



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

RENAN ANDERSON ALVES DE FREITAS

***MEYEROZYMA CARIBBICA ISOLADA DE SOLOS DE PLANTAÇÃO DE CANA-  
DE-AÇÚCAR: CAPACIDADE DE ASSIMILAR NITRATO E POTENCIAL  
FERMENTATIVO***

Recife

2021

RENAN ANDERSON ALVES DE FREITAS

***MEYEROZYMA CARIBBICA ISOLADA DE SOLOS DE PLANTAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR: CAPACIDADE DE ASSIMILAR NITRATO E POTENCIAL FERMENTATIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

**Área de concentração:** Biotecnologia

**Orientador:** Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior

**Coorientador:** Dr. Rafael Barros de Souza

Recife

2021

Catalogação na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Freitas, Renan Anderson Alves de

*Meyerozyma caribbica* isolada de solos de plantação de cana-de-açúcar: capacidade de assimilar nitrato e potencial fermentativo / Renan Anderson Alves de Freitas - 2021.

64 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antônio de Moraes Júnior

Coorientador: Rafael Barros de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife, 2021.

Inclui referências e anexo.

1. *Meyerozyma caribbica* 2. Nitrato 3. Fermentação alcoólica

I. Moraes Júnior, Marcos Antônio de (Orientador) II. Souza, Rafael Barros de (Coorientador) III. Título

579.5 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-116

RENAN ANDERSON ALVES DE FREITAS

***MEYEROZYMA CARIBBICA ISOLADA DE SOLOS DE PLANTAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR: CAPACIDADE DE ASSIMILAR NITRATO E POTENCIAL FERMENTATIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 26/02/2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Dra. Cristina Maria de Souza Motta  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Dra. Carolina Elsztein  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

## RESUMO

As leveduras etanogênicas são candidatas naturais para o aumento da produção de etanol e subprodutos de interesse industrial. A *Meyerozyma caribbica* é uma das principais espécies de leveduras pertencente ao complexo *Meyerozyma guilliermondii* que, embora se conheça alguma das propriedades e aplicações biotecnológicas, ainda são poucos os estudos acerca da sua fisiologia. Nesse contexto, o presente estudo se propôs a caracterizar os parâmetros de fermentação da *M. caribbica* assimiladora de nitrato em diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Para isso, Além das análises moleculares de identificação, avaliamos a capacidade dos isolados de *M. caribbica* em crescerem em meio de cultura contento nitrato como fonte de nitrogênio; a tolerância e o crescimento em meios de cultura com baixos e variáveis pH; e os parâmetros de fermentação em meio com diferentes concentrações de fontes de carbono (glicose e/ou xilose) e fontes de nitrogênio (sulfato de amônio e/ou nitrato de sódio). Os resultados mostram que a maior produção de etanol foi observada em meios contendo sulfato de amônio e glicose 16,19 g/L em 72 horas de fermentação. A xilose não foi consumida em ambos os ensaios de fermentação como única fonte de carbono, e que a produção de etanol só foi observada quando a glicose estava presente nos meios de fermentação. E os experimentos contendo sulfato de amônio apresentaram maior produtividade e rendimento do etanol. Por conseguinte, caracterizamos esse estudo como uma etapa importante para a melhor compreensão acerca da fisiologia da *M. caribbica*.

**Palavras-chave:** *Meyerozyma caribbica*. Assimilação de nitrato. Fermentação alcoólica.

## ABSTRACT

Ethanologenic yeasts are natural candidates for increased ethanol production and by-products of industrial interest. *Meyerozyma caribbica* is one of the main yeast species belonging to the *Meyerozyma guilliermondii* complex, which, although some of the biotechnological properties and applications are known, there are still few studies on its physiology. In this context, the present study aimed to characterize the fermentation parameters of *M. caribbica* nitrate assimilator in different carbon and nitrogen sources. For this, besides the molecular identification analyses, the ability of *M. caribbica* isolates to grow in nitrate content culture medium as nitrogen source was evaluated; tolerance and growth in culture media with low and variable pH; and fermentation parameters in medium with different concentrations of carbon sources (glucose and/or xylose) and nitrogen sources (ammonium sulfate and/or sodium nitrate). The results showed that the highest ethanol production was observed in media containing ammonium sulfate and glucose 16.19 g/L in 72 hours of fermentation. Xylose was not consumed in both fermentation assays as the only carbon source, and that ethanol production was only observed when glucose was present in fermentation media. Finally, the experiments containing ammonium sulfate showed higher productivity and ethanol yield. Therefore, this study showed to be an important step for better compression about the physiology of *M. caribbica*.

**Keywords:** *Meyerozyma caribbica*. Nitrate assimilation. Alcoholic fermentation.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores prof. Marcos Morais e Rafael Barros pela oportunidade, paciência e todos os conhecimentos transmitidos durante o mestrado muito obrigado!

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro durante esses dois anos de trabalho.

Aos colegas de Mestrado e Laboratório de Genética de Micro-organismos pela convivência, disponibilidade e suporte.

Aos meus amigos do mestrado para a vida, Ana Patrícia, Isaias, Giselle, Layanne, Maiara e Virton.

A minha avó Isaura, a Madrinha de Carli, a minha mãe e minha tia Josy por todo o apoio e incentivo para a realização dos meus sonhos.

Agradeço, desde já, aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite de contribuir com a melhoria deste trabalho.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema simplificado da fermentação alcoólica.....	18
Figura 2 -	Via metabólica de fermentação de xilose.....	19
Figura 3 -	Fluxograma representativo do processo de fermentação para produção de etanol.....	21
Tabela 1 -	Composição química média da vinhaça oriunda de diferentes mostos.....	23
Figura 4 -	Metabolismo Central do Nitrogênio.....	25
Figura 5 -	Via de assimilação do nitrato em leveduras.....	27
Figura 6 -	Células do isolado RAC <i>Meyerozyma caribbica</i> em meio YPD (microscopia de contraste de fase).....	29
Tabela 2 -	Identificação dos isolados procedentes das amostras dos solos e a porcentagem de similaridade.....	36
Figura 7 -	Filograma obtido por inferência bayesiana a partir de análise de sequências dos domínios D1/D2 do rDNA demonstrando o posicionamento dos isolados de <i>Meyerozyma caribbica</i> .....	39
Tabela 3 -	Perfil fisiológico comparativo de assimilação dos isolados de <i>Meyerozyma caribbica</i> em diferentes fontes de carbono e nitrogênio.....	40
Tabela 4 -	Perfil de tolerância ao estresse ácido dos isolados de <i>Meyerozyma caribbica</i> em comparação a cepas de linhagem JP1 e GDB 248...	43
Tabela 5 -	Perfil fisiológico comparativo de fermentação dos isolados de <i>Meyerozyma caribbica</i> em diferentes fontes de carbono.....	44
Tabela 6 -	Parâmetros fermentativos da cepa RAC de <i>Meyerozyma caribbica</i> em diferentes açúcares e utilizando o nitrato como fonte de nitrogênio.....	45
Tabela 7 -	Parâmetros fermentativos da cepa RAC de <i>Meyerozyma caribbica</i> em diferentes açúcares e utilizando o amônio como fonte de nitrogênio.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Carbono
N	Nitrogênio
$\mu\text{g}$	Micrograma
mg	Miligramma
kg	Quilograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
ATP	Adenosina trifosfato
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
mM	Milimolar
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Íon nitrato
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Íon nitrito
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Íon amônio
cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
g	Gramas
L	Litro
Rpm	Rotações por minuto
$\mu\text{m}$	Micrometro
$\mu\text{L}$	Microlitro
UV	Ultravioleta
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
ITS	Internal transcript Spacer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1	OBJETIVOS.....	13
1.1.1	Objetivo Geral.....	13
1.1.2	Objetivos Específicos.....	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
2.1	MICROBIOLOGIA DO SOLO .....	14
2.2	LEVEDURAS.....	15
2.3	FERMENTAÇÃO.....	16
2.3.1	Bioquímica do processo da fermentação alcoólica.....	17
	Fermentação alcoólica para produção de etanol	
2.3.2	combustível.....	20
2.4	VINHAÇA.....	21
2.5	METABOLISMO DO NITROGÊNIO .....	24
2.5.1	Fontes de nitrogênio.....	26
2.5.2	Fisiologia da assimilação do nitrato .....	27
2.6	A LEVEDURA <i>MEYEROZYMA CARIBBICA</i> .....	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1	ÁREAS DE COLETA.....	30
3.2	ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS DOS SOLOS.....	30
3.3	IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS	31
3.3.1	Extração do DNA das leveduras	31
3.3.2	Amplificação de fragmentos do DNA e sequenciamento	32
3.3.3	Análises filogenéticas.....	33
3.4	TESTES DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO EM MEIO SÓLIDO.....	33
3.5	TESTE DE TOLERÂNCIA E CRESCIMENTO EM MEIOS DE CULTURA LÍQUIDOS E SÓLIDOS COM BAIXO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO.....	34
3.6	ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO.....	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
4.1	ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	36

4.2	ANÁLISE DO TESTE DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO.....	40
4.3	ANÁLISE DO TESTE DE TOLERÂNCIA E CRESCIMENTO DOS ISOLADOS DE <i>MEYEROZYMA CARIBBICA</i> EM MEIOS DE CULTURA COM BAIXO PH.....	42
4.4	ANÁLISES DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO.....	44
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>
	<b>ANEXO A – Relatório obtido no site <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> para a sequência de nucleotídeos da região dos domínios D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal dos isolados.....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As leveduras são micro-organismos que podem ser encontradas em diferentes habitats conforme as suas especificidades, porém, no solo o seu principal papel está ligado a ciclagem de nutrientes como carbono e nitrogênio (MONTEIRO MOREIRA E MARTINS DO VALE, 2020). Dependendo das técnicas de manejo agrícola empregadas no solo, as leveduras podem sofrer pressão seletiva em virtude das alterações ecológicas ocorridas nessas áreas (SANTA CRUZ et al., 2013; SULEIMAN et al., 2016).

A utilização da vinhaça na prática da fertirrigação de plantações de cana-de-açúcar é uma atividade agrícola bastante comum que visa uma maior economia e produtividade para as indústrias sucroalcooleiras (BASSO et al., 2013; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2017). Entretanto, devido às características físico-químicas da vinhaça a sua utilização com fertilizante pode ocasionar mudanças na população microbiana do solo, e propiciar uma possível tolerância desses organismos ao meio (LOURENÇO et al., 2018).

O nitrato é uma fonte de nitrogênio pouco assimilada pelas leveduras devido ao alto gasto energético necessário para metabolizá-lo (DE BARROS PITA et al., 2013). Deste modo, a presença do nitrato no meio de fermentação pode gerar vantagens adaptativas a algumas leveduras perante outras que não assimilam o nitrato (DE BARROS PITA et al., 2011). A levedura *Dekkera bruxellensis* tem sido descrita como a principal contaminante do processo de fermentação em destilarias do nordeste brasileiro, e uma entre as principais razões está relacionada à habilidade de utilizar o nitrato como fonte de nitrogênio (DE SOUZA LIBERAL et al., 2007; DA SILVA et al., 2016).

A priori, o objetivo proposto era investigar a ecologia da *D. bruxellensis* fora do ambiente industrial, analisando a dinâmica populacional das leveduras assimiladoras de nitrato em plantios de cana-de-açúcar irrigados com vinhaça. Com a hipótese de que os solos dos plantios de cana-de-açúcar irrigados com vinhaça seriam os reservatórios ecológicos da *D. bruxellensis*, e que essas seriam levadas para dentro das destilarias por meio da cana-de-açúcar, produzindo um ciclo de retroalimentação campo-indústria durante a safra. Contudo, não obtivemos êxito em isolrar a *D. bruxellensis*, mas outras leveduras foram isoladas, dentre as quais a

*Meyerozyma caribbica*, até então tida como uma levedura que não apresenta a capacidade de assimilar nitrato como fonte de nitrogênio (<http://www.cbs.knaw.nl/>).

