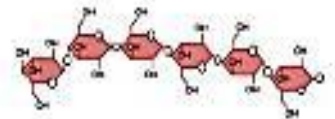
Manose



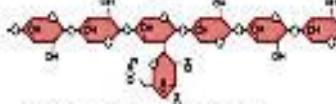
Xiloglucana Fucosilada



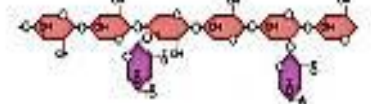
Xilana com ligações mistas



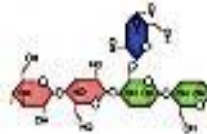
4-O-metil-glucuronoxilana



Arabinoxilana

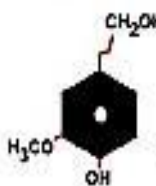


Glucogalactomana

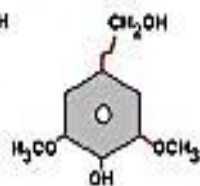


## Ligninas

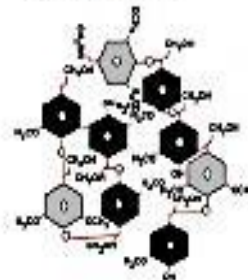
Unidades de Guaiacil



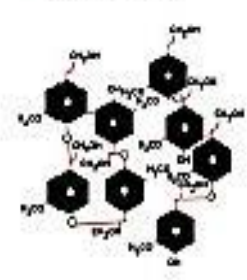
Unidades de Siringil



Lignina GS



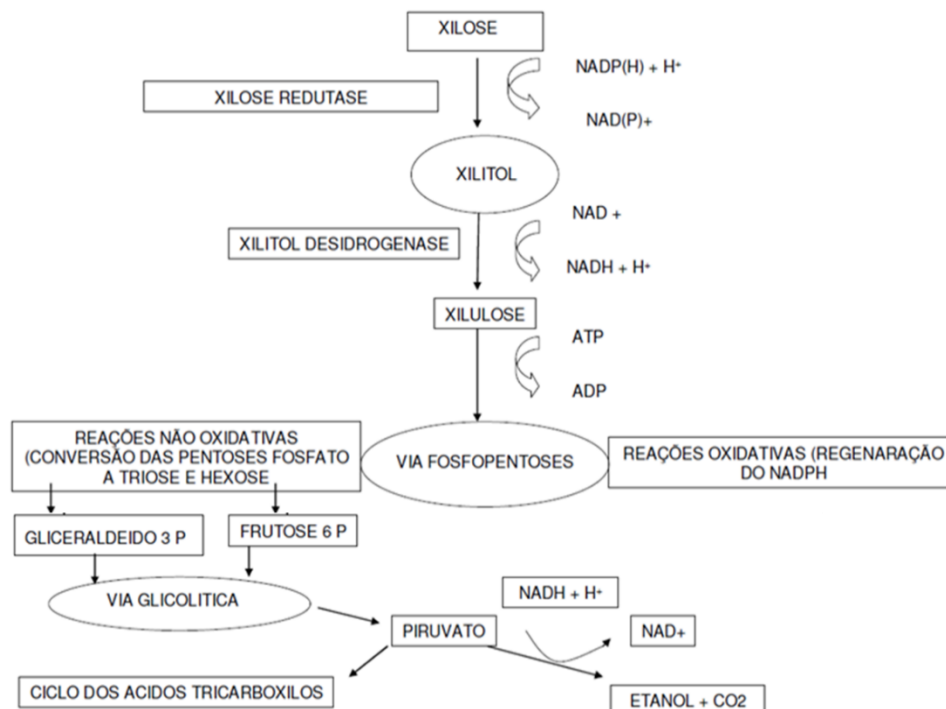
Lignina G



**Figura 3:** Estrutura química das principais unidades presentes na parede vegetal (SAKAR et al., 2009; XAVIER, 2016).

### 2.3.2 Metabolismo de D-xilose

O metabolismo de xilose é um processo que envolve uma série de fatores, como enzimas, cofatores enzimáticos, substratos, parâmetros químicos e biológicos. A via do metabolismo dessa pentose em leveduras e fungos aeróbicos consiste em três enzimas: xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulose quinase (XK) (GRANSTRÖM et al., 2007). Inicialmente, é necessário que ocorra o transporte da xilose para o interior da célula do microrganismo por meio de transportadores na membrana plasmática. A partir de então, a xilose é reduzida pela xilose redutase dependente de NADH ou NADPH. Caso haja um desequilíbrio dos cofatores, essa etapa pode ser comprometida negativamente. Como a etapa de redução da xilose é única, a xilose redutase detém o status de componente mais importante da via metabólica da xilose (SU et al., 2013), via esta representada na figura 4. Porém, de maneira geral, o metabolismo de D-xilose como um todo envolve um número maior de reações. Após a redução da D-xilose a xilitol pela xilose redutase, o xilitol é então oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH) que utiliza preferencialmente o cofator  $\text{NAD}^+$ . As duas etapas de redução e oxidação da xilose são fatores limitantes no metabolismo da mesma, uma vez que há dependência do balanço dos cofatores, cuja disponibilidade está intimamente ligada à disponibilidade de oxigênio durante as reações (ALBUQUERQUE et al., 2014; CADETE et al., 2016). Em bactérias e fungos anaeróbicos não ocorre essa sequência de redução e oxidação, sendo que a D-xilose, por ação da enzima xilose isomerase, é diretamente convertida a xilulose. A xilulose é fosforilada a xilulose-5-fosfato pela enzima xilulose quinase, e este produto pode seguir, então, dois caminhos diferentes: a via glicolítica ou via das pentoses fosfato, a partir das quais pode ocorrer a geração de etanol (RAFIQUL et al., 2013; KWAK e JIN, 2017).



**Figura 4:** Esquema simplificado da via metabólica de D-xilose em leveduras (LOURENÇO, 2009).

### 2.3.3 Leveduras produtoras de xilitol

Dentre os microrganismos produtores de xilitol, as leveduras são apontadas como os melhores produtores (RAFIQUL et al., 2012; CADETE et al., 2016; CADETE et al., 2017). Linhagens dos gêneros *Meyerozyma*, *Candida*, *Spathaspora* e *Cyberlindnera* têm sido extensivamente estudadas quanto a essa propriedade e apresentam grandes vantagens em seu desempenho já que são consumidoras naturais de D-xilose e conseguem manter o balanço de oxidação-redução para o acúmulo de xilitol (PRAKASHAM et al., 2009; MORALES-RODRIGUEZ et al., 2015; CADETE et al., 2017). As xilose redutases mais eficientes na conversão de xilose a xilitol foram detectadas nas leveduras produtoras de xilitol *Candida tropicalis*, *C. silvanorum* e *C. intermedia*, sendo que a espécie *Meyerozyma guillermondii* também apresenta desempenho de destaque na produção deste poliol (YABLOCHKOVA et al., 2003; PRAKASHAM et al., 2009; HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016). Além dessas espécies, destacam-se também *C. boidinii*, *C. mangoliae*, *Debaryomyces hansenii*, *Cyberlindnera xylosilytica*, *Scheffersomyces amazonensis* e *Sc. (Pichia) stipitis* (KUMAR et al., 2015; CADETE et al., 2015; 2016).



Inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas para a avaliação da produção de xilitol utilizando diferentes espécies e linhagens de leveduras, bem como diversas matérias-primas, condições e estratégias de cultivo. Em um estudo feito por Li e colaboradores (2015) foi testada a capacidade da levedura *C. tropicalis* quanto à produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de espiga de milho. A levedura apresentou um pico de produção de xilitol após 12 horas, de 2,67 gL<sup>-1</sup> a partir de uma concentração inicial de 20 gL<sup>-1</sup> de xilose. De forma geral, o rendimento em xilitol foi baixo, em torno de 14,81%. Porém, quando a levedura foi adaptada para suportar os inibidores do hidrolisado (como o ácido acético), a concentração de xilitol passou para 8,18 gL<sup>-1</sup> com um rendimento de 45,37%. Após testar diferentes condições de cultivo, os melhores resultados em relação à produção de xilitol foi utilizando hidrolisado concentrado (com 18,03 gL<sup>-1</sup>), a levedura adaptada ao hidrolisado e a fermentação otimizada (com adição de glicose ao meio e incubação em condição de semi-aerobiose), resultando em uma produção de xilitol de 37,57 gL<sup>-1</sup> e rendimento de 75,14%. Misra e colaboradores (2013) também testaram a espécie *C. tropicalis*, em hidrolisado destoxificado de espiga de milho, contendo 20,92 gL<sup>-1</sup> de xilose e 0,35 gL<sup>-1</sup> de ácido acético. A produção de xilitol foi de 10,29 gL<sup>-1</sup> em 60 horas com um rendimento de 0,50 gg<sup>-1</sup>. A levedura *D. hansenii* foi testada quanto à produção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana destoxificado com carvão ativado. Nesse estudo foi observada, a partir de 20 gL<sup>-1</sup> de xilose, uma produção de 0,69 gg<sup>-1</sup> de xilitol, que corresponde a 76% do valor teórico máximo de produção (PRAKASH et al., 2011) Em um estudo de Hernández-Pérez et al. (2016), foram testadas leveduras da espécie *M. guilliermondi* em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sem e com suplementação. Nas fermentações realizadas sem suplementação, a produção de xilitol foi de 4,78 gL<sup>-1</sup> e 8,79 gL<sup>-1</sup>, em 25 e 50 mL de volume de hidrolisado, respectivamente. Nesses casos, a eficiência foi de 45,26% e 73,32%. Na fermentação em que houve suplementação com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 gL<sup>-1</sup>), a produção de xilitol foi de 4,75 gL<sup>-1</sup> e 9,61 gL<sup>-1</sup>, com eficiência de 16,97% e 68,95%. No caso de suplementação com extrato de farelo de arroz (20 gL<sup>-1</sup>), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 gL<sup>-1</sup>) e CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (0,1 gL<sup>-1</sup>), os resultados foram mais expressivos, com 16,20 gL<sup>-1</sup> e 14,24 gL<sup>-1</sup> de xilitol e eficiência de 50,91% e 60,07%.

Além das espécies citadas anteriormente, que já são reconhecidas para a utilização na produção de xilitol a partir de xilose, nos últimos anos tem se buscado por novas espécies que possam apresentar tais características, mas com um diferencial de produção. Junyapate e colaboradores (2014) identificaram 68 leveduras capazes de

produzir xilitol. Desse número, 64 foram identificadas como pertencentes a 15 espécies de seis gêneros já conhecidos no filo Ascomycota, sendo estes *Candida*, *Cyberlindnera*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* e *Yamadazyma* e uma espécie do filo Basidiomycota, *Papiliotrema (Cryptococcus) laurentii*. Foram descritas espécies que ainda não haviam sido relatadas quanto à produção de xilitol, como *Candida sojae*, *C. subhashii*, *Pichia occidentalis*, *Wickerhamomyces anomalus* e *W. rabaulensis*. Além disso, têm sido estudadas alterações a nível molecular em leveduras que, naturalmente, não são capazes de assimilar xilose e convertê-la em xilitol. Isso tem sido feito, sobretudo, com uma das principais leveduras fermentadoras, mas que assimila somente hexoses, a *Saccharomyces cerevisiae*. Um dos exemplos dessas modificações genéticas é a expressão do gene responsável pelo transporte da xilose para dentro da célula, da bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis*, e o que codifica a enzima encarregada pela conversão de xilose em xilulose, a xilose redutase, da levedura *Scheffersomyces stipitis* (KIM et al., 2017). Em um estudo realizado por Yousoff e colaboradores (2017), alterações genéticas na bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, por meio da deleção de genes diretamente relacionados a vias de utilização de carbono, podem direcionar a uma maior produção de xilitol, por influenciarem a disponibilidade e utilização dos cofatores que regem a atividade das enzimas envolvidas no processo. No que se refere ao gênero *Cyberlindnera*, foco de estudo no presente trabalho, a nova espécie *Cyberlindnera rhodanensis*, além da espécie já conhecida *Cy. saturnus*, até então também não relatadas quanto à capacidade de produção de xilitol, foram identificadas como produtoras em potencial deste poliál (JUNYAPATE et al., 2014). Além destas, *Cy. Galapagoensis* e *Cy. Xylosilytica* têm sido propostas como produtoras de xilitol (CADETE et al., 2015; GUAMAN-BURNEO et al., 2015; Cadete e colaboradores (2012) estudaram leveduras fermentadoras de D-xilose isoladas de uma área de Floresta Amazônica Brasileira. Dentre estas, as linhagens da nova espécie *Scheffersomyces (Candida) amazonensis* apresentaram consumo de xilose de praticamente 100% (de 99,8 a 99,9%) e rendimento em xilitol variando de 0,55 a 0,59 gg<sup>-1</sup> a partir de uma concentração inicial de 50 gl<sup>-1</sup> de xilose. Cadete et al. (2016) mostraram que *Sc. amazonensis* representa a espécie que mais produz xilitol entre todas as espécies testadas, sendo a mais promissora para a produção deste poliál.