A *Meyerozyma caribbica* é uma das espécies de leveduras que pertence ao complexo *Meyerozyma guilliermondii* (VAUGHAN-MARTINI et al., 2005) que, embora haja relatos do seu isolamento em alguns substratos na natureza e em meios de fermentação, no entanto, poucos estudos foram realizados até o momento acerca do seu metabolismo fermentativo (SUKPIPAT et al., 2017; TRICHEZ et al., 2019). Portanto, este trabalho se propôs a caracterizar e determinar a fisiologia da *M. caribbica* assimiladora de nitrato e, subsequentemente, avaliar os parâmetros de fermentação dessa levedura em diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Geral

- Caracterizar fisiologicamente os parâmetros fermentativos de leveduras assimiladoras de nitrato isoladas de solos de plantios de cana-de-açúcar.

### 1.1.2 Específicos

- Isolar e identificar leveduras assimiladoras de nitrato em amostras de solos fertirrigados ou não com vinhaça em plantações de cana-de-açúcar;
- Selecionar dentre os isolados espécimes de leveduras que possam ser promissores para a indústria da fermentação alcoólica;
- Verificar a capacidade de crescimento dos isolados em meios contendo nitrato de sódio.
- Verificar a tolerância e o crescimento dos isolados submetidos a meios de cultura com baixo pH.
- Avaliar os parâmetros de fermentação em diferentes concentrações de fontes de carbono (glicose e/ou xilose) e fontes de nitrogênio (sulfato de amônio e/ou nitrato de sódio).
- Enriquecer as bases de dados genéticos de leveduras assimiladoras de nitrato.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 MICROBIOLOGIA DO SOLO

Os micro-organismos presentes no solo agem principalmente nos processos de decomposição da matéria orgânica, contribuindo assim, no ciclo biogeoquímico dos nutrientes (BALOTA et al., 1998). Devido à diversidade e complexidade microbiana do solo, presume-se que há uma grande variedade de micro-organismos ainda desconhecidos, tendo em vista que um grama de solo pode abrigar mais de 10 bilhões de micro-organismos, com menos de 1% cultivados e caracterizados (TORSVIK E OVREAS, 2002). A biomassa microbiana é a parte viva da matéria orgânica do solo, e um dos principais indicadores microbiológicos da sua qualidade (FERREIRA et al. 2007). Constituída por bactérias, actinobactérias, fungos, algas e protozoários. A biomassa microbiana é considerada o compartimento central do ciclo do carbono, em razão dos seus valores indicarem teores de carbono no solo, decorrentes do processo de humificação ou manejo do solo (DIONÍSIO E PIMENTEL, 2016).

A biomassa microbiana do solo equivale entre 2% a 5% do carbono (C) orgânico (expresso em µg de C/g ou mg de C/Kg de solo seco) e a 1% a 5% do nitrogênio (N) total. A sua principal função está ligada a ciclagem dos nutrientes do solo, pois atuam nos processos que controlam a decomposição e o acúmulo da matéria orgânica do solo, além das transformações que envolvem os nutrientes minerais (REIS JUNIOR E MENDES, 2007). No entanto, quantificar apenas a biomassa não irá fornecer dados precisos sobre os níveis de atividade microbiana, sendo também necessária a avaliação de outros parâmetros que presumam essa atividade, como a atividade enzimática e a respiração microbiana para que seja possível verificar em que estado metabólico o solo se encontra (FERREIRA et al., 2017).

A atividade dos fungos no solo está ligada ao teor e a qualidade da matéria orgânica presente no mesmo que, consequentemente, irá determinar a ocorrência e disposição desses micro-organismos no meio. Conhecer a microbiota do solo, não é apenas importante para o levantamento de dados taxonômicos que lá se encontram, mas também é importante para o processo de bioprospecção que visa o

descobrimento e a utilização de metabólitos gerados por esses organismos em aplicações biotecnológicas (RUEGGER E TAUK-TORNISIELO, 2004).

## 2.2 LEVEDURAS

As leveduras são seres eucariontes, unicelulares, heterotróficos que estão inseridas em dois filos: *Ascomycota* e *Basidiomycota*. A reprodução das leveduras ocorre de modo sexuado pela formação de esporos e assexuado por brotamento ou fissão. Devido a sua alta complexidade morfológica, alguns grupos de fungos - dependendo principalmente das condições ambientais ao qual está inserido - podem apresentar diferentes estágios celulares transicionais em seu ciclo evolutivo, como a formação de hifas ou pseudo-hifas, e outros permanecem apenas como levedura (ALEXOPOULOS, 1996; CASANOVA NAVARRO, 2018). Por serem células simples, o tempo de crescimento e reprodução das leveduras costumam ser mais rápido do que a maioria dos fungos filamentosos (JENSEN et al., 2013).

Em relação ao perfil assimilativo de fontes de carbono, a maioria das espécies do filo *Basidiomycota* possui um perfil assimilativo mais amplo comparado aos do filo *Ascomycota* por serem encontradas abundantemente em diversos substratos que possuem constituintes mais complexos como o solo (KURTZMAN E ROBNETT, 1998). Já as leveduras do filo *Ascomycota* podem ser encontradas com mais frequência em substratos que dispõem de altas concentrações de açúcares, como as frutas (COSTA, 2006).

Na natureza, quase todas as leveduras ou grupos de espécies têm habitats altamente especializados. Desse modo, os tipos de substratos, a composição química dos substratos e a competição entre espécies de leveduras ou com outros micro-organismos são fatores responsáveis pela seletividade em ambientes favoráveis (PHAFF, 1987). As leveduras podem ser encontradas em associação com plantas, frutas, solos, animais, águas, insetos e principalmente em substratos que contêm açúcares, as quais são capazes de realizar a fermentação (HAMBY et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016).

Em virtude do seu potencial biotecnológico, as leveduras são micro-organismos bastante utilizados na indústria de alimentos, bebidas e na produção de biocombustível. Estas apresentam um relevante papel para a indústria farmacêutica na produção de hormônios, vacinas e probióticos; na indústria química para a

produção de pigmentos carotenoides, enzimas, acidulantes e ácidos orgânicos; e nos processos de biorremediação e bioindicadores da qualidade da água e do ambiente (ALMEIDA, 2011; LOUREIRO et al., 2011).

## 2.3 FERMENTAÇÃO

No final do século XIX, Pasteur, reconheceu a importância das leveduras no processo de fermentação, e Hermann Müller e Emil Christian Hansen obtiveram as primeiras culturas puras de leveduras fermentadoras de vinho e cerveja (BARNETT, 2003; BERNARDI E WENDLAND, 2020). Desde então, tornaram-se uma das classes de fungos mais importantes no meio industrial, não apenas para a indústria de bebidas, mas também para uma vasta variedade de produtos oriundos de processos fermentativos (DEAK, 2006).

As leveduras possuem necessidades nutricionais relativamente simples, uma fonte de carbono e nitrogênio, as quais podem variar de acordo com as suas exigências para o cultivo e crescimento. A fonte de carbono mais utilizada são carboidratos, sobretudo os monossacarídeos (glicose, frutose e xilose) e dentre estas, a glicose é a preferencial para obter carbono e energia por ser facilmente metabolizada pela via glicolítica, e dependendo das condições do ambiente essa glicose pode ser convertida a etanol (FERREIRA, 2017; RIBEIRO, 2018).

Devido a sua alta eficiência fermentativa, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ainda são as mais utilizadas pela indústria do álcool por causa do seu desempenho em termos de rendimento e produtividade do etanol (AMORIM E LEÃO, 2005). O efeito *Crabtree* é uma habilidade metabólica que a *S. cerevisiae* possui de fermentar mesmo na presença de oxigênio desde que as concentrações de açúcares nos substratos sejam altas, uma importante característica metabólica do ponto de vista industrial (MARC et al., 2013). Entretanto, outros micro-organismos como a *Zymomonas mobilis*, bactéria Gram-negativa, vem despertando interesse no meio científico e industrial por apresentar diversas características desejadas em um biocatalisador ideal para produção de bebidas alcoólicas e bioetanol, como alto rendimento e resistência à elevadas concentrações de etanol; capacidade de fermentar açúcares em baixo pH; alta produtividade seletiva e específica; tolerância significativa a compostos que podem atuar como inibidores na fermentação de hidrolisado lignocelulósico para a produção de etanol (ZHANG et al., 1995; YANG et

al., 2018). Essas características são vantajosas em relação a *S. cerevisiae*, pois a *Z. mobilis* além de crescer de modo anaeróbico é capaz de tolerar altas concentrações de etanol (FRANDEN et al., 2013).

Embora a *Z. mobilis* apresente essas vantagens, a sua utilização no processo de fermentação está limitada aos açúcares (glicose, frutose e sacarose), sobretudo a sacarose, pois a metabolização desse glicídio gera subprodutos, como a levana e sorbitol, que ocasionará em uma diminuição na produção de etanol (SÁ, 2012; SILVA et al., 2015). Apesar disto, a utilização de invertases no pré-tratamento do melaço poderá diminuir na geração desses subprodutos, contudo, as invertases que são produzidas pelas leveduras, como *S. cerevisiae*, não geram esses subprodutos indesejáveis, resultando em um produto de maior qualidade e relevância industrial (GUILMAN et al., 2000).

### **2.3.1 Bioquímica do processo da fermentação alcoólica**

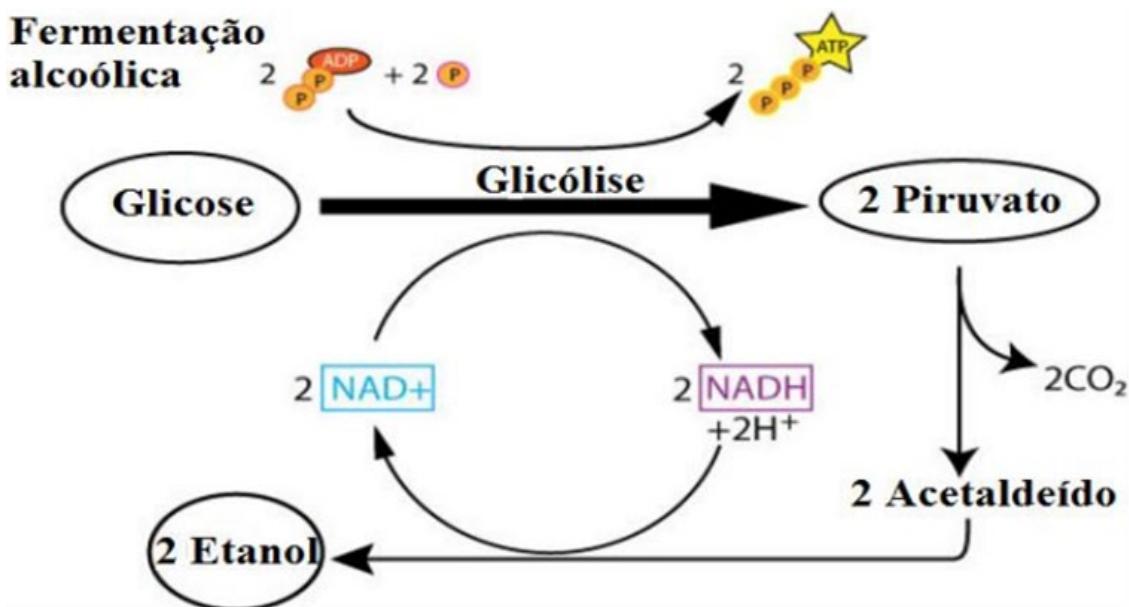
A fermentação alcoólica é um processo catabólico que ocorre principalmente em anaerobiose, na qual moléculas de açúcares (glicose) são degradadas e convertidas a etanol e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (ERNANDES E GARCIA-CRUZ, 2009). Este processo começa por meio da glicólise no qual uma molécula de glicose é quebrada em duas de ácido pirúvico ou piruvato. Nesta primeira etapa, ocorrem sucessivas reações enzimáticas com produção e liberação de energia química e térmica (ZAMORA, 2009). Durante esse processo, dá-se a oxidação parcial da glicose com produção de moléculas de ATP e liberação de hidrogênios que serão capturados pelas moléculas de  $\text{NAD}^+$  (nicotinamida adenosina dinucleotídeo) que são agentes aceptores de elétrons, resultando na formação do NADH (PAN et al., 2011).

Após a formação das duas moléculas de ácido pirúvico, mediante via fermentativa, cada molécula perde um átomo carbono (C) e dois átomos de oxigênios ( $\text{O}_2$ ) que por ligação covalente formarão uma molécula de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (FIGUEIREDO, 2016). O resultado da liberação do  $\text{CO}_2$  será o acetaldeído ou etanol, que é um dos principais compostos carbonílicos produzidos nesse processo. Em seguida, o acetaldeído irá receber um átomo de hidrogênio do NADH, e o outro hidrogênio irá advir do meio, resultando, assim, na formação do etanol (Figura 1) (NELSON E COX, 2018). A partir dessas informações é possível se

estabelecer a estequiométria do metabolismo fermentativo a partir da seguinte equação:



**Figura 1 - Esquema simplificado da fermentação alcoólica.**



Extraído de: Silva, 2017

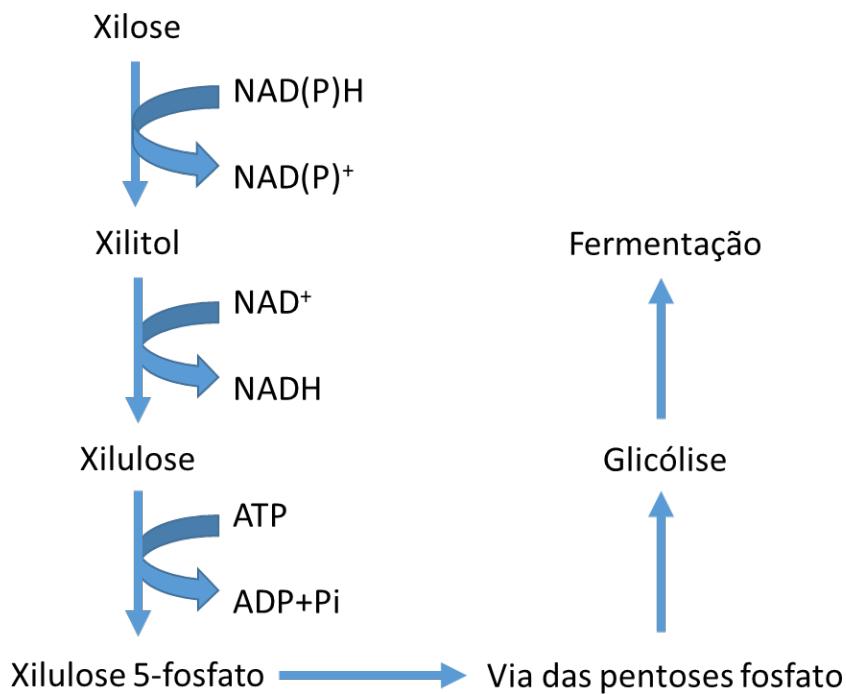
Isto significa que 180 g (equivalente a  $1 \times 180 \text{ g/mol}$ ) de glicose produzem no máximo 92 g de etanol ( $2 \times 46 \text{ g/mol}$ ) e 88 g de  $\text{CO}_2$  ( $2 \times 44 \text{ g/mol}$ ). Desta forma, o rendimento máximo teórico ( $Y$ ) é de 0,51 g (92 g/180 g) de etanol produzido para cada grama de glicose consumida e 0,49 g de  $\text{CO}_2$  (88 g /180 g) por grama de glicose consumida, que corresponde a eficiência de 100% da glicose sendo convertida a etanol e  $\text{CO}_2$  (WHEALS et al, 1999). Esses valores são raramente observados em processos industriais que trabalham com eficiências de 92 a 94% do máximo com rendimentos de 0,47 g/g (SILVA, 2017). No entanto, são valores bastante úteis para os estudos que tentam melhorar esses processos na aproximação dos rendimentos máximos.

No caso da xilose, a estequiométria é diferente pelo fato de ser um açúcar com cinco carbonos (pentose):



Neste caso, 450 g (equivalente a  $3 \times 150$  g/mol) de xilose produzem no máximo 230 g de etanol ( $5 \times 46$  g/mol) e 220 g de CO<sub>2</sub> ( $5 \times 44$  g/mol). Dessa forma, o rendimento máximo teórico (Y) é também de 0,51 g (230 g/450 g) de etanol produzido para cada grama de xilose consumida e 0,49 g de CO<sub>2</sub> (220 g/450 g) por grama de xilose consumida, ou seja, eficiência de 100% da xilose convertida a etanol e CO<sub>2</sub> (PROMPT et al., 2012). No entanto, os valores reais dessa eficiência são baixos. Isto se dá pelo fato de que a assimilação de xilose é um processo energeticamente mais complexo comparado ao da glicose, pois há um desbalanço energético causado na distribuição dos equivalentes redutores (cada molécula de xilose assimilada consome 1 mol de NAD(P)H e produz um mol de NADH) (Figura 2) (MATSUSHIKA et al., 2009). Portanto, esse desbalanço provoca uma instabilidade metabólica que acarreta quedas nos rendimentos de fermentação, e a adição de uma segunda fonte de carbono, como a glicose pode minimizar os efeitos desse desbalanço (PROMPT et al., 2012).

**Figura 2 -** Via metabólica de fermentação de xilose.



Fonte: o autor

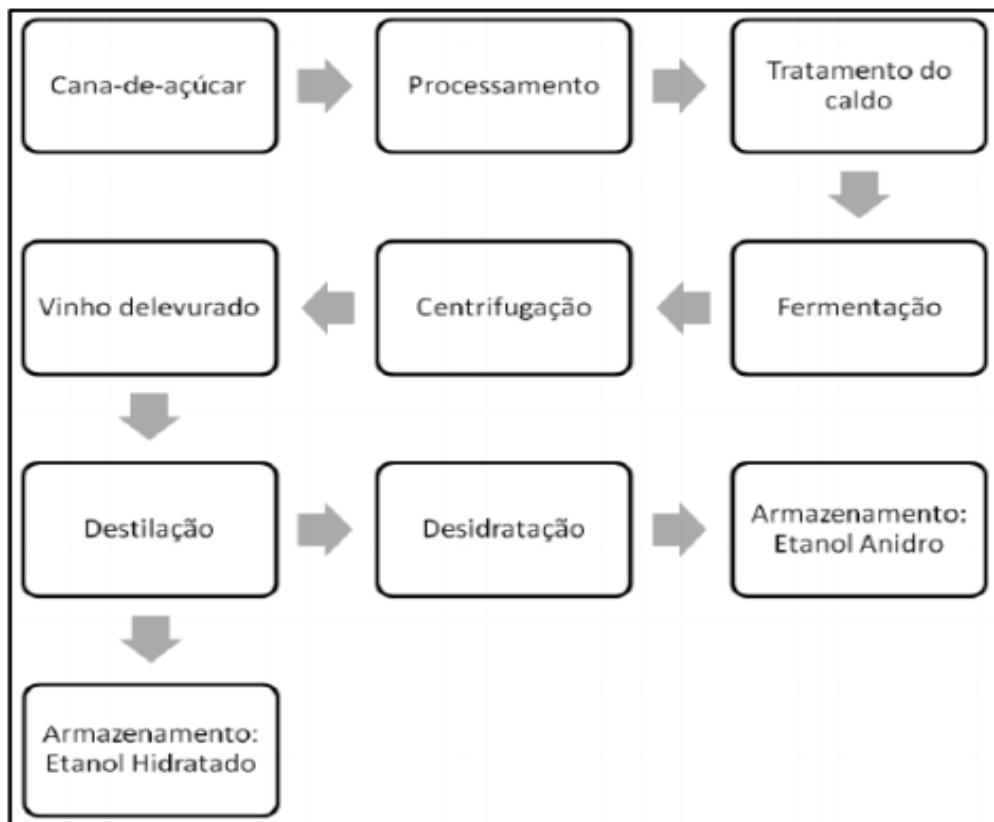
### 2.3.2 Fermentação alcoólica para produção de etanol combustível

O etanol é tido como um combustível alternativo para diminuir os problemas ambientais e energéticos no mundo (BASTOS et al., 2013). No Brasil, a cana-de-açúcar é a principal matéria-prima utilizada para produção de bioetanol devido principalmente as condições climáticas favoráveis ao seu cultivo (SILVA et al., 2011). O processo se inicia por meio da colheita e lavagem da cana-de-açúcar, seguido da moagem para a extração do caldo (JUNQUEIRA et al. 2017). A sacarose é o açúcar proveniente da cana-de-açúcar que será fermentado e convertido a etanol (ENSINAS et al., 2007). No entanto, de modo comum, os processos de fermentação no Brasil não ocorrem de forma estéril (DE SOUZA LIBERAL et al., 2005). Posto isto, o mosto de alimentação (caldo de cana-de-açúcar diluído) por ser uma fonte rica em nutrientes, em conjunto com as condições não estéreis da fermentação. Podem favorecer ao surgimento de uma contaminação microbiana à qual é indesejável para o processo fermentativo (COSTA et al., 2015).

Embora o mosto propicie o crescimento de micro-organismos desfavoráveis à fermentação (SOUSA E MONTEIRO, 2012). Estes micro-organismos podem provir principalmente do solo juntamente com a cana-de-açúcar durante a colheita. Conduto, devido a capacidade de algumas leveduras e bactérias em formar biofilmes em superfícies inanimadas (DELLIAS et al., 2018). Alguns pontos no meio interindustrial, como as esteiras, moendas, tubulações e dentro outros equipamentos podem ser pontos de contaminação (DA SILVA et al., 2016).

Ao final da fermentação, o mosto fermentado será centrifugado para separar as leveduras utilizadas no processo do vinho bruto (parte líquida que contém de 8% a 12% de álcool) (SILVA et al., 2008). As leveduras poderão ser reutilizadas em um outro ciclo de fermentação depois de passarem por um tratamento, que consiste na adição de ácido sulfúrico diluído em água até atingir um pH 2,5 (ou mais baixo, igual a 2,0) ou por meio da utilização de antibióticos para conter a contaminação bacteriana (PACHECO et al., 2010). E o vinho será destilado para que o etanol produzido no processo de fermentação seja recuperado através da destilação, com um grau de pureza que poderá ser maior ou igual a 95 % dependo da tecnologia empregada (HUANG et al., 2010). E, por último, o etanol poderá passar por um processo de desidratação no qual toda a água remanescente será eliminada tornando-o um etanol anidro ou absoluto (Figura 3) (KUMAR et al., 2010).

**Figura 3** - Fluxograma representativo do processo de fermentação para produção de etanol.



Extraído de: SILVA, 2015.

A produção de etanol é tida como um processo complexo devido principalmente as vulnerabilidades a contaminações do meio (CARDONA E SÁNCHEZ, 2007). Portanto, alguns fatores que podem afetar a produção do etanol devem ser mantidos e certificados ao longo do processo, como: o controle microbiológico, o pH, a temperatura, a pressão osmótica, a oxigenação e a concentração dos açúcares e minerais a fim de garantir a qualidade do etanol (BASSO et al., 2008; PACHECO et al., 2010).

## 2.4 VINHAÇA

A vinhaça é o principal resíduo oriundo da fermentação etanólica, comumente utilizada pela indústria sucroalcooleira brasileira como fertilizante nos plantios de

cana-de-açúcar (LAIME et al., 2011). Caracteriza-se por ser um líquido escuro, concentrado, sem oxigênio dissolvido, com pH baixo e odor desagradável, que conforme a região pode ser conhecida como vinhotto, calda de destilaria, restilo, garapão ou tiborna (FRANCISCO, 2008; BEBÉ et al., 2009).

Dependendo do processo empregado na produção de etanol podem ser gerados cerca de 10 a 12 litros de vinhaça para cada litro de etanol produzido (SANTA CRUZ et al., 2013). O destino da vinhaça nas destilarias é a irrigação das plantações de cana-de-açúcar, processo chamado de fertirrigação, depois de ser diluída com a água da lavagem da cana. Os benefícios da utilização da vinhaça no cultivo da cana-de-açúcar são indubitáveis tanto do ponto de vista agronômico quanto do econômico (SILVA et al., 2014). No entanto, a vinhaça é considerada um efluente com alto poder poluente principalmente para a fauna e flora aquática e um veículo de constante reintrodução de microrganismos da fermentação para o solo e vice-versa. (DA SILVA et al., 2007).