### 2.3.4 Fatores que afetam a produção de xilitol por microrganismos

O desempenho dos microrganismos que são capazes de metabolizar D-xilose para produzir xilitol pode ser bastante variável, dependendo de uma série de fatores. Durante o processo de hidrólise da biomassa (pré-tratamento) são gerados vários compostos que são tóxicos para as células microbianas, impedindo que elas desempenhem seu papel no processo fermentativo (JÖNSSON et al., 2016). Além disso, a forma como a hidrólise é conduzida pode ter efeitos diferentes no resultado da fermentação, tanto no que diz respeito à taxa de crescimento do microrganismo utilizado quanto à disponibilidade dos açúcares no meio de fermentação e, conseqüentemente, sua utilização pelo microrganismo. MARDAWATI e colaboradores (2018) analisaram algumas diferenças entre tipos de hidrólise e chegaram ao resultado de que a hidrólise enzimática é menos agressiva do que a ácida, possibilitando uma maior taxa de crescimento do microrganismo durante o processo de fermentação. Os produtos tóxicos gerados durante o processo de pré-tratamento da biomassa são os compostos fenólicos oriundos da degradação de pentoses e hexoses por tratamentos químicos, que são principalmente furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, além da formação de ácidos alifáticos e ácido fórmico. A geração desses compostos é também consequência da diminuição de monossacarídeos na fermentação, o que representa outro fator limitante importante da fermentação (UR-REHMAN et al., 2015; VENKATESWAR RAO et al., 2016). A utilização de diferentes co-substratos pode influenciar no desempenho do microrganismo que pode utilizar preferencialmente um determinado açúcar em detrimento de outro (caso da utilização preferencial de glicose em relação à xilose, por exemplo), além de diferentes açúcares interferirem na afinidade do sistema de transporte dos mesmos para o interior da célula microbiana (CHEN et al., 2010; MARDAWATI et al., 2018). Quanto às culturas dos microrganismos, há uma gama de fatores que podem influenciar diretamente na atividade fermentativa. Condições do meio como pH, temperatura, aeração, imobilização de células e concentração do inóculo devem ser rigorosamente observadas, pois se não se adequarem aos níveis exigidos pelo microrganismo em particular utilizado, tornam-se um ponto negativo, impossibilitando o crescimento microbiano (GHINDEA et al., 2010). Em um estudo realizado por MANAF e colaboradores (2017), mesmo sem a presença de inibidores como ácido acético e furfural, o aumento do pH de 5,5 para 6,5 durante os ensaios de conversão de xilose levou a um decréscimo de 39% na produção de xilitol.

Na presença de furfural e pH elevado, os níveis de xilitol caem ainda mais. Além disso, eles observaram que em pH abaixo de 6 em mistura de glicose e xilose como fontes de carbono a produção de xilitol foi fortemente inibida. Por outro lado, quando a xilose é a única fonte de carbono disponível, o efeito inibitório do furfural diminui. A aeração é, em particular, um fator que carece bastante de atenção. Sob condições aeróbias, a xilose é utilizada principalmente para respiração celular e ganho de biomassa pelas células (VERAS et al., 2017). Por outro lado, em condições de baixa concentração de oxigênio, ocorre acúmulo do cofator NADH por um desbalanço em função da não regeneração dos cofatores (como o NAD<sup>+</sup>), o que inibe a enzima xilitol desidrogenase. A xilose consumida é então redirecionada para a produção de xilitol, favorecendo seu acúmulo (GRANSTRÖM et al., 2007; UR-REHMAN et al., 2015; GUAMÁN-BURNEO et al., 2015). Há casos em que o consumo de xilose e a geração de produtos a partir da fermentação são melhores em condições anaeróbias, o que pode influenciar significativamente na atividade das enzimas e seus cofatores (VERAS et al., 2017). No que se refere à composição nutricional, os principais fatores a serem observados são as fontes de carbono utilizadas, as fontes de nitrogênio e os micronutrientes, bem como suas devidas concentrações. Deve-se observar também a natureza genética das linhagens utilizadas, se são selvagens, mutantes ou recombinantes (RAFIQUL et al., 2013). Todos esses fatores devem ser considerados para a realização de ensaios de bioconversão de xilose a xilitol por microrganismos.

#### **2.4 Gênero *Cyberlindnera***

Anteriormente à atual designação, o gênero *Cyberlindnera*, proposto por Minter (2009), era denominado *Lindnera*. A mudança na nomenclatura do gênero se deu em função de a antiga denominação de *Lindnera* ser usada também para designação de um gênero de plantas. Após tal mudança, o novo gênero passou a abrigar espécies com novas combinações. Os membros desse gênero (pertencente ao filo Ascomycota, classe Saccharomycetales, ordem Wickerhamomycetaceae) podem se reproduzir assexuada ou sexuadamente. Na reprodução sexuada, as ascas são conjugadas ou não, podendo também haver conjugação entre uma célula e o seu broto ou conjugação entre células independentes. Na reprodução assexuada, o brotamento é multilateral e os brotos formados apresentam uma base estreita. Após o brotamento, as células podem tomar formas distintas, como alongadas, esféricas ou ovóides. Algumas espécies do gênero produzem hifas e pseudohifas (KURTZMAN, 2011). Em sua grande maioria, as

espécies do gênero são encontradas no ambiente, tendo madeira em decomposição como um dos principais substratos. Porém, a espécie *Cy. fabianii* pode, eventualmente, ser patogênica, sendo neonatos os mais propensos à infecção por essa levedura (HOF et al., 2017). Quanto ao perfil bioquímico e fisiológico, o gênero é bastante homogêneo, de forma que a glicose é fermentada por todas as espécies do gênero e outros açúcares como sacarose, maltose e rafinose podem ser fermentados por algumas espécies; já maltose, lactose e galactose, por exemplo, não são fermentados por nenhum representante do gênero (KURTZMAN, 2011). No entanto, estudos recentes apontam para uma capacidade lipolítica e amilolítica da espécie *Cyberlindnera americana*, isolada do intestino de *Dendroctonus rhizophagus*, uma espécie de besouro (BRIONES-ROBLERO et al., 2017). A espécie *Cyberlindnera jadinii* tem sido estudada e testada quanto a uma atividade antagônica contra *Candida albicans*, sugerindo seu uso como um agente probiótico na prevenção de infecções por esse patógeno. Além de aplicações médicas, *Cy. jadinii* tem apresentado também potencial no meio biotecnológico (BUERTH et al., 2017).

O interesse na produção de xilitol por espécies de *Cyberlindnera* é recente. De acordo com Junyapate e colaboradores (2014), *Cy. rhodanensis*, uma nova espécie descrita por esses autores, apresentou uma produção de 3,43 g l<sup>-1</sup> de xilitol com um rendimento de 0,33 g xilitol. g<sup>-1</sup> a partir de 10 g l<sup>-1</sup> de xilose. Já *Cy. saturnus* produziu xilitol com concentração de 1,78 g l<sup>-1</sup> e rendimento de 0,17 g xilitol. g<sup>-1</sup> xilose (também a partir de 10 g l<sup>-1</sup> de xilose). Essas leveduras, de acordo com os autores, foram as duas espécies mais representativas no que diz respeito à conversão de xilose a xilitol, levando-se em conta as demais espécies testadas e identificadas. Até o momento, a espécie do gênero *Cyberlindnera* que apresenta a maior eficiência na produção de xilitol é *Cy. xylosilytica* (CADETE et al., 2015). Neste trabalho, cinco linhagens de *Cy. xylosilytica* foram cultivadas em meio YPX contendo 50 g l<sup>-1</sup> de xilose. Todas as linhagens apresentaram produção máxima de xilitol com 72 horas de experimento, sendo que o consumo de xilose variou de 86 a 94%. A linhagem responsável pela maior porcentagem de consumo apresentou uma produção de 34,46 g l<sup>-1</sup> de xilitol (CADETE et al., 2015). Quando testada em meio suplementado com xilose, outra representante da mesma espécie apresentou bom desempenho na produção de xilitol, atingindo uma concentração de 22,13 g L<sup>-1</sup>, rendimento na conversão de xilose de 0,75 g g<sup>-1</sup>, produtividade de 0,18 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e eficiência de consumo de 82,27% (PALLADINO, 2018). Outra nova espécie com desempenho significativo na produção de xilitol é *Cy.*

*galapagoensis*. Esta espécie apresentou rendimento na produção de xilitol de 0,5 gg<sup>-1</sup> e eficiência de conversão de 55,47%. Já em hidrolisado de bagaço de cana, os valores foram bastante significativos, com um consumo de 93,23% da xilose inicial, produtividade de 0,33 gl<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e rendimento de 0,64 gl<sup>-1</sup> (GUAMÁN-BURNEO et al., 2015). Com base nestes resultados, espécies do gênero *Cyberlindnera* apresentam potencial considerável na produção de xilitol, característica esta que merece ser explorada, principalmente em relação a novas espécies do gênero. Dentro deste contexto, este trabalho visou avaliar o desempenho de novas espécies de *Cyberlindnera* quanto à capacidade de assimilação de xilose para conseqüente produção de xilitol.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Avaliar a produção de xilitol por novas espécies de leveduras do gênero *Cyberlindnera* por meio de ensaios de conversão de D-xilose em meio complexo e em meio contendo hidrolisado hemicelulósico empregando-se diferentes parâmetros de cultivo, como a influência do inóculo inicial de células.

#### **3.2 Específicos**

- 1) Caracterizar morfológica e fisiologicamente linhagens de possíveis espécies novas de *Cyberlindnera*.
- 2) Caracterizar a produção de xilitol por essas linhagens de leveduras do gênero *Cyberlindnera*, avaliando a influência do inóculo em meio complexo.
- 3) Avaliar a produção de xilitol em meio contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizando-se as melhores condições de inóculo inicial pré-estabelecidas com as leveduras selecionadas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Espécies de *Cyberlindnera*

Neste trabalho, a produção de xilitol a partir de D-xilose foi avaliada utilizando-se quatro novas espécies do clado *Cyberlindnera*, nomeadas *Cyberlindnera* sp. 1, *Cyberlindnera* sp. 2, *Cyberlindnera* sp. 3 e *Cyberlindnera* sp. 4, num total de sete linhagens de leveduras. Todas essas espécies encontram-se em processo de descrição e, à exceção da espécie *Cyberlindnera* sp. 4, testes preliminares já mostraram a capacidade destas leveduras de produzir xilitol a partir da D-xilose. Todas as leveduras encontram-se depositadas na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG.

A nova espécie *Cyberlindnera* sp. 1 é representada por três linhagens: UFMG-HMD-8.2 e UFMG-HMD 19.1, ambas isoladas a partir de amostras de madeira em decomposição coletadas em áreas de Floresta Amazônica Brasileira na Reserva Florestal de São João da Baliza, em Roraima; e a linhagem YFGJ 79F-b, isolada a partir de excremento de insetos coletados em superfícies de plantas em Eau Claire, Guiana Francesa. Essas linhagens diferem nas sequências dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA em oito e nove pares de base (pb), respectivamente, das espécies mais próximas já descritas, *Cy. bimundalis* e *Cy. americana*.

*Cyberlindnera* sp. 2 e *Cyberlindnera* sp. 3 são ambas representadas por uma única linhagem, UFMG-XMD-23.1 e YP-5.1b, respectivamente. A levedura UFMG-XMD-23.1 foi isolada a partir de madeira em decomposição coletada em área de Floresta Amazônica Brasileira na Reserva Florestal de Mucajaí, em Roraima. YP-5.1b foi obtida a partir do intestino de larva de cerambicídeo coletado em Los Amigos, Madre de Dios, Peru. *Cyberlindnera* sp. 2 difere nos domínios D1/D2 em oito e nove pb, respectivamente, das espécies conhecidas mais próximas *Cyberlindnera mrakii* e *Cy. saturnus*. *Cyberlindnera* sp. 3 difere em quatro pares de base em relação à *Cy. bimundalis* nos domínios D1/D2 e em 25 substituições e 10 “gaps” em relação à *Candida mycetangii* (clado *Cyberlindnera*) na região ITS-5.8S do gene do rRNA.

A espécie *Cyberlindnera* sp. 4 está representada pelas linhagens UFMG-XMD-8.1 e UFMG-HMD-8.3, ambas isoladas da mesma amostra de madeira em decomposição. Essa espécie difere em uma substituição nos domínios D1/D2 em relação à *Cy. americana* e *Cy. bimundalis*, mas em 34 substituições e 12 “gaps” em relação à *C. mycetangii* na região ITS-5.8S do gene do rRNA.



## **4.2 Caracterização morfológica**

### **4.2.1 Teste de esporulação**

Neste experimento, as sete linhagens foram testadas quanto à capacidade de produção de esporos. Para tanto, as linhagens utilizadas foram cultivadas em ágar YM (glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, ágar 2%) por 24 a 48 h. Após esse tempo, foram feitos repiques para placas com meio 5% de extrato de malte, utilizado rotineiramente para esporulação (WALKER, 2009; KURTZMAN, 2011) numa disposição em que as linhagens se encontravam tanto sozinhas quanto em cruzamento. Tais repiques foram feitos em duplicata e as placas foram incubadas à temperatura de 25°C durante o período de vinte e um dias.

### **4.3 Caracterização bioquímica e fisiológica**

A caracterização fisiológica foi feita com as sete linhagens utilizadas neste trabalho. Para tanto, foi realizado o procedimento de réplica de leveduras, o qual consiste em testes fisiológicos que já são rotineiramente utilizados para identificação. As provas que compõem tais testes incluem fermentação de aproximadamente sete carboidratos, além de crescimento em meios que possam oferecer condições adversas, como alto teor de açúcar e cloreto de sódio, crescimento a diferentes temperaturas, crescimento sob a disponibilidade de várias fontes de carbono e nitrogênio, teste para hidrólise de uréia, determinação de demanda de vitaminas e resistência a antibióticos. Na execução dos testes fisiológicos foram utilizados meio líquido e meios complexos. O meio líquido utilizado foi o meio mínimo de fermentação (MMF) (glicose 2,0%; peptona 0,75% e extrato de levedura 0,45%), em cujos tubos são colocados tubos de Durham para análise de bolhas como indicio de fermentação pelas leveduras através da produção de gás. As fontes de carbono utilizadas nos testes de assimilação foram de 43, cuja relação que pode ser vista no ANEXO 1. Além disto, as leveduras foram testadas quanto ao crescimento em nitrito, nitrato e lisina como única fonte de nitrogênio; crescimento em meio 10% de NaCl; meio sem aminoácido; meio com 100 ppm de cicloheximida; meio com 1% de ácido acético; meio para a produção de ácido (carbonato) e meio com 50% de glicose (KURTZMAN et al., 2011). O desempenho das leveduras quanto à fermentação e utilização dos diferentes meios também se encontra no ANEXO 1.