A composição química da vinhaça varia de acordo com os fatores ambientais, como composição da matéria prima e processos operacionais empregados pela usina de etanol (LIMA et al., 2017). Esta é composta principalmente de matéria orgânica sob a forma de ácidos orgânicos e minerais em grande quantidade como potássio, nitrato, magnésio e cálcio, sendo as altas concentrações de potássio que fazem com que a vinhaça seja bastante utilizada como fertilizante nas plantações de cana- de- açúcar (DA SILVA et al., 2016; PARSAEE et al., 2019). Na tabela 1, podemos ver os componentes químicos da vinhaça proveniente da fermentação de diferentes mostos, no qual a vinhaça derivada do melaço possui uma maior quantidade de matéria orgânica e minerais, comparada com as que são provindas do caldo de cana e do mosto misto. Em relação aos minerais, o potássio é o elemento que predomina nos tipos três mostos, subsequentemente estão cálcio, sulfato, nitrogênio, magnésio e fósforo.

De modo consequente, a presença de açúcares residuais provenientes da água de lavagem da cana - de- açúcar juntamente com composições adequadas de minerais deve propiciar ambiente favorável nas lagoas de tratamento de vinhaça que promovam a propagação de micro-organismos que vêm com a própria água de lavagem. Portanto, a sua utilização no processo de fertirrigação dos nas plantações de cana- de-açúcar pode aumentar a população e atividade microbiana nos solos

fertilrigados (DA SILVA et al., 2016). Basílio et al (2008), isolaram e identificaram 24 espécies de leveduras em diferentes destilarias de bioetanol no nordeste brasileiro que utilizam o caldo ou melaço da cana-de açúcar como matéria prima do processo de fermentação, e dentre algumas das espécies isoladas estava a *Pichia caribbica*, atualmente denominada *Meyerozyma caribbica* (VAUGHAN-MARTINI et al., 2005).

**Tabela 1** - Composição química média da vinhaça oriunda de diferentes mostos.

Elementos	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2 – 5,0	3,7 – 4,6	4,4 – 4,6
Temperatura (°C)	80 – 100	80 - 100	80 – 100
DBO (mg/L O <sub>2</sub> ) <sup>(1)</sup>	25.000	6.000- 16.500	19.800
DQO (mg/L O <sub>2</sub> ) <sup>(2)</sup>	65.000	15.000 – 33.000	45.000
Sólidos totais (mg/L)	81.500	23. 700	52.700
Sólidos voláteis (mg/L)	60.000	20.000	40.000
Sólidos fixos (mg/L)	21.500	3.700	12.700
Nitrogênio (mg/L N)	450 – 1.610	150-700	480-710
Fósforo (mg/L P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	100 – 290	10 - 210	9-200
Potássio (mg/L K <sub>2</sub> O)	3.740 – 7.830	1.200 – 2.100	3.340- 4.600
Cálcio (mg/L CaO)	450 – 5.180	130 – 1.540	1.330 – 4.570
Magnésio (mg/L MgO)	420 – 1.520	200- 490	580 – 700
Sulfato (mg/L SO <sub>4</sub> )	6.400	600 – 760	3.700 – 3.730
Carbono (mg/L C)	11. 200 – 22. 900	5.700 – 13.400	8.700 – 12.100
Relação C/N	16 – 16,27	19,7 – 21,07	16,4 – 16,43
Matéria orgânica (mg/L)	63.400	19.500	3.800
Subst. Redutora (mg/L)	9.500	7.900	8.300

<sup>(1)</sup> DBO: Demanda bioquímica de oxigênio      Fonte: PRADA et. al., 1998.

<sup>(2)</sup> DQO: Demanda química de oxigênio

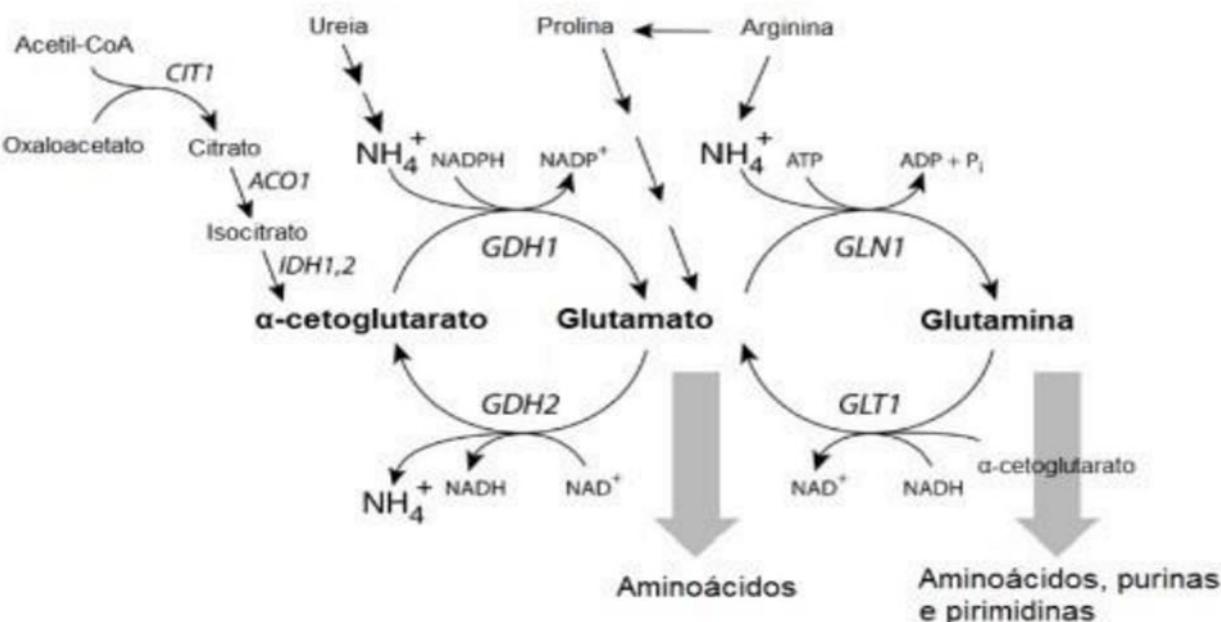
## 2.5 METABOLISMO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos elementos químicos essenciais para os organismos vivos, e as leveduras são capazes de utilizar uma variedade de compostos orgânicos como fonte de nitrogênio (SIVERIO, 2002). As leveduras beneficiam-se de uma ampla diversidade de compostos nitrogenados, como os aminoácidos, amônio, bases nitrogenadas e peptídeos, que podem estar disponíveis no meio ao qual poderá favorecer a sua vitalidade em um amplo espectro de ambientes (GODARD et al., 2007). Contudo, nem todas as fontes de nitrogênio proporcionam um crescimento celular de modo igual e eficiente (DOS SANTOS et al., 2013).

Além de poderem sintetizar intrinsecamente todas as moléculas nitrogenadas essenciais para a sua subsistência. As leveduras quando estão em boas fontes de nitrogênio possuem um crescimento relativamente maior do que as que estão em pobres fontes (TER SCHURE et al., 2000). Dentre as substâncias que são consideradas como boas fontes de nitrogênio podemos destacar a amônia, asparagina, glutamina e glutamato, pois elas induzem à altas taxas de crescimento celular (DE CRAENE et al., 2001). Entretanto, a ureia, assim como a prolina são descritas como fontes pobres de nitrogênio (DAS E BHAT, 2005).

As fontes de nitrogênio assimiladas pelas leveduras são convertidas intracelularmente em amônio para produzir em seguida o glutamato e, subsequentemente, a glutamina (MAGASANIK E KAISER, 2002). Esses dois aminoácidos exercem a função de doadores de nitrogênio para todos os outros compostos que possuem nitrogênio na célula, e em conjunto com a amônia, formam a via do metabolismo central do nitrogênio (Figura 4) (MAGASANIK, 1992). Os compostos nitrogenados adentram as células por meio de proteínas transportadoras transmembranares, as permeases, que são codificadas pelos genes *GAP1*, *MEP1* e *PUT4*; onde irão direcionar essas moléculas nitrogenadas para reações de biossíntese ou catabolismo dentro da célula para que ocorra a liberação de nitrogênio na forma de amônio e, em seguida, formar o glutamato e a glutamina (DE BARROS PITA, 2009; PEÑA MORENO, 2017).

**Figura 4 - Metabolismo Central do Nitrogênio.**



Extraído de: Peña Moreno, 2017

Nas células de *Saccharomyces cerevisiae*, a síntese do glutamato dá-se pela ação enzimática da glutamato desidrogenase dependente de NADPH (NADPH-GDH), codificada pelo gene *GDH1* (GUEIROS, 2006). A combinação do íon amônio com o alfa-cetoglutarato sob a ação da NADPH-GDH forma o glutamato (PARENTE, 2017). Em seguida, o glutamato será convertido em glutamina mediante a incorporação de outro íon amônio, por gasto de ATP, pela enzima glutamina sintetase (GS) produzida no gene *GLN1* (MINEHART E MAGASANIK, 1992; PEÑA MORENO, 2017). Dependendo das fontes de nitrogênio no meio, poderá ocorrer a utilização de outras vias de assimilação: no meio em há glutamina como única fonte de nitrogênio, a enzima glutamina desidrogenase, oriunda do gene *GLT1*, poderá fazer a conversão da glutamina em glutamato; no meio em que há glutamato como única fonte, a enzima glutamato desidrogenase, produto do gene *GDH2*, irá degradar o glutamato em alfa-cetoglutarato e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (GUEIROS, 2006). O íon amônio dessa desaminação oxidativa irá para a síntese do glutamato (PARENTE, 2017).

### 2.5.1 Fontes de nitrogênio

As leveduras são células capazes de assimilar uma ampla variedade de fontes de nitrogênio. Fontes estas, que podem ser classificadas como primárias ou preferenciais, e em secundárias ou não preferenciais, conforme as taxas de crescimento celular observadas em um meio contendo glicose (MAGASANIK E KAISER, 2002). Em tese, os meios com fontes de nitrogênio prontamente utilizáveis propiciam uma taxa de crescimento celular superior daqueles que contêm outras fontes de nitrogênio que necessitam de reações complementares para serem assimiladas (CONTERNO et al., 2006; GODARD et al., 2007).

O crescimento das leveduras pode ser limitado quanto à disponibilidade de fontes primárias de nitrogênio em ambientes onde elas possam se desenvolver, podendo ser esses naturais, artificiais e industriais (PRETORIUS, 2000; RODRIGUES et al., 2016). Deste modo, na ausência dessas fontes, elas são capazes de utilizar fontes secundárias em prol do seu crescimento celular (MAGASANIK E KAISER, 2002).

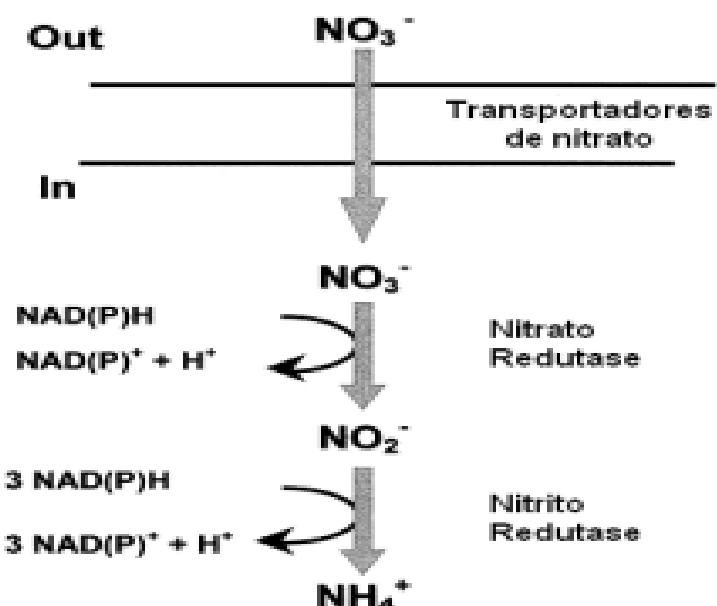
A adaptação das células em diferentes condições ambientais é possibilitada devido a um complexo sistema regulatório do metabolismo do nitrogênio desenvolvido pelas leveduras, no qual garante o uso da melhor fonte de nitrogênio disponível. Esse sistema é exercido por um mecanismo de controle transcripcional, denominado de repressão catabólica do nitrogênio, que vai atuar na repressão ou na indução de genes, dispensáveis ou indispensáveis em um determinado momento para garantir a melhor fonte de nitrogênio a ser utilizada (MINEHART E MAGASANIK, 1992; COOPER, 2002).

Quanto à utilização de fontes secundárias de nitrogênio, algumas leveduras não são capazes de assimilar determinadas fontes, por exemplo, o nitrato e/ou nitrito, sendo assim, uma assimilação restrita a poucas espécies de diferentes gêneros (SIVERIO, 2002). Dessa forma, essas fontes só serão assimiladas quando não houver a disponibilidade de fontes preferenciais no meio, fazendo com que ocorra a expressão de genes codificantes de proteínas que estão envolvidas na assimilação de fontes secundárias de nitrogênio (GEISSELER et al., 2010; DE BARROS PITA et al., 2013).

## 2.5.2 Fisiologia da assimilação do nitrato

A assimilação do nitrato em leveduras ocorre de forma semelhante a outros micro-organismos. O  $\text{NO}_3^-$  (nitrato) adentra a célula por meio de transportadores de nitrato e, no meio intracelular, o  $\text{NO}_3^-$  passa por duas reações de redução: de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  (nitrito) por intermédio da enzima nitrato redutase; e do  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_4^+$  (amônio) pela ação do nitrito redutase (Figura 5) (DE BARROS PITA, 2009).

**Figura 5 -** Via de assimilação do nitrato em leveduras.



Extraído de: Siverio, 2002.

Ávila et al (1998) deram início aos primeiros estudos moleculares da assimilação de nitrato em leveduras utilizando espécies de *Hansenula polymorpha*, por meio da clonagem do gene YNR1 que codifica a enzima nitrato redutase. No século seguinte, com os avanços da biologia molecular, foi possível obter o sequenciamento do genoma da espécie *Dekkera bruxellensis*, até então, descrita como não assimiladora de nitrato e, em virtude desse estudo, foram identificados genes que fazem parte da via de assimilação de nitrato nessa levedura (WOOLFIT et al., 2007). Por conseguinte, os estudos realizados elucidaram as funções dos genes relacionados com a assimilação do nitrato: o gene YNT1 é o responsável por

codificar as proteínas que permite a entrada do NO<sup>3-</sup> à célula; o YNR1 é o gene que codifica a enzima nitrato redutase que faz a redução do NO<sup>3-</sup> a NO<sup>2-</sup>; e o gene YNI1 codifica a enzima nitrito redutase, que reduz o NO<sup>2-</sup> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (ÁVILA et al., 1995; DE BARROS PITA, 2009). Em *H. polymorpha* e *D. bruxellensis*, leveduras capazes de assimilar nitrato, os genes que estão envolvidos nesse processo de assimilação são imprescindíveis na regulação dessa via metabólica (BOER et al., 2009; DE BARROS PITA, 2009).

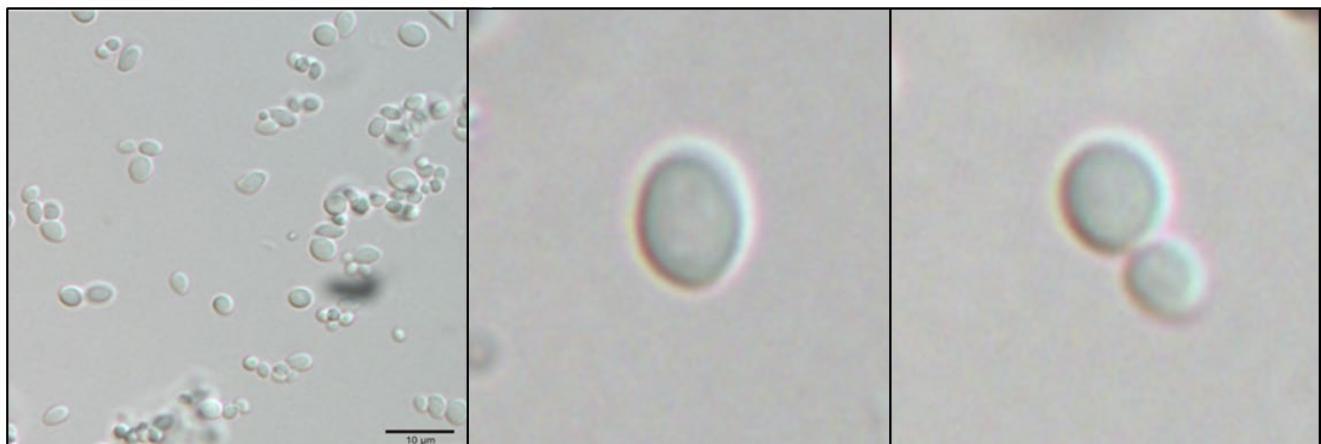
De Barros Pita et al (2011) por meio de estudos de expressão gênica e de consumo, evidenciaram que a linhagem GDB248 de *D. bruxellensis* é capaz de assimilar nitrato, e que as características do processo de assimilação corroboram com os estudos realizados com *H. polymorpha* e fungos filamentosos no que se refere ao mesmo modo de expressão dos genes envolvidos nesse processo. Portanto, devido a maioria das leveduras, a exemplo do gênero *Saccharomyces*, serem incapazes de assimilar nitrato (DE BARROS PITA, 2009). Esta pode ser uma das razões, em relação aos poucos estudos voltados a essa via de assimilação, se comparado aos fungos filamentosos (MARZLUF, 1997; WONG et al., 2008).

## 2.6 A LEVEDURA *MEYEROZYMA CARIBBICA*

*Meyerozyma caribbica* é uma das espécies de leveduras que faz parte do complexo de espécies da *Meyerozyma guilliermondii*, e está classificada como pertencente ao filo Ascomycota; classe Saccharomycetes; ordem Saccharomycetales; família Debaryomycetaceae e gênero *Meyerozyma* (VAUGHAN–MARTINI et al., 2005). Essa levedura corresponde a fase anamorfo da *Candida fermentati* isolada de vários substratos, que vão desde o solo aos artrópodes e aos pacientes hospitalizados em diferentes regiões do mundo (Figura 6) (BRANDT E LOCKHART, 2012; AMORIM et al., 2018).

Ambas as espécies, *Meyerozyma caribbica* e *Meyerozyma guilliermondii*, pertencem a um mesmo clado genético no qual apresentam características fenotípicas similares. Contudo, essas leveduras possuem distinções mínimas de nucleotídeos no domínio D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal (VAUGHAN–MARTINI et al., 2005; VILLA–CARVAJAL et al., 2006; MARTINI et al., 2016).

**Figura 6** - Células do isolado RAC *Meyerozyma caribbica* em meio YPD (microscopia de contraste de fase).



Fonte: Imagem do autor.

A utilização da *Meyerozyma caribbica* em aplicações biotecnológicas é relevante, sobretudo na produção de bebidas alcoólicas, como a cachaça, por produzirem compostos voláteis, tais como os ácidos orgânicos, os álcoois superiores e os ésteres que dão qualidades organolépticas à bebida conforme as suas concentrações (GONÇALVES et al., 2017). A utilização da *Meyerozyma caribbica* não está restrita apenas aos processos fermentativos, considerando a sua eficácia como biocontrolador do *Colletotrichum gloeosporioides* em plantações de manga e abacate (BAUTISTA-ROSALES et al., 2013; IÑIGUEZ-MORENO et al., 2020). A eficiência da *M. caribbica* em produzir etanol e outros compostos orgânicos, já foi evidenciada por Vila Nova et al (2009). Posto que os rendimentos obtidos tenham sido bem menores do que os de *S. cerevisiae*, a capacidade de fermentar torna essa levedura um micro-organismo interessante para utilização em processos fermentativos industriais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ÁREAS DE COLETA

Amostras de solos de áreas fertirrigadas e não fertirrigadas com vinhaça foram coletadas em uma fazenda com cultivo de cana-de-açúcar da Usina Japungu, localizada no município Santa Rita, Paraíba. A partir do mapa da fazenda, foram definidas as áreas de coleta com dez pontos de coleta em cada área para compor uma amostra composta. As amostras do solo foram coletadas em uma profundidade (0 a 20 cm) no mês de março de 2019 e acondicionadas em sacos plásticos estéries etiquetados com as informações da área de coleta e, em seguida, transportadas em caixa térmica sob refrigeração (entre 2° C a 8° C) para o Laboratório de Genética de Micro-organismos da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco).

#### 3.2 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS DOS SOLOS

Amostras de 50 g de cada solo foram suspensas em 250 mL de meio W-L Nutrient Medium (WLN) modificado (SILVA, 2015), em meio líquido composto por: YNB w/o (*Yeast Nitrogen Base* sem aminoácidos e sem sulfato de amônio – 1,7 g/l); glicose (20 g/L); NaNO<sub>3</sub> (Nitrito de sódio - 6,43 g/L) e uma combinação de antimicrobianos: ácido nalidíxico, ampicilina, cloranfenicol (todos na concentração de 100 µg/mL) e cicloheximida (5 mg/L) em frasco do tipo Erlenmeyer de 500 ml. O meio de líquido foi acidificado com ácido sulfúrico (50% diluído em água) para obter o pH 3,5. A solução foi esterilizada com o filtro da KASVI (modelo K18-230) contento porosidade de 0,22 µm. Os frascos com o meio de cultura e os solos foram submetidos à agitação a 160 rpm, 30 °C por 24 horas. Após esse período, foram realizadas diluições em série até 10<sup>-3</sup> do sobrenadante da suspensão em solução salina esterilizada (0,85%).

A partir de cada diluição foi transferido 0,1 mL para placas de Petri contendo W-L Nutrient Medium (WLN) com NaNO<sub>3</sub> (Nitrito de sódio - 6,43 g/L) e o inóculo foi distribuído sobre os meios com o auxílio da alça de Drigalsky. As placas em (triplicata) foram incubadas a 30 °C por até cinco dias. Após esse período, foi efetuada a seleção das colônias que cresceram sobre o meio de cultura, conforme as características morfológicas de tamanho, cor, forma e textura para leveduras. As

colônias selecionadas foram isoladas no em meio YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose, 20 g/L ágar-ágar) sólido e incubadas a 30 °C por até cinco dias para obter de colônias puras.

### 3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS ISOLADAS

#### 3.3.1 Extração do DNA das leveduras

O protocolo de extração foi adaptado de Vila Nova et al. (2009). Inicialmente, as leveduras foram transferidas para frascos do tipo Erlenmeyer de 150 mL, contendo 50 mL de meio YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose) líquido e incubadas 30° C por 16 horas a 160 rpm. Amostras de 1,0 mL de cada cultura foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas por 10 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi descartado e 600µL do tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8.0; NaCl 250mM; EDTA 25Mm; SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 10%) foi adicionado em cada microtubo e, em seguida, incubados a 65°C durante 10 minutos, homogeneizando a cada 5 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 10.000 rpm em temperatura de 4°C. Após a centrifugação, foram transferidos 500 µL do sobrenadante para microtubos novos de 1,5 mL, e a esses foram adicionados 300 µL de solução de homogeneização e 10 µL de solução de Proteinase K (PK). O material foi incubado a 56 °C durante 30 minutos e, em seguida foi adicionado 200 µL de tampão de lise. A extração e purificação do DNA das amostras foram realizadas de forma automatizada por meio do Kit “DNA IQ Casework Pro Kit for Maxwell” e do equipamento Maxwell® 16 da Promega. Nos cartuchos do Kit foram colocados 425 µL do material e, em seguida, foi colocado no equipamento para obter o DNA extraído e purificado. Ao final do processo, o DNA foi eluído em 50µL no tampão de eluição, quantificado em Nanodrop e mantido a – 20°C.

A extração do DNA do material foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA) utilizando 5 µL do DNA total extraído de cada isolado com o marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen) sob uma voltagem 75 V por 60 minutos e, em seguida, visualizados em transiluminador de luz

UV. A quantificação do DNA foi realizada por meio de espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 260 nm em aparelho Nanodrop (Thermo scientific).