## **4.4 Ensaios de conversão de D-xilose**

### **4.4.1 Curva de calibração - peso seco x densidade óptica**

A concentração de células no meio de fermentação foi determinada pela leitura da absorbância ( $Abs_{600nm}$ ) em espectrofotômetro (Biospectro SP-22), correlacionada com a massa seca de células ( $g\ l^{-1}$ ) por meio de uma curva de calibração previamente construída. Para tanto, um representante de cada espécie nova de *Cyberlindnera* foi cultivado em ágar YM (glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, ágar 2%) por 24 a 48 h a 30 °C. Uma alçada dessa cultura foi transferida para frascos Erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de caldo YM. Os frascos foram incubados por 24 h a 30 °C em agitador horizontal (modelo New Brunswick Scientific CO. INC. series 25) a 200 rpm. Os cultivos foram feitos em duplicata. Alíquotas de 5 mL de cada cultivo foram filtradas, em triplicata, com auxílio de bomba a vácuo em membranas de 0,45 mm (Milipore). Após a filtração, as membranas foram incubadas em estufa a 60 °C e pesadas diariamente até atingirem peso constante. Paralelamente, a partir do cultivo das leveduras em caldo YM, uma alíquota de 10 mL foi centrifugada a 750g por 15 min. O sobrenadante foi descartado, e, no *pellet* de células formado, acrescentados 10 mL de salina (0,85%). A partir dessa suspensão de células, foram realizadas diluições seriadas nas concentrações de 1:5, 1:7, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 e 1:60, e a absorbância ( $Abs_{600nm}$ ) verificada em espectrofotômetro (MOURA, 2015).

### **4.4.2 Cultivo em meio complexo (YPX)**

#### **4.4.2.1 Influência do inóculo inicial e aeração (moderada) na utilização de xilose**

Os ensaios de cultivo em D-xilose como fonte de carbono foram realizados em triplicata, utilizando inóculos iniciais de 1  $g\ l^{-1}$  e 3  $g\ l^{-1}$  de células na condição de oxigenação moderada.

##### **4.4.2.1.1 Cultivo na condição moderada de oxigenação**

Os ensaios foram realizados em triplicata, em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL do meio YPX (D-xilose 50 $g\ l^{-1}$ , peptona 20 $g\ l^{-1}$ , extrato de levedura 10 $g\ l^{-1}$ ) tampados com rolha de gaze e algodão hidrofóbico. Foram utilizados inóculos iniciais de 1 $g\ l^{-1}$  e 3 $g\ l^{-1}$  de células, e os frascos inoculados foram cultivados sob agitação de 200 rpm, a 30°C por 72 horas. Alíquotas de 1 mL dos cultivos foram retiradas nos

tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. As amostras coletadas foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000g e o sobrenadante devidamente identificado foi armazenado a -20°C para análise posterior por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (CADETE et al., 2012).

#### **4.4.3 Cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**

Após a avaliação dos resultados dos ensaios anteriores, as melhores condições de inóculo inicial foram selecionadas para a realização de ensaios de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. O hidrolisado hemicelulósico, gentilmente cedido pelo professor Dr. Sílvio Silvério da Silva, do Departamento de Biotecnologia da Universidade de São Paulo (USP), Lorena, SP, foi obtido pela hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar conduzida em reator de aço inox de 100 L a 150 °C por 30 minutos utilizando-se ácido sulfúrico 98 % na proporção 1:10 (100 mg de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/g de bagaço). O hidrolisado foi filtrado e concentrado à vácuo em cinco vezes seu volume inicial a 70 °C. A seguir, foi feito um tratamento utilizando-se o método de destoxificação química conforme descrito por Alves e colaboradores (1998). O pH inicial foi ajustado para 7.0 pela adição de CaO e a 5.5 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, seguido da adição de 2,5% p/v de carvão vegetal ativado em pó, e mantido sob agitação a 200 rpm à temperatura de 30 °C por uma hora. O precipitado resultante foi removido por filtração a vácuo. O hidrolisado tratado foi autoclavado a 111 °C por 15 minutos. As leveduras foram previamente cultivadas em meio YPX (D-xilose 30 g/L, peptona 20 g/L e extrato de levedura 10 g/L) e os mesmos procedimentos para a obtenção do inóculo no ensaio em meio semi-sintético foram realizados. Os ensaios em hidrolisado foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo e de acordo com os melhores resultados de inóculo inicial obtidos com o meio YPX. Assim como nessa primeira etapa, foram retiradas alíquotas de 1 mL dos cultivos, mas agora nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Seguindo o procedimento do cultivo preliminar em YPX, as amostras coletadas foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000g e o sobrenadante devidamente identificado e armazenado em a -20 °C para análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A contagem de células para essa fase de ensaios foi determinada em unidades formadoras de colônia (UFC), devido à dificuldade de leitura em densidade óptica no espectrofotômetro e para avaliar a viabilidade celular das leveduras. Para alcançar essa contagem, foram feitas diluições

seriadas a partir de amostras coletadas em cada um dos tempos de fermentação, em duplicata. Posteriormente, três diluições entre  $10^{-2}$  e  $10^{-7}$  foram selecionadas e 100 $\mu$ L de cada diluição foram plaqueados em triplicata em meio YM sólido. As placas foram incubadas a 25°C até que o crescimento celular fosse observado.

## 4.5 Métodos analíticos

### 4.5.1 Determinação de açúcares, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol

As concentrações de glicose, xilose, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol presentes nas alíquotas do meio complexo e do hidrolisado hemicelulósico foram determinadas por CLAE, utilizando-se o cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu, Japão). As amostras provenientes do hidrolisado foram filtradas em filtro “SepPack” C18 (Millipore) e as amostras resultantes dos meios complexos em membrana de acetato celulose (Sartorius) com 0,22  $\mu$ m e diâmetro de 13mm. As amostras foram diluídas e analisadas utilizando-se as seguintes condições: coluna Aminex HPX-87H 300 X 7,8mm (BioRad Laboratories Ltda., USA), mantida à temperatura de 45°C; volume de injeção de 20 $\mu$ L; detector de índice de refração RID 10-A; fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM como eluente e com fluxo de 0,6mLmin<sup>-1</sup> (MOURA, 2015).

### 4.5.2 Determinação dos parâmetros de conversão

Os parâmetros  $Y_{p/s}^{xil}$  (gg<sup>-1</sup>, fator de conversão de xilose em xilitol),  $Y_{p/s}^{et}$  (g/g, fator de conversão de açúcares em etanol),  $Qp^{xil}$  (gl<sup>-1</sup>.h, produtividade volumétrica em xilitol),  $\eta$  (% , eficiência de conversão) e o consumo de açúcares (% , xilose e/ou glicose) foram calculados como respostas aos ensaios experimentais. O fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{p/s}^{xil}$  g/g) e de açúcares em etanol ( $Y_{p/s}^{et}$  g/g) foram calculados dividindo-se o  $\Delta P$  produzido ( $\Delta P$  xilitol ou  $\Delta P$  etanol) pelo  $\Delta S$  consumido (xilose e/ou glicose), de acordo com a equação 1.

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Pf - Pi}{Sf - Si}$$

Equação 1
-----------

Na qual:

$\Delta P$  = Concentração inicial e final de xilitol (gL<sup>-1</sup>)

$\Delta S$  = Concentração inicial e final de xilose (gL<sup>-1</sup>)

A produtividade em xilitol [ $Qp^{xil}$  (gl<sup>-1</sup>.h)] foi determinada pela razão entre a concentração de xilitol (gl<sup>-1</sup>) e o tempo de máxima produção (h) deste produto,

conforme a equação 2.

$$Qp = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{Pf - Pi}{tf - ti}$$

Equação 2

Na qual:

$\Delta P$  = Concentração inicial e final de xilitol ( $\text{gL}^{-1}$ )

$\Delta t$  = Tempo inicial e final de produção do xilitol (h).

A eficiência de conversão ( $\eta$  %) foi calculada como porcentagem do rendimento máximo teórico em xilitol ( $0,917 \text{g xilitol g xilose}^{-1}$ ) e o consumo de xilose e/ou glicose (%) como porcentagem dos açúcares consumidos a partir da concentração inicial utilizada (DA CUNHA PEREIRA et al., 2011), tendo como base a equação 3.

$$\eta = (Yp/s \text{ obtido}) / (Yp/s \text{ teórico}) \times 100$$

Equação 3

Na qual:

$\eta$  = Eficiência de conversão (%)

$Yp/s$  teórico =  $0,917 \text{ g xilitol/g xilose consumida}$ .

#### 4.6 Análises estatísticas

Para análise e compreensão dos resultados, utilizando meio complexo (item 4.1), foram utilizados o método ANOVA (teste F) seguido de análise do intervalo de confiança para as médias dos tratamentos, utilizando-se probabilidade de erro de 5% ( $\alpha=0,05$ ). As pressuposições da ANOVA (normalidade, independência e homogeneidade de variâncias do resíduo) foram testadas para todos os resultados apresentados. Os efeitos cujo p-valor foi menor que  $\alpha$  foram considerados significativos em causar variação nas respostas estudadas. O p-valor é a probabilidade real de erro associada à rejeição da hipótese de nulidade em um teste estatístico.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Teste de esporulação

Com a finalidade de se observar as características morfológicas microscópicas e o padrão de reprodução das leveduras deste estudo, foram selecionadas duas linhagens, a HMD-8.2 e a YFGJ79F-b, para os testes de esporulação. O meio de cultivo utilizado foi o 5% de extrato de malte, comumente utilizado na prática de identificação morfológica por meio de esporulação em leveduras (KURTZMAN et al., 2011) e já tendo apresentado eficácia com outros representantes do mesmo gênero na produção de esporos (CADETE et al., 2015). Após 21 dias de incubação a 25°C, foi possível observar a produção de ascas contendo ascósporos em forma de chapéu, o que permite inferir que as linhagens submetidas ao cruzamento são heterotáticas, ou seja, que precisam de outra levedura de *mating type* diferente para que ocorra reprodução sexuada por meio do cruzamento entre esporos haploides diferentes. Isto foi sugerido pois as linhagens isoladamente não foram capazes de produzir esporos. Além disto, foi possível observar células em brotamento (FIGURA 5), uma vez que a reprodução assexuada por brotamento multilateral é a forma de crescimento mais comum nas leveduras ascomicéticas (KURTZMAN et al., 2011).



**Figura 5:** Reprodução sexuada com formação de ascósporos em forma de chapéu (indicados pelas setas) no cruzamento entre as linhagens UFMG-HMD-8.2 e a YFGJ79F-b, em ágar extrato de malte 5%, após 21 dias a 25 °C.

## 5.2 Testes bioquímicos e fisiológicos

. Nos resultados apresentados na TABELA 7, localizada no ANEXO 1, os números de 0 a 3 representam desde ausência de crescimento até o máximo de crescimento celular, indicado pela formação de colônias nas placas. As fontes nas quais o crescimento foi menos expressivo ou em que, de fato, não houve crescimento nenhum foram lactose, melibiose, amido solúvel, L-arabinose, ribose, eritritol, M-inositol, hexadecano e acetona. Por outro lado, os meios que permitiram observar o melhor crescimento das leveduras foram 15, dentre eles: glicose, maltose, sacarose, celobiose, xilose, etanol, glicerol, manitol e isopropanol. Das seis linhagens, a XMD-8.1 não foi capaz de crescer na placa com xilitol e a HMD-8.2 e YFGJ79F-b apresentaram crescimento máximo com essa fonte de carbono. A habilidade dessas linhagens de crescerem e metabolizarem xilose vai ao encontro de estudos em que outros representantes do gênero *Cyberlindnera* foram submetidos a condições semelhantes e também foram capazes de crescer na presença desta pentose (CADETE et al., 2015; GUAMÁN-BURNEO et al., 2015; PALLADINO, 2018).

## 5.3 Influência do inóculo inicial na utilização de xilose em meio complexo.

A finalidade desta etapa foi avaliar a produção de xilitol por linhagens de *Cyberlindnera* utilizando meio complexo, contendo  $50 \text{ gL}^{-1}$  de xilose (CADETE et al., 2015), variando a concentração celular ( $1 \text{ g/L}$  e  $3 \text{ g/L}$ ). Estes resultados estão descritos nas Tabelas 2 e 3. Para o acompanhamento do crescimento celular, foi pré-estabelecida uma curva de calibração para cada linhagem, de acordo a descrição do item 4.2.1. As tabelas com todos os dados encontrados em todos os tempos analisados para cada linhagem estão no ANEXO 2; as análises estatísticas em relação a estes resultados estão no ANEXO 3. A utilização de açúcares para o processo de cultivo de leveduras, seja ele com o objetivo de aumentar a biomassa celular ou para desencadear a fermentação desse substrato para fins biotecnológicos, pode estar associado a uma série de fatores. É relatado na literatura que valores superiores a  $100 \text{ gL}^{-1}$  de xilose podem ser prejudiciais à viabilidade celular de muitas espécies de leveduras em função do estresse osmótico que pode ser causado pelo excesso de açúcar no meio (EL-BRAZ et al., 2011). Além da concentração de açúcares, alguns outros fatores são essenciais para o processo fermentativo como: temperatura sob a qual o procedimento é conduzido, o pH, agitação, espécie/linhagem do micro-organismo envolvido no processo, oxigenação, suplementação do meio de cultivo com nutrientes e concentração inicial de células,

sendo este último um dos fatores importantes no desempenho fermentativo das leveduras (SILVA et al., 2012; PALLADINO, 2018).

Os melhores valores de produção de xilitol em associação aos melhores parâmetros fermentativos foram obtidos nos tempos de 60 e 72 horas de fermentação. No ensaio realizado com o inóculo inicial de  $1\text{ gL}^{-1}$  de células, em 60 horas de cultivo, as leveduras que apresentaram melhor desempenho e se destacaram estatisticamente em relação à produção de xilitol, conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica são: *Cyberlindnera* sp. 1 UFMG-HMD 19.1 ( $28,01\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,58\text{ gg}^{-1}$  e  $0,46\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectivamente), *Cyberlindnera* sp. 1 UFMG-HMD 8.2 ( $26,07\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,58\text{ gg}^{-1}$  e  $0,43\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectivamente), *Cyberlindnera* sp. 1 YFGJ 79F-b ( $12,61\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,42\text{ gg}^{-1}$  e  $0,21\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectivamente) e *Cyberlindnera* sp.4 UFMG-HMD 8.3 ( $17,25\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,71\text{ gg}^{-1}$  e  $0,28\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , respectivamente). Tais valores permitem dizer que, mesmo sendo da mesma espécie, como as linhagens de *Cyberlindnera* sp. 1, leveduras de linhagens diferentes podem desempenhar comportamentos fermentativos diferenciados. Com o inóculo inicial de  $1\text{ gL}^{-1}$ , mas em 72 horas de cultivo, as leveduras a serem destacadas foram: *Cyberlindnera* sp. 2 UFMG-XMD 23.1 ( $0,33\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,02\text{ gg}^{-1}$  e  $0,005\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), *Cyberlindnera* sp. 3 YP-5.1b ( $23,91\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,60\text{ gg}^{-1}$  e  $0,33\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) e *Cyberlindnera* sp. 4 UFMG-XMD 8.1 ( $24,49\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,67\text{ gg}^{-1}$  e  $0,34\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). No caso do ensaio realizado com o inóculo inicial de  $3\text{ gL}^{-1}$  de células, no tempo de 60 horas, os valores de produção de xilitol, conversão de xilose em xilitol e de produtividade volumétrica a serem destacados são: *Cyberlindnera* sp. 1 UFMG-HMD 19.1 ( $29,20\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,62\text{ gg}^{-1}$  e  $0,48\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), *Cyberlindnera* sp. 1 UFMG-HMD 8.2 ( $26,08\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,56\text{ gg}^{-1}$  e  $0,43\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), *Cyberlindnera* sp. 1 YFGJ 79F-b ( $21,77\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,62\text{ gg}^{-1}$  e  $0,36\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) e *Cyberlindnera* sp. 4 UFMG-HMD 8.3 ( $22,77\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,71\text{ gg}^{-1}$  e  $0,38\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). Já no tempo de 72 horas de cultivo, com os mesmos  $3\text{ gL}^{-1}$  de inóculo inicial, os destaques foram para: *Cyberlindnera* sp. 2 UFMG-XMD 23.1 ( $0,35\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,02\text{ gg}^{-1}$  e  $0,005\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), *Cyberlindnera* sp. 3 YP-5.1b ( $25,79\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,62\text{ gg}^{-1}$  e  $0,35\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) e *Cyberlindnera* sp. 4 UFMG-XMD 8.1 ( $26,23\text{ gL}^{-1}$ ,  $0,71\text{ gg}^{-1}$  e  $0,36\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ).



**Tabela 3:** Parâmetros de conversão de xilitol em meio YPX com 50 gl<sup>-1</sup> de xilose (inóculo inicial de 1 gl<sup>-1</sup>, em 60 e 72 horas de cultivo) das linhagens de *Cyberlindnera* spp.

Espécie	Linhagem	Biomassa (gL <sup>-1</sup> )		Xilitol (gL <sup>-1</sup> )		Consumo de xilose (%)		Yp/s (gg <sup>-1</sup> )		Qp (gL <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		η (%)	
		60	72	60	72	60	72	60	72	60	72	60	72
<i>Cyberlindnera</i> sp. 1	UFMG-HMD 19.1	9,00	10,85	28,01±1,126 <sup>a</sup>	26,29±1,160 <sup>a</sup>	93,06	93,71	0,58±0,041 <sup>b,c</sup>	0,54±0,014 <sup>c,d</sup>	0,46±0,0187 <sup>a</sup>	0,36±0,0161 <sup>a</sup>	64,1	59,76
	UFMG-HMD 8.2	4,73	4,97	26,07±0,320 <sup>b</sup>	24,24±0,700 <sup>b,c</sup>	89,5	92,44	0,58±0,011 <sup>c,d</sup>	0,52±0,016 <sup>d,e</sup>	0,43±0,0053 <sup>b</sup>	0,33±0,0097 <sup>b,c</sup>	63,22	56,92
	YFGJ 79F-b	4,89	5,08	12,61±0,102 <sup>f</sup>	11,37±0,603 <sup>f</sup>	58,02	61,37	0,42±0,035 <sup>f</sup>	0,36±0,022 <sup>f</sup>	0,21±0,001 <sup>f</sup>	0,15±0,0083 <sup>f</sup>	46,01	39,20
<i>Cyberlindnera</i> sp. 2	UFMG-XMD 23.1	3,57	3,93	0,24±0,052 <sup>g</sup>	0,33±0,030 <sup>g</sup>	32,73	32,81	0,01±0,004 <sup>g</sup>	0,02±0,002 <sup>g</sup>	0,004±0,001 <sup>g</sup>	0,005±0,0004 <sup>g</sup>	1,59	2,16
<i>Cyberlindnera</i> sp. 3	YP-5.1b	5,04	5,44	17,28±1,008 <sup>d</sup>	23,91±0,843 <sup>c,d</sup>	66,41	83,96	0,55±0,047 <sup>d,e</sup>	0,60±0,035 <sup>b,c</sup>	0,28±0,0168 <sup>d</sup>	0,33±0,0117 <sup>c,d</sup>	60,70	66,45
<i>Cyberlindnera</i> sp. 4	UFMG-XMD 8.1	7,52	8,42	20,26±0,346 <sup>c</sup>	24,49±0,408 <sup>a,b</sup>	62,57	74,13	0,66±0,008 <sup>a,b</sup>	0,67±0,009 <sup>a</sup>	0,33±0,0057 <sup>c</sup>	0,34±0,0056 <sup>a,b</sup>	72,06	73,52
	UFMG-HMD 8.3	4,56	5,65	17,25±0,170 <sup>d,e</sup>	18,23±0,617 <sup>e</sup>	47,87	57,59	0,71±0,070 <sup>a</sup>	0,62±0,047 <sup>a,b</sup>	0,28±0,0028 <sup>d,e</sup>	0,25±0,0085 <sup>e</sup>	78,06	68,54

Yp/s; Qp, η, são respectivamente os fatores de conversão, produtividade e eficiência de xilitol. Como F calc > F5% pode-se concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade (p≤0,05). As médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

**Tabela 4:** Parâmetros de conversão de xilitol em meio YPX com 50 gl<sup>-1</sup> de xilose (inóculo inicial de 3 gl<sup>-1</sup>, em 60 e 72 horas de cultivo) das linhagens de *Cyberlindnera* spp.

	Linhagem	Biomassa (gl <sup>-1</sup> )		Xilitol (gl <sup>-1</sup> )		Consumo de xilose (%)		Yp/s (gg <sup>-1</sup> )		Qp (gl <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )		η (%)	
		60	72	60	72	60	72	60	72	60	72	60	72
<i>Cyberlindnera</i> sp. 1	UFMG-HMD 19.1	10,5	14,70	29,2±0,381 <sup>a</sup>	25,49±1,809 <sup>b,c</sup>	93,45	93,49	0,62±0,008 <sup>b</sup>	0,54±0,038 <sup>c</sup>	0,48±0,006 <sup>a</sup>	0,35±0,025 <sup>a</sup>	68,09	59,42
	UFMG-HMD 8.2	5,25	5,26	26,08±0,14 <sup>b</sup>	22,85±0,540 <sup>d,e</sup>	92,61	93,35	0,56±0,006 <sup>b</sup>	0,49±0,009 <sup>c</sup>	0,43±0,002 <sup>b</sup>	0,31±0,007 <sup>b,c</sup>	61,97	53,86
	YFGJ 79F-b	7,95	7,82	21,77±0,317 <sup>d,e</sup>	20,61±1,304 <sup>e,f</sup>	72,85	78,04	0,62±0,020 <sup>b</sup>	0,54±0,046 <sup>c</sup>	0,36±0,005 <sup>c</sup>	0,28±0,018 <sup>c</sup>	67,99	60,11
<i>Cyberlindnera</i> sp. 2	UFMG-XMD 23.1	7,46	8,09	0,17±0,030 <sup>g</sup>	0,35±0,094 <sup>g</sup>	27,53	31,15	0,01±0,002 <sup>c</sup>	0,02±0,007 <sup>d</sup>	0,003±0,0005 <sup>d</sup>	0,005±0,001 <sup>d</sup>	1,41	2,49
<i>Cyberlindnera</i> sp. 3	YP-5.1b	5,90	6,42	21,47±0,993 <sup>e,f</sup>	25,79±0,746 <sup>a,b</sup>	76,08	88,34	0,60±0,026 <sup>b</sup>	0,62±0,018 <sup>b</sup>	0,35±0,016 <sup>c</sup>	0,35±0,010 <sup>a</sup>	65,88	68,15
<i>Cyberlindnera</i> sp. 4	UFMG-XMD 8.1	8,89	9,45	22,17±0,472 <sup>c,d</sup>	26,23±0,654 <sup>a</sup>	65,66	77,04	0,70±0,020 <sup>a</sup>	0,71±0,008 <sup>a</sup>	0,36±0,007 <sup>c</sup>	0,36±0,009 <sup>a</sup>	77,09	77,74
	UFMG-HMD 8.3	8,32	8,7	22,77±0,268 <sup>c</sup>	23,77±0,261 <sup>c,d</sup>	62,07	73,95	0,71±0,046 <sup>a</sup>	0,63±0,018 <sup>a,b</sup>	0,38±0,004 <sup>c</sup>	0,33±0,003 <sup>a,b</sup>	78,12	68,44

Yp/s; Qp, η, são respectivamente os fatores de conversão, produtividade e eficiência de xilitol. Como F calc > F5% pode-se concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade (p≤0,05). As médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

Em todos os ensaios fermentativos realizados, a xilose foi a única fonte de carbono utilizada para consumo das leveduras e o único produto obtido por todas foi o xilitol, não havendo produção de etanol por nenhuma das linhagens. Esse fato distingue essas linhagens de outras representantes de leveduras do mesmo gênero, como *Cy. xylosilytica* e *Cy. galapagoensis*, que em trabalhos recentes apresentaram produção de etanol, ainda que em baixas quantidades (CADETE et al., 2015; GUAMÁN-BURNEO et al., 2015; PALLADINO, 2018). Essa diferença na geração predominante de um produto em relação ao outro pode ser explicada a nível molecular, pela forma como o metabolismo da levedura ocorre. Como mostrado pela figura 4, a via metabólica da D-xilose apresenta enzimas responsáveis pela metabolização desse açúcar e cada uma delas vai levar a um produto diferente, dependendo de condições como oxigenação e o cofator utilizado (ALBUQUERQUE et al., 2014). Leveduras nas quais a função enzimática da XR é estritamente dependente do cofator NADPH, ou que seu desempenho é baixo na presença de NADH, produzem xilitol como produto principal do metabolismo da D-xilose. Por outro lado, as que apresentam XR que é capaz de utilizar dois cofatores, podem oxidar NADH a  $\text{NAD}^+$  neste ponto da via, de forma a reduzir a produção de xilitol para que então haja prosseguimento até a formação de etanol (CADETE et al., 2014; CADETE et al., 2016; KWAK e JIN, 2017). Com base nos resultados apresentados pelos ensaios de fermentação e na atividade desempenhada pela xilose redutase, é possível supor que as leveduras analisadas neste trabalho possuam o primeiro tipo de XR citado acima, tendo o xilitol como seu principal produto metabólico a partir do consumo de D-xilose, uma vez que por não haver oxidação do NADH a  $\text{NAD}^+$ , não ocorre metabolismo do xilitol e, então, esse produto se acumula, sendo predominante na via metabólica.

As diferentes linhagens produziram dentro da faixa de 0,24 a 28,01  $\text{gL}^{-1}$  de xilitol quando o inóculo inicial foi de 1  $\text{gL}^{-1}$ . O destaque foi a linhagem UFMG-HMD 19.1, com a produção correspondente a 28,01  $\text{gL}^{-1}$  de xilitol, consumo de xilose de 93,06%,  $Y_{p/s} = 0,58$ ,  $Q_p = 0,46$  e eficiência 64,1% (TABELA 2). Com o inóculo inicial de 3  $\text{gL}^{-1}$ , a produção de xilitol variou entre 0,17 e 29,2  $\text{gL}^{-1}$ , com destaque também para a linhagem UFMG-HMD 19.1, cuja produção de xilitol foi de 29,2  $\text{gL}^{-1}$ , consumo de xilose de 93,45%,  $Y_{p/s} = 0,62$ ,  $Q_p = 0,48$  e eficiência de 68,09% (TABELA 3). Analisando estes resultados observa-se que com o aumento do inóculo não houve aumento significativo (4,25%) em relação a produção de xilitol. Porém, para as outras

linhagens, o aumento do inóculo propiciou um aumento na produção de xilitol. Isto pode ser observado para a linhagem YFGJ 79F-b, onde no inóculo de  $1\text{ gL}^{-1}$  ocorreu uma produção de  $12,61\text{ gL}^{-1}$  enquanto que com  $3\text{ gL}^{-1}$  de inóculo a produção foi  $21,77\text{ gL}^{-1}$ , apresentando um aumento de 72,64% de xilitol.