### 3.3.2 Amplificação de fragmentos do DNA e sequenciamento

Para identificar os espécimes foi realizada amplificação da região ITS do DNA ribossômico, onde o *locus* ITS1-5.8s-ITS2 foi amplificado utilizando os primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAA-3') (BASÍLIO et al., 2008). A amplificação das regiões dos domínios D1/D2 do gene 26S do rDNA das leveduras foram realizadas utilizando os primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG-3') (DE SOUZA LIBERAL et. al. 2007; SILVA, 2015). As reações de PCR (Reação em cadeira da polimerase) foram realizadas em volumes finais de 25 µL contendo: MgCl<sub>2</sub> (1,25 mM), dNTPs (10 mM cada), *Taq* DNA polimerase (500 U), Tampão (1X), Primers (5 mM cada) e DNA (2 ng/µL). A PCR foi realizada em termociclagem de acordo com os seguintes parâmetros de ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos com desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 55°C durante 1 min, e extensão a 72°C durante 1min, com uma extensão final a 72°C por 5 min. A eletroforese dos fragmentos amplificados foi feita eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA) sob voltagem de 75 V por 60 minutos. Posteriormente, os produtos da PCR foram visualizados em transiluminador de luz UV, para verificação do padrão de amplificação das amostras perante aos primers testados.

Os amplicons foram purificados com uso do kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram enviadas para a plataforma de sequenciamento e Expressão Gênica do Centro de Ciências Biológicas (CB) – UFPE. Os cromatogramas foram analisados utilizando o programa BioEdit (v7.2.6) para montar as sequências que foram analisadas utilizando a ferramenta BLASTn, nucleotídeo a nucleotídeo, no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### 3.3.3 Análises filogenéticas

As sequências dos isolados de *Meyerozyma caribbica* foram inicialmente comparadas com sequências próximas através de pesquisa BLASTn no banco de dados GenBank do NCBI. Foi realizado um alinhamento usando gene 26S do rDNA e as sequências de referência recuperadas no mesmo banco de dados, alinhadas na Interface online do MAFT v.7 (KATOH E STANDLEY, 2013), e editadas manualmente no MEGA v.7 (KUMAR et al., 2016). As análises bayesianas foram realizadas com  $1 \times 10^6$  gerações usando MrBayes 3.2.7 (RONQUIST E HUELSENBECK, 2003) localizado no portal CIPRES Science Gateway (MILLER et al., 2010), com modelos de substituição gerados utilizando MrModel 2.3 (NYLANDER et al., 2004). As análises filogenéticas foram feitas através da probabilidade máxima (ML) utilizaram RAxML-HPCE no XSEDE 8.2.12 e no portal CIPRES Science Gateway (STAMATAKIS, 2014) com parâmetros padrão conduzidos com 1000 réplicas de bootstrap. A árvore foi visualizada no FigTree v.144.

### 3.4 TESTES DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO EM MEIO SÓLIDO

Os isolados das leveduras selecionadas juntamente com as linhagens JP1 de *Saccharomyces cerevisiae* (controle negativo de levedura não assimiladora de nitrato) e GDB 248 de *Dekkera bruxelensis* (controle positivo de levedura assimiladora de nitrato) foram submetidas a testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (DE BARROS PITA et al., 2011). Inicialmente, as leveduras foram crescidas em frascos do tipo Erlenmeyer contendo o meio YPD líquido, e colocadas em estufa a 30 °C por 24 horas a 160 rpm. Após o período de crescimento, foi realizada a leitura da turbidez a fim de se avaliar a concentração celular.

Em seguida, as células foram ajustadas para uma concentração com densidade óptica (D.O.600nm) em torno de 0,1 e 0,01 para que para que alíquotas de 10 µl fossem inoculadas em placas de Petri contendo o meio YNB w/o (*Yeast Nitrogen Base* sem aminoácidos e sem sulfato de amônio – 1,7 g/L); fontes de carbono (glicose ou xilose - 20 g/L); fontes de nitrogênio o NaNO<sub>3</sub> (nitrato de sódio -

6,43 g/L) e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (sulfato de amônio – 5 g/L). As placas foram incubadas em estufa a 30 °C durante 72 horas. O crescimento das leveduras foi observado por meio de análise semiquantitativa, e as leveduras que apresentaram crescimento mostraram ser capazes de assimilar as fontes de carbono e nitrogênio ofertadas no meio (VAUGHAN-MARTINI E MARTINI, 1993).

### 3.5 TESTE DE TOLERÂNCIA E CRESCIMENTO EM MEIOS DE CULTURA LÍQUIDOS E SÓLIDOS COM BAIXO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO

Os isolados de *Meyerozyma caribbica* foram colocados em meio 50 ml de meio W-L Nutrient Medium (WLN) modificado (SILVA, 2015), em meio líquido composto por: YNB w/o (*Yeast Nitrogen Base* sem aminoácidos e sem sulfato de amônio – 1,7 g/l); glicose (20 g/L);  $\text{NaNO}_3$  (Nitrato de sódio - 6,43 g/L) e uma combinação de antimicrobianos: ácido nalidíxico, ampicilina, cloranfenicol (todos na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ ) e cicloheximida (5 mg/L), acidificado com ácido sulfúrico (50% diluído em água) para obter diferentes variações de pH (3,5, 3,0, 2,5 e 2,0). A solução foi esterilizada com o filtro da KASVI (modelo K18-230) conteúdo porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ . Os frascos de Erlenmeyer com o meio de cultura e as células foram submetidos à agitação de 160 rpm, 30 °C por 24 horas. Após esse período, 0,1 mL da suspensão de células foram transferidos para placas de Petri contendo W-L Nutrient Medium (WLN) com  $\text{NaNO}_3$  (Nitrato de sódio - 6,43 g/L) e pH variáveis (3,5, 3,0, 2,5 e 2,0), onde os inóculos foram distribuídos sobre os meios com o auxílio da alça de Drigalsky. As placas em (triplicata) foram incubadas a 30 °C por até 72 horas. Após esse período, foi observado o crescimento das leveduras em meio sólido em todos os pH ajustado.

### 3.6 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

Para os experimentos de fermentação, as células foram crescidas em 200 ml de meio YPD líquido, e coletadas até atingirem quantidade suficiente de biomassa inicial. As células foram coletadas por centrifugação e, em seguida, lavadas com solução salina esterilizada (0,85%). Os ensaios das fermentações que simulam as condições industriais foram realizados com 10% (m/v) de biomassa celular em meios sintéticos compostos por YNB w/o (*Yeast Nitrogen Base* sem aminoácidos e sem

sulfato de amônio – 1,7 g/L); fontes de carbono (glicose e/ou xilose - 40 g/L e glicose e/ou xilose - 20 g/L) fontes de nitrogênio o NaNO<sub>3</sub> (nitrato de sódio - 6,43 g/L) e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sulfato de amônio – 5 g/L) por 120 horas a 30 °C em condições mínimas de oxigênio sem agitação. As amostras de cada tempo de fermentação foram centrifugadas e os sobrenadantes filtrados em filtros com porosidade 0,22 µm (Millipore) para determinação da concentração do açúcar residual e dos metabólitos produzidos, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em equipamento Agilent Technologies 1200 Series com a coluna modelo HPX87H (BioRad) em fase móvel de ácido sulfúrico a 5 mM, a 45 °C. Para determinação das concentrações, foi utilizada uma curva de calibração do metabólito em solução padrão. Os parâmetros fermentativos foram calculados segundo descrito por Leite et al (2013). Os experimentos foram realizados em triplicatas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE DE IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Um total de oito isolados de leveduras foram obtidos das duas áreas estudadas (Tabela 2), que foram identificados por meio da caracterização morfológica, amplificação dos *locus* ITS, amplificação e sequenciamento das regiões dos domínios D1/D2 do gene 26S do rDNA. A identificação das leveduras seguiu com base nos critérios propostos por Kurtzman e Robnett (1998) que considerou o limite mínimo de 99% de similaridade das sequências consultadas com as sequências tipo depositadas no banco de dados GenBank do NCBI. Essa análise foi realizada a partir do algoritmo de alinhamento local da sequência de nucleotídeos gerando o valor do percentual de similaridade (S) entre duas sequências, neste caso, a sequência dos isolados em relação à sequência da linhagem-tipo da espécie (Tabela 2).

**Tabela 2-** Identificação dos isolados procedentes das amostras dos solos e sua identificação por meio do porcentual de similaridade com a linhagem-tipo da espécie.

Isolado	Substrato	Identificação	S (%)
W13	Solo fertirrigado	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100
RAC	Solo fertirrigado	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100
53T2	Solo fertirrigado	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100
RAF	Solo fertirrigado	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100
CA3	Solo não fertirrigado	<i>Meyerozyma caribbica</i>	100
BE4	Solo não fertirrigado	<i>Candida maltosa</i>	100
ZB2	Solo fertirrigado	<i>Rhodotorula toruloides</i>	100
RA1	Solo não fertirrigado	<i>Blastobotrys raffinosifementans</i>	100

Assim, totalizaram-se quatro espécies identificadas a partir do crescimento em meio de cultura seletivo contendo nitrato de sódio como única fonte de

nitrogênio, sendo uma espécie encontrada apenas na área de solo fertirrigado com vinhaça, duas em área de solo não fertirrigado e uma espécie em ambas as áreas.

*Candida maltosa* é uma espécie de leveduras oriunda do solo (SLÁVIKOVÁ E VADKERTIOVÁ, 2003; MONTEIRO MOREIRA E MARTINS DO VALE, 2020) pertencente ao filo Asmomycota; classe Saccharomycetes; ordem Saccharomycetales; família Saccharomycetidae e gênero *Candida* (Index Fungorum, 2020). Foi descrita pela primeira vez por Komagata et al. (1964) e, embora não seja uma espécie patogênica (FERNANDES et al., 2016) é uma espécie de alto interesse acadêmico e industrial (WOLF, 2012).

*Rhodotorula toruloides* pertence ao filo Basidiomycota; classe Microbotryomycetes; ordem Sporidiobolales; família Sporidiobolaceae e gênero *Rhodotorula* (Index Fungorum, 2020). É uma levedura que por ser capaz de acumular lipídios até 70% em sua biomassa, é bastante utilizada em processos biotecnológicos como na produção de lipídios e carotenoides (JOHNS et al., 2016; TIUKOVA et al., 2019).

*Blastobotrys raffinosifermentans* é uma levedura oleaginosa que faz parte do filo Ascomycota; classe Saccharomycetes; ordem Saccharomycetales; família Trichomonascaceae e gênero *Blastobotrys* (Index Fungorum, 2020). A sua utilidade na indústria também está ligada a produção de lipídios (THOMAS et al., 2019).

*Meyerozyma caribbica* é classificada como pertencente ao filo Asmomycota; classe Saccharomycetes; ordem Saccharomycetales; família Debaryomycetaceae e gênero *Meyerozyma* (Index Fungorum, 2020). Essa levedura já foi isolada de vários substratos, incluindo solos em diferentes regiões do mundo (BRANDT E LOCKHART, 2012; AMORIM et al., 2018).

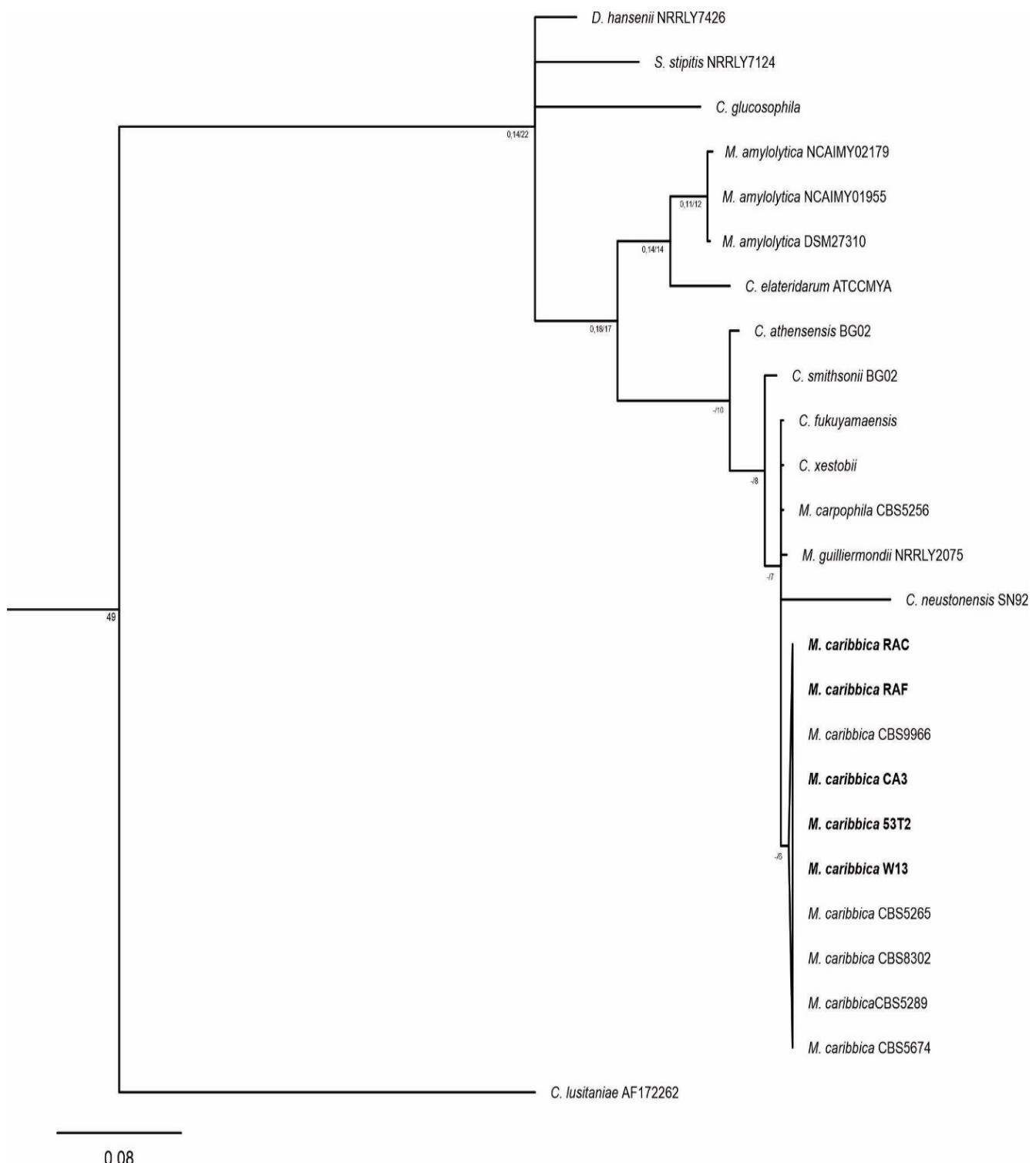
Com base nesses resultados, os espécimes de *Meyerozyma caribbica* foram selecionados por ser, segundo os registros de dados fisiológicos do banco de coleções de culturas do CBS-KNAW (Fungal Biodiversity Centre - Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) uma espécie de levedura que não assimila nitrato como fonte de nitrogênio.

As análises moleculares da região espaçadora transcrita interna (ITS) e dos domínios D1/D2 do gene 26s do rDNA são alternativas rápidas e confiáveis como método de identificação de leveduras (AYDIN et al., 2019). Utilizando essas regiões do rDNA, N'guessan et al (2011) analisaram a diversidade de leveduras envolvidas no processo fermentativo da “Tchapalo”, uma cerveja de sorgo tradicional da Costa

do Marfim, na qual a *M. caribbica* foi a terceira espécie de levedura mais isolada nesse processo. E em um trabalho realizado por Vila Nova et al. (2009), também fazendo o uso das sequências das regiões dos domínios D1/D2 do rDNA, evidenciou-se que a espécie de *M. caribbica* foi a segunda das leveduras mais isoladas em todos os processos de fermentação da produção de cachaças artesanais em três alambiques com diferentes níveis tecnológicos no estado de Pernambuco.

Vaughan-Martini et al. (2005) descreveram as espécies do complexo *Meyerozyma guilliermondii* como fenotipicamente indistinguíveis e intimamente relacionadas, em especial a *M. caribbica* e *M. guilliermondii*. Deste modo, realizamos a análise filogenética dos isolados de *M. caribbica* com base nas sequências dos domínios D1/D2 do gene 26S do rDNA dos isolados (Figura 8), que foram agrupadas com as sequências dos nucleotídeos de espécies representativas de leveduras depositadas no NCBI.

**Figura 8** - Filograma obtido por inferência bayesiana a partir de análise de sequências dos domínios D1/D2 do rDNA demonstrando o posicionamento dos isolados de *Meyerozyma caribbica* de solo em área fertirrigada com vinhaça. A *Candida lusitaniae* (AF172262) foi utilizada como grupo externo.



## 4.2 ANÁLISES DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO

Seguindo a identificação definitiva das leveduras por meio das análises moleculares. Os isolados foram testados para a capacidade de assimilar diferentes fontes de carbono e nitrogênio. O presente estudo evidenciou que os cinco isolados de *Meyerozyma caribbica* assimilaram glicose e xilose como fontes de carbono, e amônia e nitrato como fontes de nitrogênio. A capacidade de assimilar esses açúcares foi comparada com registros de *M. caribbica* depositada no CBS que estavam com informações completas sobre o perfil fisiológico (Tabela 3).

**Tabela 3** - Perfil fisiológico comparativo de assimilação dos isolados de *Meyerozyma caribbica* em diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Código da cepa	País	Substrato isolado	Assimilação				Fonte
			Glicose	Xilose	Amônio	Nitrato	
CBS 2022	Japão	Ar	Sim	Sim	Sim	Não	CBS
CBS 2819	Holanda	Água	Sim	Sim	Sim	Não	CBS <sup>(1)</sup>
CBS 5265	Brasil	Apêndice humano	Sim	Sim	Sim	Não	CBS
CBS 5289	Japão	Saquê	Sim	Sim	Sim	Não	CBS
CBS 5674	Reino Unido	Ar	Sim	Sim	Sim	Não	CBS
CBS 6319	Japão	Suco de uva	Sim	Sim	Sim	Não	CBS
CBS 8302	China	Inseto	Sim	Sim	Sim	Não	CBS
CBS 8303	China	Solo	Sim	Sim	Sim	Não	CBS
CBS 9966	Cuba	Cana-de-açúcar	Sim	Sim	Sim	Não	CBS
CA3	Brasil	Solo	Sim	Sim	Sim	Sim	Este trabalho
53T2	Brasil	Solo	Sim	Sim	Sim	Sim	Este trabalho
W13	Brasil	Solo	Sim	Sim	Sim	Sim	Este trabalho
RAF	Brasil	Solo	Sim	Sim	Sim	Sim	Este trabalho
RAC (URM8365)	Brasil	Solo	Sim	Sim	Sim	Sim	Este trabalho

(1) CBS-KNAW = Fungal Biodiversity Centre - Westerdijk Fungal Biodiversity Institute

Este é o primeiro estudo que relata isolados de *M. caribbica* assimilando nitrato como fonte de nitrogênio. O nitrogênio é um elemento constituinte de muitas biomoléculas (STOKSTAD, 2016), e um dos nutrientes essenciais para a sobrevivência de todos os organismos vivos que, apesar da sua abundância na atmosfera como gás dinitrogênio ( $N_2$ ), só será utilizado pelos organismos quando for convertido em amônia ( $NH_3$ ) pelos micro-organismos (BERNHARD, 2010). Muitos estudos propõem-se em pesquisar a desempenho das leveduras em diferentes condições de nitrogênio com o propósito de chegar a uma cinética satisfatória da fermentação alcoólica e um produto com qualidade; uma vez que a demanda por nitrogênio depende dos teores de açúcares, do tipo da cepa que será utilizada e das condições de fermentação (GOBERT et al., 2017).

Quanto a assimilação das fontes de nitrogênio, o sulfato de amônio e o nitrato de sódio foram as fontes utilizadas nesse estudo. Conforme a lista dos registros de *M. caribbica* no CBS na tabela anterior, todas as cepas dessa espécie assimilam amônio, mas nenhuma assimila nitrato. No entanto, os isolados deste trabalho foram capazes de crescer em meios de cultura sintéticos contendo tanto sulfato de amônio como nitrato de sódio como únicas fontes de nitrogênio. Deste modo, verificamos que as cepas ensaiadas apresentaram um perfil de assimilação muito semelhante ao da linhagem GDB 248 de *Dekkera bruxellensis* (controle positivo de levedura assimiladora de nitrato) (DE BARROS PITA et al., 2011). Logo, esta capacidade em assimilar o nitrato pode ter sido decorrente da pressão ambiental, ou seja, o ecossistema do solo possivelmente favoreceu a expressão de genes que compõem o mecanismo de assimilação do nitrato. Deste modo, esta variável fisiológica da *M. caribbica* pode proporcionar vantagens adaptativas para essas cepas perante outras leveduras consideradas não assimiladoras de nitrato, como a *Saccharomyces cerevisiae* durante o processo da fermentação alcoólica (BARBOSA NETO et al., 2014). Galafassi et al. (2013) caracterizaram o nitrato como uma das fontes mais ricas de nitrogênio na natureza, e que várias espécies de leveduras se mostraram capazes de assimilar o nitrato e o nitrito, entretanto, é uma via metabólica pouco estudada das leveduras.

Esses dados mostram que os nossos isolados representam o primeiro registro de *M. caribbica* assimiladora de nitrato. Em um estudo recente, realizado por Gharieb et al. (2020), cepas da espécie de *Meyerozyma guilliermondii* assimiladoras de nitrato foram isoladas de diferentes habitats (solo, água, folhas, flores, vegetais,

casca de frutas, bagaço de cana-de-açúcar e águas de resíduos) próximos a uma fábrica têxtil em Menoufia Governante, Egito. Com isto, podemos afirmar que a capacidade em assimilar nitrato não está restrita a uma única espécie do complexo *Meyerozyma guilliermondii*.

Em relação a capacidade de assimilar glicose e xilose como fonte de carbono, todos os registros até o momento, incluindo os isolados deste estudo, apresentam esse fenótipo. A habilidade dos nossos isolados de *M. caribbica* em assimilar a xilose corrobora com estudos onde outras espécies de leveduras e representantes do complexo *Meyerozyma guilliermondii* foram submetidos a condições semelhantes e foram capazes de crescer em meios de cultura contendo essa pentose (MARTINI et al., 2016; MATOS et al., 2017; YURKOV et al., 2017; DA SILVEIRA et al., 2020). Suranská et al. (2016) propõem que as diferenças entre a assimilação e a fermentação de açúcares são parâmetros taxonômicos importantes na identificação de leveduras. E os resultados apresentados no presente estudo corroboram com outros trabalhos que a glicose é a principal fonte carbono assimilada pelas leveduras (KAYIKCI & NIELSEN, 2015; SUKUMARAN et al., 2016; DUAN et al., 2019).

#### 4.3 ANÁLISE DA TOLERÂNCIA E CRESCIMENTO DOS ISOLADOS DE *MEYEROZYMA CARIBBICA* EM MEIOS DE CULTURA COM BAIXO PH

As respostas dos micro-organismos aos diferentes tipos de estresse é um caráter de sobrevivência e adaptação diante das condições adversas do ambiente (PEREIRA et al., 2012). Considerando que a aplicação da vinhaça no solo cause um estresse ao ambiente, principalmente à população microbiana devido a suas características físico-químicas. Avaliamos a resistência dos isolados de *M. caribbica* em meios de cultura sintéticos líquido com diferentes variações de pH (entre 2,0 e 3,5) ajustados com ácido sulfúrico, visando selecionar as leveduras mais resistentes ao baixo pH para os ensaios fermentativos.