Em um estudo realizado por Cadete et al. (2015), linhagens de *Cy. xylosilytica* foram testadas sob cultivo com meio de mesma composição ao utilizado neste trabalho ( $50\text{ gL}^{-1}$  de xilose,  $10\text{ gL}^{-1}$  de extrato de levedura e  $20\text{ gL}^{-1}$  de peptona) e uma média de inóculo inicial de células de  $3,26\text{ gL}^{-1}$ . Em 72 horas de cultivo observou-se um consumo de xilose de 86 a 94 % e produção de xilitol em torno de  $33,02\text{ gL}^{-1}$ ,  $Y_{p/s} = 0,726\text{ gg}^{-1}$  e  $Q_p = 0,459\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ . Palladino (2018) obteve resultados em que linhagens de *Cy. xylosilytica* produziram de 37 a  $47\text{ gL}^{-1}$  de xilitol, consumo de 87,92% de xilose,  $Y_{p/s} = 0,87\text{ gg}^{-1}$ ,  $Q_p = 0,65\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e eficiência de 94,88%, também a 72 horas de cultivo. No entanto, a autora utilizou uma composição do meio ligeiramente diferente, com  $60\text{ gL}^{-1}$  de D-xilose,  $20\text{ gL}^{-1}$  de peptona,  $10\text{ gL}^{-1}$  de extrato de levedura e  $0,5\text{ gL}^{-1}$  de células. Moura (2015) testou três inóculos iniciais diferentes para produção de xilitol por *C. materiae*, sendo estes 1, 5 e  $10\text{ gL}^{-1}$  de células. A autora observou que estatisticamente não houve diferença no desempenho das leveduras quanto à produção de xilitol entre os inóculos de 5 e  $10\text{ gL}^{-1}$ , sendo que a média na produção de xilitol foi de  $30,39\text{ gL}^{-1}$ , com  $Y_{p/s}$  de  $0,104\text{ gg}^{-1}$ ,  $Q_p$  de  $0,286\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e eficiência de conversão de 72,63%. Assim, foi escolhido o inóculo de  $5\text{ gL}^{-1}$  para os ensaios em hidrolisado de bagaço de cana. Esses valores, comparados aos que foram obtidos também em 72 horas no presente trabalho (TABELA 3), permitem dizer que dentro de um mesmo gênero de leveduras espécies diferentes se comportam de maneira distinta, ainda que submetidas a condições semelhantes ou muito próximas de cultivo.

Para os ensaios seguintes a serem realizados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço-de-cana, foi selecionado o inóculo inicial de  $1\text{ gL}^{-1}$ , pois com este inoculo as leveduras apresentaram uma maior produção de xilitol em meio complexo. As leveduras que se destacaram estatisticamente para esse teste de cultivo foram as linhagens UFMG-HMD 19.1, UFMG-HMD 8.2, YFGJ 79F-b e YP-5.1b.

#### 5.4 Cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

De acordo com o que foi observado ao longo dos experimentos e pelos resultados de desempenho finais, o hidrolisado pode ser considerado um meio desfavorável para o cultivo das linhagens de *Cyberlindnera*. Isto pode ter ocorrido em

função de uma maior quantidade de inibidores, como o ácido acético, presente no hidrolisado. Moura (2015) também observou resultados semelhantes para o crescimento em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar para linhagens de *C. materiae*. Sob essas condições, os melhores resultados para a produção de xilitol foram obtidos pela linhagem UFMG-HMD 8.2, cuja produção foi de 15,22 gL<sup>-1</sup> de xilitol, apresentando consumo de xilose de 54,95%,  $Y_{p/s}$  de 0,603 gg<sup>-1</sup>,  $Q_p$  de 0,105 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e  $\eta$  de 65,75% em 144 horas de fermentação. Por outro lado, a linhagem YP-5.1b apresentou um desempenho muito baixo, levando em conta o mesmo tempo de fermentação, tendo produzido 4,70 gL<sup>-1</sup> de xilitol a partir de um consumo de 43,67% da xilose disponível no meio,  $Y_{p/s}$  de 0,33 gg<sup>-1</sup>,  $Q_p$  de 0,03 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e eficiência de conversão de 35,59%. Assim como nos demais ensaios, para os que foram realizados em meio YPX não houve produção de etanol por nenhuma das leveduras envolvidas. No que diz respeito ao consumo dos açúcares presentes no hidrolisado foi observado que todas as linhagens consumiram praticamente toda a glicose nas primeiras 48 horas (dados não mostrados). Também houve diferenças no consumo da xilose entre elas: YFGJ 79F-b consumiu 39,52%; UFMG-HMD 8.2 apresentou um consumo de 54,95%; e a linhagem UFMG-HMD 19.1 consumiu 60,19% da pentose. Todos esses valores são referentes ao tempo máximo de cultivo, ou seja, 144 horas. Esse é um fator que pode ter ocorrido pela maneira como o hidrolisado é tratado. Em um estudo realizado por Arruda (2011), o consumo de xilose por *M. guillermondii* caiu de 97% para 72% quando o hidrolisado foi submetido ao simples ajuste de pH, o que mostra a importância de um tratamento apurado do hidrolisado para a realização de testes desse tipo. Os dados de análise estatística correlacionando o desempenho das três linhagens e dos parâmetros fermentativos referentes aos demais tempos do ensaio estão nos anexos 3 e 4, respectivamente. Mas na literatura há dados de leveduras com bom desempenho na produção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana. Guamán-Burneo et al. (2015) testaram uma linhagem de *Cy. galapagoensis* cuja produção de xilitol foi de 23,98 gL<sup>-1</sup>, com  $Y_{p/s}$  de 0,64 gg<sup>-1</sup>,  $Q_p$  de 0,33 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e eficiência de conversão de 70,58%, além de uma linhagem de *Candida tropicalis* que apresentou os maiores valores de produção de xilitol, sendo 27,12 gL<sup>-1</sup>,  $Y_{p/s}$  0,67 gg<sup>-1</sup>,  $Q_p$  0,38 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e eficiência de conversão de 73,50%. Há estudos que mostram a produção de xilitol através de suplementação do hidrolisado de bagaço de cana. Isso é feito pela adição de substâncias que promovem o crescimento microbiano e, também, aceleram o metabolismo celular durante o processo fermentativo, sendo algumas delas aminoácidos, proteínas, vitaminas, minerais e fontes de nitrogênio (MARTINI et al.,

2016; LORLIAM et al., 2017). Dentre estas fontes de suplementação podem-se destacar farelo de arroz, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, extrato de levedura e peptona (GUAMÁN-BURNEO et al., 2015; MARTINI, et al., 2016; THANCHAROEN et al., 2016; LORLIAM et al., 2017; BAPTISTA et al., 2018). Martini et al. (2016) observaram, em estudos com uma linhagem de *M. guillemondii*, que a suplementação do hidrolisado com extrato de levedura teve efeito no aumento do consumo da xilose disponível no meio, uma vez que no hidrolisado sem suplementação houve uma concentração residual de xilose ao fim do período fermentativo. Em outro estudo, essa mesma espécie foi cultivada em hidrolisado contendo  $50 \text{ gL}^{-1}$  de xilose com suplementação de farelo de arroz ( $20 \text{ gL}^{-1}$ ),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $2,0 \text{ gL}^{-1}$ ) e  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0,1 \text{ gL}^{-1}$ ). O inóculo inicial de células foi também de  $1,0 \text{ gL}^{-1}$  e volumes de meio diferentes, 25 e 50 mL em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Sob essas condições, a produção de xilitol (em 25 mL de hidrolisado) foi de  $16,20 \text{ gL}^{-1}$ ,  $Y_{p/s}$   $0,67 \text{ gg}^{-1}$ ,  $Q_p$   $0,34 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e eficiência de 50,91% (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al, 2016). Palladino (2018) utilizou sulfato de amônio, extrato de farelo de arroz e extrato de levedura como fontes de suplementação para o processo fermentativo em hidrolisado de bagaço de cana, sendo que foram feitas diferentes interações entre tais fontes, a fim de se observar qual seriam os resultados a partir disso. O melhor resultado foi obtido a partir de um planejamento fatorial que incluiu extrato de farelo de arroz ( $10 \text{ gL}^{-1}$ ) e extrato de levedura ( $1,0 \text{ gL}^{-1}$ ), com uma quantidade de 25 mL de meio em frascos de 125 mL e inóculo inicial de  $1,0 \text{ gL}^{-1}$ . Nessas condições, a linhagem de *Cy. xylosilytica* testada produziu  $22,13 \text{ gL}^{-1}$  de xilitol em 120 horas, com  $Y_{p/s}$   $0,75 \text{ gg}^{-1}$ ,  $Q_p$   $0,18 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  e eficiência de 82,27%. Resultados como estes apontam para a potencialidade em se fazer um planejamento otimizado para suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana com o objetivo de alcançar parâmetros mais elevados na produção de xilitol.

**Tabela 5:** Dados para cultivo para os tempos de 72, 96 e 144 utilizando hidrolisado hemicelulósico para os isolados de *Cyberlindnera* estudados.

	Leveduras	Tempo (h)	Consumo de xilose %	Xilitol (gL <sup>-1</sup> )	Y <sub>p/s</sub> (gg <sup>-1</sup> )	Q <sub>p</sub> (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	η (%)
<i>Cyberlindnera</i> sp. 1	<b>UFMG-HMD19.1</b>	72	35,42	8,14	0,42	0,11	45,76
		96	47,73	10,29	0,42	0,10	45,85
		144	60,19	11,49	0,38	0,08	42,32
	<b>UFMG-HMD8.2</b>	72	27,32	8,88	0,61	0,12	66,55
		96	38,21	11,51	0,61	0,11	66,90
		144	54,95	15,22	0,60	0,10	65,75
	<b>YFGJ 79F-b</b>	72	25,16	5,36	0,36	0,07	39,97
		96	31,90	7,63	0,43	0,07	47,75
		144	39,52	11,56	0,56	0,08	61,16
<i>Cyberlindnera</i> sp. 3	<b>YP-5.1b</b>	72	37,03	3,48	0,29	0,05	31,11
		96	40,85	3,98	0,30	0,04	32,24
		144	43,67	4,70	0,33	0,03	35,59

## 6. Conclusões

As linhagens de *Cyberlindnera* sp. 1 UFMG-HMD-8.2 e YFGJ79F-b foram capazes de formar esporos sexuais (ascósporos), o que possibilita a descrição da espécie com a caracterização do ciclo sexual.

Na bioconversão da xilose para a produção de xilitol, de maneira geral não houve diferença estatística em relação à quantidade de inoculo inicial utilizado. As linhagens de *Cyberlindnera* mais promissoras para a produção de xilitol nos ensaios com meio complexo foram UFMG-HMD 19.1, UFMG-HMD 8.2, YFGJ 79F-b e YP-5.1b.

Nenhum dos isolados de *Cyberlindnera* testados produziu etanol a partir da xilose. Isto sugere que estas espécies possuem uma xilose redutase (XR) estritamente dependente do cofator NADPH, ou que o desempenho desta enzima é baixo na presença de NADH, produzindo xilitol como produto principal do metabolismo da D-xilose.

Na fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, mesmo com a interferência de inibidores, as leveduras consumiram toda a glicose presente no meio nas primeiras 48 horas e o consumo de xilose foi variado ao longo do tempo. A linhagem UFMG-HMD 8.2 foi a com maior potencial para a produção de xilitol, consumindo 54,95% da xilose e produzindo 15,22 gL<sup>-1</sup> do polioliol em 144 horas. Portanto, esta levedura poderá ser utilizada em futuros ensaios visando otimizar a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.



## 7. Referências bibliográficas

- ABDUL MANAF, S. F; LUTHFI, A. A. I; JAHIM, J. M; HARUN, S. (2017).** Interaction effects of pH and inhibitors in oil palm frond (OPF) hemicelulosic hydrolysate on xylitol production: A statistical study. *J. Phys. Sci.*, 28(Supp. 1), 241–255, <https://doi.org/10.21315/jps2017.28.s1.16>
- ARRUDA, P. V.** Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Tese de doutorado. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2011.
- BAPTISTA, S.L.; CUNHA, J.T.; ROMANÍ, A.; DOMINGUES, L.** Xylitol production from lignocellulosic whole slurry corn cob by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *Bioresource Technology*. v 267, p. 481-491, 2018.
- BRIONES-ROBLERO, C.I., RODRÍGUEZ-DÍAZ, R., SANTIAGO-CRUZ, J.A., ZÚÑIGA, G., RIVERA-ORDUÑA, F.N. (2017).** Degradation capacities of bacteria and yeasts isolated from the gut of *Dendroctonus rhizophagus* (Curculionidae: Scolytinae). *Folia Microbiol (Praha)*. 2017 Jan;62(1):1-9. doi: 10.1007/s12223-016-0469-4. Epub 2016 Aug 20.
- BUERTH, C., TIELKER, D., ERNST, J.F. (2016).** *Candida utilis* and *Cyberlindnera (Pichia) jadinii*: yeast relatives with expanding applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Aug;100 (16):6981-90. doi: 10.1007/s00253-016-7700-8. Epub 2016 Jun 29.
- BURGESS, E.R.I.V., KING, B.H. (2017).** Insecticidal potential of two sugar alcohols to *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, Volume 110, Issue 5, 1 October 2017, Pages 2252–2258, <https://doi.org/10.1093/jee/tox190>
- CADETE, R.M., MELO-CHEAB, M.A., DUSSÁN, K.J., RODRIGUES, R.C.L.B., DA SILVA, S.S., GOMES, F.C.O., ROSA, C.A. (2017).** Production of bioethanol in sugarcane bagasse hemicelulosic hydrolysate by *Scheffersomyces parashehatae*, *Scheffersomyces illinoensis*, and *Spathaspora arborariae* isolated from Brazilian ecosystems. *J Appl Microbiol*. 2017 Aug 11. doi: 10.1111/jam.13559
- CADETE, R.M., MELO-CHEAB, M.A., VIANA, A.L., OLIVEIRA, E.S.,**

**FONSECA, C., ROSA, C.A. (2016).** The yeast *Scheffersomyces amazonensis* is an efficient xylitol producer. *World J Microbiol Biotechnol.* 2016 Dec;32(12):207

**CADETE, R. M., DE LAS HERAS, A. M., SANDSTRÖM. A. G; FERREIRA, C., GÍRIO, F., GORWA-GRAUSLUND, M. F., ROSA, C. A., FONSECA, C. (2016).** 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*, 9:167

**CADETE, R. M., MELO, M. A., DUSSÁN, K. J., RODRIGUES, R. C. L. B., SILVA, S. S., ZILLI, J. E., VITAL, M. J. S., GOMES, F. C. O., LACHANCE, M. C., ROSA, C. A. (2012).** Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian forest. *PLoS One*, 7(8), e43135.

**CADETE, R. M.; FONSECA, C.; ROSA, C. A.** Novel Yeast Strains from Brazilian Biodiversity: Biotechnological Applications in Lignocellulose Conversion into Biofuels. *Biofuels in Brazil*, Chapter 12, p.255-279, 2014.

**CADETE, R. M., CHEAB, M. A., SANTOS, R. O., SAFAR, S. V., ZILLI, J. E., VITAL, M. J. S., BASSO, L. C., LEE, C., KURTZMAN, C. P., LACHANCE, M. A., ROSA, C. A. (2015).** *Cyberlindnera xylosilytica* sp. nov., a xylitol-producing yeast species isolated from lignocellulosic materials. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, ijs-0.

**CAMARGO, D., SENE, L., VARIZ, D. I. L. S., DE ALMEIDA FELIPE, M. D. G. (2015).** Xylitol Bioproduction in Hemicellulosic Hydrolysate Obtained from Sorghum Forage Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(8), 3628-3642.

**CANILHA, L., RODRIGUES, R. C. L. B., ANTUNES, F. A. F., CHANDEL, A. K., MILESSI, T. S. S., FELIPE, M. D. G. A., SILVA, S. S. (2013).** Bioconversion of hemicellulose from sugarcane biomass into sustainable products. *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-Techniques, applications and commercialization*, 1, 15-45

**CHEN, X., JIANG, Z. H., CHEN, S., QIN, W. (2010).** Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application. *International Journal of Biological Sciences*, 6(7), 834.

**CHENG, K. K., LING, H. Z., ZHANG, J. A., PING, W. X., HUANG, W., GE, J. P., XU, J. M. (2010).** Strain isolation and study on process parameters for xylose-to-xylitol bioconversion. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(1), 1606-1611.

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

**DE ALBUQUERQUE, T. L., DA SILVA, I. J., DE MACEDO, G. R., ROCHA, M. V. P. (2014).** Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. *Process Biochemistry*, 49(11), 1779-1789.

**DE OLIVEIRA, V. M., SETTE, L. D., FANTINATTI-GARBOGGINI, F. (2006).** Preservação e prospecção de recursos microbianos.

**DE SOUSA, E. T., MAIA, F. B. M., ALVES, V. F., DE ARAÚJO, J. S. M., FORTE, F. D. S., SAMPAIO, F. C. (2017).** Caries Incidence in a Healthy Young Adult Population in Relation to Diet. *Rev Odonto Cienc* 2017;32(1):23-27. <http://dx.doi.org/10.15448/1980-6523.2017.1.23281>.

**DIOUF, M., KEBE, M., GUIRASSY, M. L., DIOP, M., DIOUF, A., KANOUE, A., GUINAN, J. C., DIENG, A., SANGHARE, A. D., CISSE, D., FAYE, D., LO, C. M. (2017).** Dental Caries and Associated Determinants among Students of the Military School of Saint Louis (Senegal). *Open Journal of Epidemiology*, 2017, 7, 299-306 <http://www.scirp.org/journal/ojepi> ISSN Online: 2165-7467 ISSN Print: 2165-7459

**DUSSÁN, K.J., SILVA, D.D.V., PEREZ, V.H., SILVA, S.S.** Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. *Renew. Energy*, 87, 703-710, 2016.

**EL-BRAZ, A.F.; SHETAIA, Y.M.; ELKHOULI, R.R.** Xylitol production by *Candida tropicalis* under different statistically optimizes growth conditions. *African Journal of Biotechnology*, v. 10(68): p. 15353-15363, 2011.

**ERYASAR, K., KARASU-YALCIN, S. (2016).** Evaluation of some lignocellulosic byproducts of food industry for microbial xylitol production by *Candida tropicalis*. 3

Biotech (2016) 6:202 DOI 10.1007/s13205-016-0521-8

**GHAFFAR, A., YAMEEN, M., ASLAM, N., JALAL, F., NOREEN, R., MUNIR, B., MAHMOOD, Z., SALEEM, S., RAFIQ, N., FALAK, S., TAHIR, I, M., NOMAN, M., FAROOQ, M, U., QASIM, S., LATIF, F. (2017).** Acidic and enzymatic saccharification of waste agricultural biomass for biotechnological production of xylitol. *Chemistry Central Journal* (2017) 11:97 DOI 10.1186/s13065-017-0331-z

**GHASEMI, E., MAZAHERI, R., TAHMOURESPOUR, A. (2017).** Effect of Probiotic Yogurt and Xylitol-Containing Chewing Gums on Salivary S Mutans Count. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry* Volume 41, Number 4/2017.

**GHINDEA, R., CSUTAK, O., STOICA, I., TANASE, A. M., VASSU, T. (2010).** Production of xylitol by yeasts. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(3), 5217-5222.

**GRANSTRÖM, T. B., IZUMORI, K., LEISOLA, M. (2007).** A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007a, roč, 74, 273-276.

**GRANSTRÖM, T. B., IZUMORI, K., LEISOLA, M. (2007).** A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(2), 273-276.

**GUAMÁN-BURNEO, M. C., DUSSÁN, K. J., CADETE, R. M., CHEAB, M. A., PORTERO, P., CARVAJAL-BARRIGA, E. J., ... & ROSA, C. A. (2015).** Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* fa, sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(4), 919-931.

**GUEIMONDE, L., VESTERTLUND, S., GARCÍA-POLA, M, J., GUEIMONDE, M., SODERLIND, E., SALMINEN, S. (2016).** Supplementation of xylitol containing chewing gum with probiotics: a double blind, randomised pilot study focusing on saliva flow and saliva properties. *Food Funct.*, 2016, 7, 1601–1609- The Royal Society of Chemistry 2016.

**GUPTA, M. (2018).** Sugar Substitutes: Mechanism, Availability, Current Use and Safety Concerns-An Update. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018 Oct 19;6(10):1888-1894. doi: 10.3889/oamjms.2018.336. eCollection.

**HAHN-HAGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A (1994).** Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 16, p. 933-943.

**HERNÁNDEZ-PÉREZ, A.F.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A.** Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Brazilian Journal of Microbiology.* 47, p. 489-496, 2016.

**HOF, H., AMANN, V., TAUBER, C., PAULUN, A. (2017).** Peritonitis in a neonate due to *Cyberlindnera fabianii*, an ascomycetic yeast. *Infection.* 2017 Aug 20. doi: 10.1007/s15010-017-1062-8.

**IQBAL, H, M, N., KYAZZE, G., KESHAVARZ, T. (2013).** Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: an overview. *Biotech applications of biomass*, *BioResources* 8(2), 3157-3176.

**JÖNSSON, L.J.; MARTÍN, C.** Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* 199, 103–112, 2016.

**JUNYAPATE, K., JINDAMORAKOT, S., LIMTONG, S. (2014).** *Yamadazyma ubonensis* fa, sp. nov., a novel xylitol-producing yeast species isolated in Thailand. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(3), 471-480.

**KIM, H., LEE, H.S., PARK, H., LEE, D.H., BOLES, E., CHUNG, D., PARK, Y.C. (2017).** Enhanced production of xylitol from xylose by expression of *Bacillus subtilis* arabinose: H<sup>+</sup> symporter and *Scheffersomyces stipitis* xylose reductase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* Volume 107, December 2017, Pages 7-14 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.07.014>

**KUMAR, P., BARRETT, D. M., DELWICHE, M. J., & STROEVE, P. (2009).** Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713-3729.

**KUMAR, S., DHEERAN, P., SINGH, S. P., MISHRA, I. M., ADHIKARI, D. K.**

(2015). Bioprocessing of bagasse hydrolysate for ethanol and xylitol production using thermotolerant yeast. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(1), 39-47.

**KWAK, S., JIN, Y. (2017).** Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. *Microb Cell Fact* (2017) 16:82 DOI 10.1186/s12934-017-0694-9.

**LÓPEZ-LINARES, J.C.; ROMERO, I.; CARA, C.; CASTRO, E.; MUSSATO, S.I.** Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresource Technology* 247, 736–743, 2018.

**LORLIAM, W.; AKARACHARANYA, A.; KRAJANGSANG, S.; TOLIENG, V.; TANASUPAWAT, S.** Optimization of Xylitol Production by *Candida tropicalis* A26. *Chiang Mai J. Sci.* 44(1) : 50-58, 2017.

**LOURENÇO, M. V. M.** Seleção de Leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2009.

**MADEN, E. A., ALTUN, C., OZMEN, B., BASAK, F. (2018).** Antimicrobial Effect of Toothpastes Containing Fluoride, Xylitol, or Xylitol-Probiotic on Salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* in Children. *Niger J Clin Pract* 2018;21:134-8.

**MÄKINEN, K. K (2010).** Sugar alcohol sweeteners as alternatives to sugar with special consideration of xylitol. *Med Princ Pract* 2011;20:303–320 DOI: 10.1159/000324534

**MARDAWATI, E., ANDOYO, R., SYUKRA, K.A., KRESNOWATI, M.T.A.P., BINDAR, Y. (2018).** Production of xylitol from corn cob hydrolysate through acid and enzymatic hydrolysis by yeast. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* 141 (2018) 012019

**MARTÍNEZ-CORONA, R., GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J.C., RADAMES-TREJO, V., CORTÉS-PENAGOS, C., CHÁVEZ-PARGA, M.C., ZAMUDIO-JARAMILLO, M.A. (2015).** Effect of initial substrate concentration and agitation on xylitol production by fermentation of hydrolyzed tamarind seed media with *Kluyveromyces marxianus* *Revista Mexicana de Ingeniería Química* Vol. 14, No. 2 (2015) 393-403.

**MARTINI, C.; TAUKE-TORNISIELO, S.M.; BASTOS, R.G.; CECCATO-ANTONINI, S.R.** A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. *World J Microbial Biotechnology*, 32:80, 2016.

**MISRA, S., RAGHUWANSHI, S., SAXENA, R. K. (2013).** Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1596-1601.

**MIURA, M., WATANABE, I., SHIMOTORI, Y., AOYAMA, M., KOJIMA, Y., KATO, Y. (2013).** Microbial conversion of bamboo hemicellulose hydrolysate to xylitol. *Wood Science and Technology*, 47(3), 515-522.

**MOHAMAD, N. L.; KAMAL, S. M. M.; MOKHTAR, M. N.** Xylitol Biological Production: A Review of Recent Studies. *Food Reviews International*, v. 31: p. 74–89, 2015.

**MORALES-RODRIGUEZ, R., PEREZ-CISNEROS, E. S., DE LOS REYES-HEREDIA, J.A., RODRIGUEZ-GOMEZ, D. (2015).** Evaluation of biorefinery configurations through a dynamic model-based platform: Integrated operation for bioethanol and xylitol coproduction from lignocellulose. *Renewable Energy* 89 (2016) 135-143.

**MOURA, M.** Produção de etanol e xilitol a partir de D-xilose por linhagens *Candida (Spathaspora) materiae*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG, 2015.

**MUSSATO, S. I. (2002).** Application of xylitol in food formulations and benefits for health. D-Xylitol, chapter 14, pp 309-323.

**MUSSATTO, S. I., ROBERTO, I. C. (2002).** Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(4), 401-413.

**PALLADINO, F. P. (2018).** Avaliação da produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar por linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis*. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais.

**PHAFF, H.J.** Yeasts - ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001 Nature Publishing Group / www.els.net. University of California, Davis, California, USA

**PRAKASH, G., VARMA, A. J., PRABHUNE, A., SHOUCHE, Y., RAO, M. (2011).** Microbial production of xylitol from d-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Bioresource Technology, 102(3), 3304-3308.

**PRAKASHAM, R. S., RAO, R. S., HOBBS, P. J. (2009).** Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, 3(1), 8-36.

**RAFIQUL, I. S. M., SAKINAH, A. M. M. (2012).** A perspective bioproduction of xylitol by enzyme technology and future prospects. International Food Research Journal, 19(2), 405-408.

**RAFIQUL, I. S. M., SAKINAH, A. M. (2013).** Processes for the production of xylitol—a review. Food Reviews International, 29(2), 127-156.

**RAO, L.V.; GOLI, J.K.; GENTELA, J.; KOTI, S.** Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. Bioresource Technology, 213, p. 299–310, 2016.

**RUEDA, C.; CALVO, P.A.; MONCALIÁN, G.; RUIZ, G.; COZ, A.** Biorefinery options to valorize the spent liquor from sulfite pulping. Chemical Technology and Biotechnology. v.90, Issue12, p. 2218-2226, 2015.

**SAKALLIOĞLU, Ö., GÜVENÇ, I. A., CINGI, C. (2014).** Xylitol and its usage in ENT practice. The Journal of Laryngology & Otology, 128(07), 580-585.

**SALLI, K.M., GÜRSOY, U.K., SÖDERLING, E.M., OUWEHAND, A.C.** Effects of Xylitol and Sucrose Mint Products on Streptococcus mutans Colonization in a Dental Simulator Model. Curr Microbiol. 2017 Jul 17. doi: 10.1007/s00284-017-1299-6

**SANTOS, E.F.S.; SCHAUTZ, L.C.A.; CARDOSO, C.A.L.; ERNANDES, J.R.; BATISTOTES, M.** O efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais. Ciência e Natura, v. 35 n. 2, p. 009-014, 2013.



**SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K.** Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, v. 37, p. 19-27, 2012.

**SILVA, J. P. A.; MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. (2012)** Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renewable Energy*, v. 37: p. 259-265.

**SOOCH, B. S., LUGANI, Y., OBEROI, S. (2017).** Xylitol: a sugar substitute for patients of diabetes mellitus.

**SOUZA A.P.; GRANDIS, A.; LEITE, D.C.C.; BUCKERIDGE, M.S.** Sugarcane as a bioenergy source: history, performance, and perspectives for second-generation bioethanol. *BioEnergy Research*, v. 7, p. 24-35, 2014.

**SU, B., WU, M., LIN, J., YANG, L. (2013).** Metabolic engineering strategies for improving xylitol production from hemicellulosic sugars. *Biotechnology letters*, 35(11), 1781-1789.

**THANCHAROEN, K.; DEESEENTHUM, S.; VICHITPHAN, K.** Potential of xylose-fermented yeast isolated from sugarcane bagasse waste for xylitol production using hydrolysate as carbon source. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 38 (5), 473-483, 2016.

**TRACHOOTHAM, D., CHINGSUWANROTE, P., YOOSADIANG, P., MEKKRIANGKRAI, D., RATCHAWONG, T., BURAPACHEEP, N., KIJANUKUL, S., SAEKHOW, S., PONGPITCHAYADEJ, O., VONGVACHVASIN, K., SITTIKORNPAIBOON, P., TUNTIPOPIPAT, S. (2017).** Partial substitution of glucose with xylitol suppressed the glycolysis and selectively inhibited the proliferation of oral cancer cells. *Journal Nutrition and Cancer* Volume 69, 2017- Issue 6. Pages 862- 872.

**UR-REHMAN, S., MUSHTAQ, Z., ZAHOOR, T., JAMIL, A., MURTAZA, M. A. (2015).** Xylitol: A Review on Bioproduction, Application, Health Benefits, and Related Safety Issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1514-1528.

**VENKATESWAR RAO, L., GOLI, J.K., GENTELA, J., KOTI, S. (2016).** Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. *Bioresource Technology*, August 2016, Vol.213, pp.299-310.

**VERAS, H.C.T., PARACHIN, N.S., ALMEIDA, J.R.M. (2017).** Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. *Microbial Cell Factories* (2017) 16:153 DOI 10.1186/s12934-017-0766-x

**VERNACCHIO, L., CORWIN, M. J., VEZINA, R. M., PELTON, S. I., FELDMAN, H. A., COYNE-BEASLEY, T., MITCHELL, A. A. (2014).** Xylitol syrup for the prevention of acute otitis media. *Pediatrics*, 133(2), 289-295.

**WALKER, G.M.** Yeasts- University of Abertay Dundee, Dundee, Scotland. (2009) Elsevier Inc. All rights reserved.

**XAVIER, F.D.** Produção biotecnológica de xilitol a partir da fração hemicelulósica da fibra de sisal. Tese de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

**YABLOCHKOVA, E. N., BOLOTNIKOVA, O. I., MIKHAILOVA, N. P., NEMOVA, N. N., GINAK, A. I. (2003).** The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. *Microbiology*, 72(4), 414-417.

**YARROW, D.** Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. In: KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. (Ed.). *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science B. v. p. 77-100, 1998.

**YEWALE, T., PANCHWAGH, S., SAWALE, S., JAIN, R., DHAMOLE, P.B. (2017).** Xylitol production from non-detoxified and non-sterile lignocellulosic hydrolysate using low-cost industrial media components. *3 Biotech*. 2017 May;7(1):68. doi: 10.1007/s13205-017-0700-2

**YOUSOFF, S.N.M., BAHARIN, A., ABDULLAH, A. (2017)** Deep Neural Network Method for the Prediction of Xylitol Production. *Indonesian Journal of Electrical Engineering and Computer Science*. Vol. 5, No. 3, March 2017, pp. 691 ~ 696. DOI: 10.11591/ijeecs.v5.i3.pp691-696

**Anexo 1****Tabela 6:** Fontes de carbono utilizadas nos testes fisiológicos.

---

1- Glicose	21- Eritritol
2- Galactose	22- Ribitol (adonitol)
3- L-sorbose	23- Galactitol (dulcitol)
4- Maltose	24- D-manitol
5- Sacarose	25- D-glucitol (sorbitol)
6- Celobiose	27- Salicina
7- Trealose	31- DL-lactato
8- Lactose	32- Succinato
9- Melibiose	33- Citrato de sódio
10- Rafinose	34- M-inositol
11- Melizitose	35- Metanol
12- Inulina	36- Hexadecano
13- Amido solúvel	37- Glucosamina
14- D-xilose	38- Xilitol
15- L-arabinose	39- Acetona (volátil)
16- D-arabinose	40- Etilacetato (volátil)
17- Ribose	41- Isopropanol (volátil)
18- L-raminose	42- Gluconato
19- Etanol (volátil)	43- N-acetilglicosamina
20- Glicerol	

---

**Tabela 7:** Resultados para os testes de assimilação de diferentes fontes de carbono para as leveduras estudadas.

N° da amostra	1	2	3	4	5	6
Código Amostra YNB-Br	XMD-8.1	XMD-23.1	HMD-8.2	HMD-19.1	YFGJ79F-b	YP-5.1b
1	3	3	3	3	3	3
2	1	1	1	1	1	1
3	-	-	3	-	3	1
4	3	3	3	3	3	3
5	3	3	3	3	3	3
6	3	3	3	3	3	3
7	-	3	3	3	3	3
8	-	-	-	-	-	-
9	-	3	-	-	-	-
10	3	3	3	3	3	3
11	3	2	3	3	3	3
12	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
13	-	-	-	-	-	-
14	3	3	3	3	3	3
15	-	-	2	-	-	-
16	-	-	-	0,5	1	1

17	-	-	-	-	-	-
18	3	0,5	3	3	3	3
19	3	3	3	3	3	3
20	3	3	3	3	3	3
21	-	-	-	-	-	-
22	3	3	1	1	-	-
23	-	1	1	1	-	-
24	3	2	3	3	3	3
25	3	3	3	3	3	3
27	3	1,5	3	3	3	3
31	3	3	3	3	3	3
32	3	3	3	3	3	3
33	3	2	1,5	2	2	3
34	-	-	-	-	-	-
35	0,5	0,5	0,5	-	0,5	0,5
36	-	0,5	-	-	-	-
37	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
38	-	1	3	2	3	1
39	-	-	-	-	-	-
40	3	3	3	3	3	3
41	0,5	1	-	-	-	-
42	3	1	3	3	3	3
43	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
YCB-Br	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	3	-	-	-	-

**TABELA 7: continuação**

N° da amostra	1	2	3	4	5	6
Código	XMD-8.1	XMD-23.1	HMD-8.2	HMD-19.1	YFGJ79F-b	YP-5.1b
Nitrito	-	3	-	-	-	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-
Carbonato	3	1	2	2	*	-
Ác. acético	-	-	-	-	-	-
50% glicose	-	-	-	-	-	-
0,01 Ciclo	-	-	-	-	-	-
Sem aa	3	3	3	3	3	3

**Tabela 8:** Resultados para os testes de fermentação de glicose das leveduras (b e B = bolha de gás).

<b>Código</b>	24h	48h	3d	4d	7d	10d	14d
XMD-8.1	-	-	1	3			
XMD-23.1	-	-	3				
HMD-8.2	-	1	2	3			
HMD-19.1	-	-	2	3			
YFGJ79F-b	-	-	2	3			
YP-5.1b	-	-	-	-	b	B	B

**Tabela 9:** Crescimento das leveduras em ágar Sabouraud em diferentes temperaturas.

<b>Código</b>	<b>Sb 37°C</b>				<b>Sb 40°C</b>			
	1d	2d	3d	4d	1d	2d	3d	4d
XMD-8.1	2	3	3	3	-	-	-	-
XMD-23.1	2	3	3	3	-	-	-	-
HMD-8.2	2	3	3	3	2	3	3	3
HMD-19.1	2	3	3	3	2	3	3	3
YFGJ79F-b	2	3	3	3	2	3	3	3
YP-5.1b	2	3	3	3	-	2	2	2

## **Anexo 2**

### **Seleção das linhagens de *Cyberlindnera* sp. quanto à produção de xilitol.**

Com o objetivo de selecionar as linhagens que melhor produzem xilitol, foram coletadas diferentes amostras no período de 72 horas de fermentação, sendo o meio sintético utilizado composto por 50 gL<sup>-1</sup> de xilose, 20 gL<sup>-1</sup> de peptona e 10 gL<sup>-1</sup> de extrato de levedura. Os dados descritos abaixo se referem a essas amostras.

1) Seleção de linhagens de *Cyberlindnera sp.* em meio sintético de fermentação.

Valores obtidos a partir de processo fermentativo para a produção de xilitol contendo 50 gL<sup>-1</sup> de xilose pura.

**Tabela 10:** Média dos parâmetros fermentativos utilizando 3 gL<sup>-1</sup> de inóculo inicial e 50 gL<sup>-1</sup> de xilose.

Linhagem	Tempo (h)	Biomassa final (gL <sup>-1</sup> )	Xilose (gL <sup>-1</sup> )	Xilitol (gL <sup>-1</sup> )	Consumo de xilose (%)	Yp (gg <sup>-1</sup> )	Qp (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Eficiência (%)
<b>UFMG-HMD 19.1</b>	0,000	3,72	50,033±0,076	0,000±0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	4,79	31,460±3,388	8,23±0,688	37,122	0,443	0,686	48,341
	24,000	5,51	21,593±0,397	18,03±0,899	56,842	0,634	0,751	69,148
	36,000	7,64	11,307±0,661	25,31±1,370	77,402	0,653	0,702	71,262
	48,000	8,85	4,587±0,496	26,58±0,346	90,833	0,585	0,553	63,780
	60,000	10,50	3,273±0,030	29,20±0,381	93,458	0,624	0,486	68,099
	72,000	14,70	3,253±0,050	25,49±1,809	93,498	0,545	0,354	59,429
<b>UFMG-HMD 8.2</b>	0,000	3,00	49,550±0,482	0,000±0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	4,05	31,627±0,516	6,41±0,075	36,172	0,357	0,533889	38,980
	24,000	4,59	22,107±0,763	14,91±0,287	55,385	0,543	0,621389	59,261
	36,000	4,70	12,253±0,303	23,53±0,777	75,271	0,631	0,653704	68,809
	48,000	4,99	5,460±0,207	25,59±0,011	88,981	0,580	0,533056	63,286
	60,000	5,25	3,660±0,069	26,08±0,140	92,614	0,568	0,434667	61,976
	72,000	5,26	3,293±0,011	22,85±0,540	93,354	0,494	0,317315	53,862
<b>YFGJ 79F-b</b>	0,000	2,97	47,917±0,682	0,000±0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	4,24	34,793±1,038	4,96±0,539	27,388	0,378	0,413333	41,216
	24,000	5,09	29,173±1,051	13,39±0,271	39,117	0,715	0,558056	77,924





<b>UFMG-HMD 8.3</b>	0,000	3,13	51,217±1,435	0,000±0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	4,39	45,540±1,129	4,33±0,197	11,084	0,763	0,361	83,245
	24,000	4,16	45,200±11,378	9,95±0,102	11,747	1,654	0,414	180,403
	36,000	6,97	30,313±1,180	15,61±0,564	40,814	0,747	0,433	81,419
	48,000	7,91	22,920±0,103	20,46±0,450	55,249	0,723	0,426	78,850
	60,000	8,32	19,427±0,393	22,77±0,268	62,070	0,716	0,379	78,121
	72,000	8,70	13,340±0,582	23,77±0,261	73,954	0,628	0,330	68,446

$Y_p/s$ ,  $Q$ ,  $\eta$  são respectivamente os fatores de conversão, a produtividade e a eficiência de xilose em xilitol.

### Anexo 3

#### Análise estatística

Tabela da análise de variância.

A variabilidade presente em um ensaio é analisada com o auxílio de um quadro padrão denominado Tabela de Análise de Variância, onde as colunas referem-se:

**FV** – Fontes de Variação – Nesta coluna são descritas as causas de variabilidade dos dados do experimento. O interesse do pesquisador está em conhecer a variabilidade entre os Tratamentos, as outras fontes de variabilidade são agrupadas em resíduos (correspondente à variabilidade existente Dentro do Tratamentos).

**GL** – Graus de Liberdade – A cada fonte de variação está associado um número de graus de liberdade.

**SQ** – Somas de Quadrados - São as somas dos quadrados de desvios calculadas para cada fonte de variação.

**QM** – Quadrados Médios - São obtidos pela razão entre as Somas de Quadrados e os seus respectivos graus de liberdade. Pode-se demonstrar que são estimativas de variâncias.

**F<sub>calc</sub>** – valor da estatística F - É o valor obtido para a estatística do teste de F, dado pela razão entre os QM de Tratamentos e o QM do Resíduo.

Os números de 1 a 7 representam as linhagens de *Cyberlindnera*. As letras minúsculas indicam se os valores são iguais ou distintos estatisticamente em cada item avaliado; se  $F_{calc} > F_{5\%}$ , então pode-se concluir que as médias dos tratamentos diferentes entre si a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ). Se  $F_{calc} < F_{tab}$ ; não há diferença significativa a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias dos tratamentos.

**Tabela 11:** Teste de Tukey para produtividade (Qp) em 60 horas.

	UFMG- HMD 19.1	UFMG- HMD 8.2	YFGJ 79F-b	UFMG- XMD 23.1	YP-5.1b	UFMG- XMD 8.1	UFMG- HMD 8.3
Repetições	1	2	3	4	5	6	7
1	0,493	0,434	0,357	0,003	0,362	0,367	0,385
2	0,487	0,433	0,366	0,002	0,372	0,363	0,376
3	0,48	0,437	0,366	0,003	0,34	0,378	0,378
SOMA	1,460	1,304	1,089	0,008	1,074	1,108	1,139
MÉDIA	0,487	0,435	0,363	0,003	0,358	0,369	0,377

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	6	0,442577	0,073763	1215,87	2,847726
Resíduo	14	0,000849	6,07E-05		
Total	20	0,443426			

Lev	1	2	7	6	3	5			
HMD 19.1	1	0,487					a		
HMD 8.2	2	0,435	0,052				b		
HMD 8.3	7	0,377	0,110	0,058			c		
XMD 8.1	6	0,369	0,117	0,065	0,008		c		
YFGJ-79F-b	3	0,363	0,124	0,072	0,014	0,006	c		
YP-5.1b	5	0,358	0,129	0,077	0,019	0,011	0,005	c	
XMD 23.1	4	0,003	0,484	0,432	0,374	0,367	0,360	0,355	d

Como  $F_{calc} > F_{5\%}$ , podemos concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

4,83 DMS Tukey 0,02172

**Tabela 12:** Teste de Tukey de conversão de xilose em xilitol (Yp/s) em 60 horas.

	UFMG- HMD 19.1	UFMG- HMD 8.2	YFGJ 79F-b	UFMG- XMD 23.1	YP-5.1b	UFMG- XMD 8.1	UFMG- HMD 8.3
Repetições	1	2	3	4	5	6	7
1	0,631	0,574	0,612	0,015	0,635	0,688	0,766
2	0,627	0,561	0,611	0,012	0,59	0,706	0,714
3	0,615	0,57	0,648	0,011	0,589	0,728	0,674
SOMA	1,873	1,705	1,871	0,038	1,814	2,122	2,154
MÉDIA	0,6243	0,5683	0,6236	0,0126	0,6046	0,7073	0,718

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	6	1,06791	0,177985	329,4276	2,847726
Resíduo	14	0,007564	0,00054		
Total	20	1,075474			

Lev		7	6	1	3	5	2		
HMD 8.3	7	0,718						a	
XMD 8.1	6	0,707	0,011					a	
HMD 19.1	1	0,624	0,094	0,083				b	
YFGJ-79F-b	3	0,624	0,094	0,084	0,001			b	
YP-5.1b	5	0,605	0,113	0,103	0,020	0,019		b	
HMD 8.2	2	0,568	0,150	0,139	0,056	0,055	0,036	b	
XMD 23.1	4	0,013	0,705	0,695	0,612	0,611	0,592	0,556	c

Como  $F_{calc} > F_{5\%}$ , podemos concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

4,83 DMS Tukey 0,06482

**Tabela 13:** Teste de Tukey para concentração de xilitol (gl-1) em 60 horas.

	UFMG- HMD 19.1	UFMG- HMD 8.2	YFGJ 79F-b	UFMG- XMD 23.1	YP-5.1b	UFMG- XMD 8.1	UFMG- HMD 8.3
Repetições	1	2	3	4	5	6	7
1	29,56	26,02	21,4	0,2	21,72	22	23,08
2	29,24	25,98	21,94	0,14	22,32	21,8	22,58
3	28,8	26,24	21,96	0,18	20,38	22,7	22,66
SOMA	87,6	78,24	65,3	0,52	64,42	66,5	68,32
MÉDIA	29,2	26,08	21,7666	0,1733	21,4733	22,1666	22,7733

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	6	1591,485	265,2474	1198,613	2,847726
Resíduo	14	3,098133	0,221295		
Total	20	1594,583			

Lev	1	2	7	6	3	5			
HMD 19.1	1	29,200					a		
HMD 8.2	2	26,080	3,120				b		
HMD 8.3	7	22,773	6,427	3,307			c		
XMD 8.1	6	22,167	7,033	3,913	0,607		c		
YFGJ 79F-b	3	21,767	7,433	4,313	1,007	0,400	c		
YP-5.1b	5	21,473	7,727	4,607	1,300	0,693	0,293	c	
XMD 23.1	4	0,173	29,027	25,907	22,600	21,993	21,593	21,300	d

Como  $F_{calc} > F_{5\%}$ , podemos concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

4,83 DMS Tukey 1,31181

**Tabela 14:** Teste de Tukey para produtividade (Qp) em 72 horas.

	UFMG- HMD 19.1	UFMG- HMD 8.2	YFGJ 79F-b	UFMG- XMD 23.1	YP- 5.1b	UFMG- XMD 8.1	UFMG- HMD 8.3
Repetições	1	2	3	4	5	6	7
1	0,349	0,312	0,3	0,005	0,346	0,363	0,333
2	0,332	0,314	0,293	0,006	0,366	0,356	0,331
3	0,381	0,326	0,266	0,003	0,363	0,374	0,326
SOMA	1,062	0,952	0,859	0,014	1,075	1,093	0,99
MÉDIA	0,354	0,3173	0,2863	0,0046	0,3583	0,3643	0,33

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	6	0,294103	0,049017	282,947	2,847726
Resíduo	14	0,002425	0,000173		
Total	20	0,296529			

Lev	6	5	1	7	2	3			
XMD 8.1	6	0,364					a		
YP-5.1b	5	0,358	0,006				a		
HMD 19.1	1	0,354	0,010	0,004			a		
HMD 8.3	7	0,330	0,034	0,028	0,024		a,b		
HMD 8.2	2	0,317	0,047	0,041	0,037	0,013	b,c		
YFGJ 79F-b	3	0,286	0,078	0,072	0,068	0,044	0,031	c	
XMD 23.1	4	0,005	0,360	0,354	0,349	0,325	0,313	0,282	d

Como  $F_{calc} > F_{5\%}$ , podemos concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

4,83 DMS Tukey 0,0367

**Tabela 15:** Teste de Tukey para conversão de xilose em xilitol (Yp/s) em 72 horas.

	UFMG- HMD 19.1	UFMG- HMD 8.2	YFGJ 79F-b	UFMG- XMD 23.1	YP-5.1b	UFMG- XMD 8.1	UFMG- HMD 8.3
Repetições	1	2	3	4	5	6	7
1	0,536	0,491	0,597	0,028	0,607	0,7	0,652
2	0,512	0,486	0,543	0,032	0,64	0,704	0,647
3	0,588	0,503	0,503	0,017	0,638	0,717	0,618
SOMA	1,636	1,48	1,643	0,077	1,885	2,121	1,917
MÉDIA	0,5453	0,4933	0,5476	0,0256	0,6283	0,707	0,639

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	6	0,920815	0,153469	232,0436	2,847726
Resíduo	14	0,009259	0,000661		
Total	20	0,930075			

Lev		6	7	5	3	1	2	
XMD 8.1	6	0,707						a
HMD 8.3	7	0,639	0,068					a,b
YP-5.1b	5	0,628	0,079	0,011				b
YFGJ 79F-b	3	0,548	0,159	0,091	0,083			c
HMD 19.1	1	0,545	0,162	0,094	0,083	0,002		c
HMD 8.2	2	0,493	0,214	0,146	0,135	0,054	0,052	c
XMD 23.1	4	0,026	0,681	0,613	0,603	0,522	0,520	0,468 d

Como  $F_{calc} > F_{5\%}$ , podemos concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

4,83 DMS Tukey 0,07172



**Tabela 16:** Teste de Tukey para concentração de xilitol (gl-1) em 72 horas.

	UFMG- HMD 19.1	UFMG- HMD 8.2	YFGJ 79F-b	UFMG- XMD 23.1	YP-5.1b	UFMG- XMD 8.1	UFMG- HMD 8.3
Repetições	1	2	3	4	5	6	7
1	25,12	22,44	21,62	0,38	24,92	26,14	23,98
2	23,9	22,64	21,08	0,42	26,34	25,62	23,86
3	27,46	23,46	19,14	0,24	26,12	26,92	23,48
SOMA	76,48	68,54	61,84	1,04	77,38	78,68	71,32
MÉDIA	25,4933	22,8466	20,6133	0,3466	25,7933	26,2266	23,7733

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	6	1523,328	253,888	279,6417	2,847726
Resíduo	14	12,71067	0,907905		
Total	20	1536,039			

Lev		6	5	1	7	2	3		
XMD 8.1	6	26,227						a	
YP-5.1b	5	25,793	0,433					a	
HMD 19.1	1	25,493	0,733	0,300				a	
HMD 8.3	7	23,773	2,453	2,020	1,720			a,b	
HMD 8.2	2	22,847	3,380	2,947	2,647	0,927		b,c	
YFGJ 79F-b	3	20,613	5,613	5,180	4,880	3,160	2,233	c	
XMD 23.1	4	0,347	25,880	25,447	25,147	23,427	22,500	20,613	d

Como  $F_{calc} > F_{5\%}$ , podemos concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

4,83 DMS Tukey 2,65709

**Tabela 17:** Teste de Tukey para produtividade (Qp) em 144 horas a partir de cultivo em hidrolisado hemicelulósico.

REPETIÇÕES	UFMG-HMD 19.1	UFMG-HMD 8.2	YFGJ 79F-b
1	0,081	0,108	0,084
2	0,078	0,103	0,077
soma	0,159	0,211	0,161
média	0,080	0,106	0,081

	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	2	0,00086	0,00043	32,07478	9,552094
Resíduo	3	4,02E-05	1,34E-05		
Total	5	0,0009			

lev			3	1	
HMD 8.2	2	0,106			a
YFGJ 79F-b	3	0,081	<b>0,025</b>		b
HMD 19.1	1	0,080	<b>0,026</b>	0,001	b

Como  $F_{calc} > F_{5\%}$ , podemos concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

5,91 DMS Tukey 0,015298

**Tabela 18:** Teste de Tukey para conversão de xilose em xilitol (Yp/s) em 144 horas a partir de cultivo em hidrolisado hemicelulósico.

REPETIÇÕES	UFMG-HMD 19.1	UFMG-HMD 8.2	YFGJ 79F-b
1	0,406	0,638	0,618
2	0,371	0,578	0,555
soma	0,777	1,216	1,173
média	0,388	0,608	0,587

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	2	0,058676	0,029338	20,0803	9,552094
Resíduo	3	0,004383	0,001461		
Total	5	0,063059			

lev			2	1	
HMD 8.2	2	0,608			a
YFGJ 79F-b	3	0,587	0,022		a
HMD 19.1	1	0,388	<b>0,220</b>	<b>0,198</b>	b

Como  $F_{calc} > F_{5\%}$ , podemos concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

5,91 DMS Tukey 0,159736

**Tabela 19:** Teste de Tukey para concentração de xilitol (gl-1) em 144 horas a partir de cultivo em hidrolisado hemicelulósico.

REPETIÇÕES	UFMG-HMD 19.1	UFMG-HMD 8.2	YFGJ 79F-b
1	11,670	15,560	12,060
2	11,300	14,870	11,060
soma	22,970	30,430	23,120
média	11,485	15,215	11,560

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	2	18,18503	9,092517	33,82213	9,552094
Resíduo	3	0,8065	0,268833		
Total	5	18,99153			

Lev		2	3	
HMD 8.2	2	15,215		a
YFGJ 79F-b	3	11,560	<b>3,655</b>	b
HMD 19.1	1	11,485	<b>3,730</b>	b

Como  $F_{calc} > F_{5\%}$ , podemos concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

5,91 DMS Tukey 2,166776

## Anexo 4

**Tabela 20:** Dados de cultivo dos isolados de *Cyberlindnera* spp. para o tempo de 48 horas utilizando hidrolisado hemicelulósico.

	<b>Produção de xilitol (g<math>L^{-1}</math>)</b>	<b>Yp/s (gg<math>^{-1}</math>)</b>	<b>Qp (g<math>L^{-1}h^{-1}</math>)</b>	<b>Eficiência (%)</b>
<b>UFMG-HMD 19.1</b>	4,93	0,50	0,10	55,11
<b>UFMG-HMD 8.2</b>	5,54	0,78	0,11	85,13
<b>YFGJ 79F-b</b>	3,13	0,32	0,06	34,91
<b>YP-5.1b</b>	3,19	0,54	0,07	58,72

**Tabela 21:** Dados de cultivo dos isolados de *Cyberlindnera* spp. para o tempo de 72 horas utilizando hidrolisado hemicelulósico.

	<b>Produção de xilitol (g<math>L^{-1}</math>)</b>	<b>Yp/s (gg<math>^{-1}</math>)</b>	<b>Qp (g<math>L^{-1}h^{-1}</math>)</b>	<b>Eficiência (%)</b>
<b>UFMG-HMD 19.1</b>	8,14	0,42	0,11	45,76
<b>UFMG-HMD 8.2</b>	8,88	0,61	0,12	66,55
<b>YFGJ 79F-b</b>	5,36	0,36	0,07	39,97
<b>YP-5.1b</b>	3,48	0,29	0,05	31,11

**Tabela 22:** Dados de cultivo dos isolados de *Cyberlindnera* spp. para o tempo de 120 horas utilizando hidrolisado hemicelulósico.

	<b>Produção de xilitol (gL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Yp/s (gg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Qp (gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Eficiência (%)</b>
<b>UFMG-HMD 19.1</b>	11,29	0,42	0,09	46,15
<b>UFMG-HMD 8.2</b>	12,62	0,54	0,10	59,04
<b>YFGJ 79F-b</b>	8,91	0,49	0,07	53,60
<b>YP-5.1b</b>	4,07	0,32	0,03	35,00