Os resultados desta análise mostraram que o isolado (CA3) da área não fertirrigada com vinhaça tolerou e cresceu apenas em meios de cultura com pH 3,5. Contudo, os isolados (W13, 53T2, RAC (URM8365) e RAF) da área fertirrigada foram capazes de tolerarem as condições dos meios de cultura com pH até 2,5 e crescer, mostrando-se ser células mais ácido resistentes em comparação as

advindas do solo não fertirrigado com vinhaça. Comparamos a tolerância ao estresse ácido dos nossos isolados com as cepas da linhagem industrial JP1 de *Saccharomyces cerevisiae* e GDB 248 de *Dekkera bruxellensis* (Tabela 4).

As células de *M. caribbica* não resistiram aos meios com valores de pH menor que 2,5. Sendo assim, menos resistente que os já observados em cepas da linhagem JP1 de *S. cerevisiae*. Contudo, observamos que o perfil de tolerância e crescimento dos nossos isolados do solo fertirrigado foram semelhantes ao da linhagem de *D. bruxellensis* GDB 248 (RIBEIRO, 2019).

**Tabela 4** - Perfil de tolerância ao estresse ácido dos isolados de *Meyerozyma caribbica* em comparação a cepas de linhagem JP1 e GDB 248.

pH	JP1 <sup>1</sup>	GDB 248 <sup>2</sup>	CA3 <sup>3</sup>	W13 <sup>3</sup>	53T2 <sup>3</sup>	RAF <sup>3</sup>	URM8365 <sup>3</sup>
3,5	+	+	+	+	+	+	+
3,0	+	+	-	+	+	+	+
2,5	+	+	-	+	+	+	+
2,0	+	-	-	-	-	-	-

<sup>(1)</sup> MELO, 2006 <sup>(2)</sup> RIBEIRO, 2019 <sup>(3)</sup> Este trabalho

A área de coleta deste estudo está localizada na zona da mata Paraibana, de ordem de solo: argissolo, com média de pH 5,5 (ácido), típico de solos tropicais (SILVA et al., 2019). Deste modo, a aplicação da vinhaça nas áreas de plantação de cana-de-açúcar torna o solo mais ácido podendo sofrer alterações em seu pH ao longo do tempo (DOS SANTOS et al., 2009) que segundo Moreira-De-Sousa (2018), a acidez do solo é um dos grandes problemas acarretados ao uso da vinhaça como fertirrigante, tornando-o um solo tóxico.

Embora muitos estudos defendam o uso da vinhaça como um excelente fertilizante (SILVA et al., 2014 ;ZANI et al., 2018; BETTANI et al., 2019; CERRI et al., 2020) outros expõem os riscos e danos que a vinhaça pode causar ao meio ambiente, o que torna uma área seletiva aos micro-organismos expostos as diferentes condições oponentes do meio, como o pH (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; ALVES et al., 2015; ORTEGÓN et al., 2016; COELHO et al., 2018). Com isso, a utilização da vinhaça na fertirrigação das culturas da cana-de-açúcar pode ter

iniciado uma adaptação metabólica a esses isolados de *M. caribbica* a tolerarem um pH muito ácido e, possivelmente, as outras diversidades do meio.

#### 4.4 ANÁLISES DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

Dos quatro isolados que toleraram e cresceram no pH 2,5 do teste, o isolado URM8365 foi escolhido para as análises de fermentação em diferentes açúcares (glicose e xilose). A habilidade de fermentar esses açúcares também foi comparada com os registros de *Meyerozyma caribbica* depositada no CBS (Tabela 5). Portanto, observemos que apenas um registro (CBS 5289) não há informação sobre a habilidade de fermentar a glicose, todavia os demais fermentam. Em relação a xilose, apenas dois registros (CBS 2819 e CBS 6319) há informações sobre a capacidade de fermentar a xilose, que em consonância aos resultados deste estudo, não fermentam xilose.

**Tabela 5** - Perfil fisiológico comparativo da capacidade de fermentação de glicose e xilose dos isolados de *Meyerozyma caribbica*.

Código da cepa	País	Substrato isolado	Fermentação		Fonte
			Glicose	Xilose	
CBS 2022	Japão	Ar	Sim	ND <sup>(1)</sup>	CBS
CBS 2819	Holanda	Água	Sim	Não	CBS <sup>(2)</sup>
CBS 5265	Brasil	Apêndice humano	Sim	ND	CBS
CBS 5289	Japão	Saquê	ND	ND	CBS
CBS 5674	Reino Unido	Ar	Sim	ND	CBS
CBS 6319	Japão	Suco de uva	Sim	Não	CBS
CBS 8302	China	Inseto	Sim	ND	CBS
CBS 8303	China	Solo	Sim	ND	CBS
CBS 9966	Cuba	Cana-de-açúcar	Sim	ND	CBS
5XY2	Tailândia	Thai starter	Sim	Sim	Sukipat et al., 2017
URM8365	Brasil	Solo	Sim	Não	Este trabalho

(1) ND = resultado não disponível (2) CBS-KNAW = Fungal Biodiversity Centre - Westerdijk

Fungal Biodiversity Institute

O isolado escolhido foi testado em diferentes condições e concentrações de açúcares (glicose e/ou xilose), fontes de nitrogênio (sulfato de amônio e/ou nitrato de sódio) sob condição estática durante 120 horas de incubação a 30° C. Os parâmetros propostos para análise dos experimentos foram o consumo de açúcares, produção de etanol, produção de glicerol e rendimentos.

De acordo com os resultados observados ao longo do experimento em meios de fermentação contendo nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (Tabela 6), não houve o consumo da xilose e, consequentemente, não houve produção de etanol. Com relação a glicose, o consumo total ocorreu em 72 horas de fermentação com uma produção de 11,14 g/L de etanol e rendimento de 0,31 g/g<sup>-1</sup>. Nessa mesma condição teve produção de 0,62 g/L de glicerol, apresentando rendimento de 0,02 g/g<sup>-1</sup>. Já na fermentação do meio com glicose e xilose como fontes de carbono, observou-se que ocorreu o consumo de 4,77 g/L da xilose, e o consumo de toda a glicose. A produção de etanol foi de 8,88 g/L e o rendimento de 0,40 g/g<sup>-1</sup>. Não houve produção de glicerol.

**Tabela 6** - Parâmetros fermentativos do isolado URM8365 de *Meyerozyma caribbica* em diferentes açúcares e utilizando o nitrato como fonte de nitrogênio.

Parâmetros	Glicose	Xilose	Glicose + Xilose
Glicose inicial (g/L)	36,19 ( $\pm 0,26$ )	-	17,18 ( $\pm 0,10$ )
Xilose inicial (g/L)	-	35,62 ( $\pm 1,11$ )	18,80 ( $\pm 0,51$ )
Glicose final (g/L)	0,0 ( $\pm 0,00$ )	-	0,0 ( $\pm 0,00$ )
Xilose final (g/L)	-	35,62 ( $\pm 1,11$ )	14,03 ( $\pm 0,17$ )
Etanol produzido (g/L)	11,14 ( $\pm 1,91$ )	-	8,88 ( $\pm 0,35$ )
Glicerol produzido (g/L)	0,62 ( $\pm 0,19$ )	-	-
Rendimento do Etanol (g/g-1)	0,31 ( $\pm 0,00$ )	-	0,40 ( $\pm 0,00$ )
Rendimento do glicerol (g/g-1)	0,02 ( $\pm 0,40$ )	-	-
( $\pm$ ) desvio padrão			

Na fermentação em meios compostos por sulfato de amônio (tabela 7), observou-se assim como na anterior, que não ocorreu o consumo da xilose, apenas da glicose. O consumo total da glicose também ocorreu no período de 72 horas de fermentação com uma produção de 16,19 g/L de etanol e um rendimento de 0,43 g/g<sup>-1</sup>. A produção de glicerol foi de 0,67 g/L e o rendimento de 0,02 g/g<sup>-1</sup>. Em relação a fermentação dos meios contento glicose e xilose, podemos observar que toda a glicose foi consumida, e que também ocorreu o consumo da xilose que foi de 4,11 g/L. A produção de etanol foi de 9,29 g/L e o rendimento de 0,44 g/g<sup>-1</sup>. Também não houve produção de glicerol nesse ensaio.

**Tabela 7** - Parâmetros fermentativos do isolado URM8365 de *Meyerozyma caribbica* em diferentes açúcares e utilizando o amônio como fonte de nitrogênio

Parâmetros	Glicose	Xilose	Glicose + Xilose
Glicose inicial (g/L)	37,85 ( $\pm 0,90$ )	-	17,00 ( $\pm 0,23$ )
Xilose inicial (g/L)	-	36,82 ( $\pm 0,99$ )	18,95 ( $\pm 0,20$ )
Glicose final (g/L)	0,0 ( $\pm 0,00$ )	-	0,0 ( $\pm 0,00$ )
Xilose final (g/L)	-	36,82 ( $\pm 0,99$ )	14,84 ( $\pm 0,31$ )
Etanol produzido (g/L)	16,19 ( $\pm 1,09$ )	-	9,29 ( $\pm 1,73$ )
Glicerol produzido (g/L)	0,67 ( $\pm 0,12$ )	-	-
Rendimento do Etanol (g/g-1)	0,43 ( $\pm 0,01$ )	-	0,44 ( $\pm 0,00$ )
Rendimento do glicerol (g/g-1)	0,02 ( $\pm 0,18$ )	-	-
( $\pm$ ) desvio padrão			

Tendo em vista que há um número expressivo de leveduras que sejam capazes de assimilar a xilose, cerca de 1% destes são hábeis em convertê-la em etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007) que, embora seja o segundo açúcar mais abundante na natureza, é tido como menos desejável para a fermentação (SIEVERT et al., 2017). A capacidade de fermentar pentoses não é comum entre os micro-organismos (KUHAD et al., 2011). A *S. cerevisiae* é uma das leveduras que não

fermentam xilose, e a busca por micro-organismos fermentadores de pentoses é uma alternativa promissora para aumentar a produção de etanol (FINNERAN et al., 2018).

Os resultados desse estudo aduzem a glicose como a fonte de carbono preferencial para ser metabolizada, onde o meio de fermentação contendo glicose e sulfato de amônio obteve o mesmo rendimento de produção de etanol calculado para a cepa de *S. cerevisiae* linhagem JP1 (Blomqvist et al., 2012). O tempo de consumo total da glicose, produção e rendimento do etanol deste estudo foram semelhantes aos ensaios de fermentação realizados por Sukpipat et al (2017) usando o isolado 5XY2 de *M. caribbica* em diferentes açúcares. Contudo, os resultados foram divergentes quanto a fermentação da xilose.

A produção de etanol a partir da xilose só foi observada quando a glicose estava presente no meio, que pode ser explicado em virtude de uma possível deficiência metabólica da célula. Pois, embora a *M. caribbica* tenham os genes e as enzimas envolvidas no processo de fermentação da xilose, hipoteticamente, a célula apresenta uma deficiência metabólica que pode ser revertida com a adição de qualquer molecular provedora de NADH e/ou NADPH. As leveduras que fermentam a xilose possuírem uma xilose redutase dependente tanto de NADH como de NADPH (XR, EC 1.1.1.21), que na presença de NADH e/ou NADPH a xilose será metabolizada e o etanol será produzido em condições anaeróbicas ou de limitação de oxigênio (APEL et al., 2016; SUKPIPAT et al., 2017; VERAS et al., 2017). Deste modo, o nosso isolado tem potencial de fermentar a xilose, no entanto, desde que seja feito um ajuste metabólico através da adição de glicose no meio para que ocorra a fermentação da xilose. A co-fermentação, além de ser uma estratégia eficiente para aumentar a produtividade do etanol a partir da biomassa lignocelulósica, é uma fase de adaptação necessária de sobrevivência das leveduras (MOYSES et al., 2016; CHEN et al., 2018; TRICHEZ et al., 2019).

Vale destacar que os experimentos realizados em meios contendo sulfato de amônio obtiveram maior produtividade e rendimento do etanol. Tropea et al (2016) avaliaram a capacidade fermentativa de cepas de *S. cerevisiae* desenvolvendo meios de fermentação minimamente suplementado para a produção de etanol. Nesse estudo foi mostrado que os meios contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio obtiveram maiores produção e rendimento do etanol. Isso pode ser explicado pelo fato de a amônia ser uma fonte preferencial, devido à conservação de

energia para ser assimilada pela célula (XUE et al., 2018). No entanto, os resultados dos rendimentos em meio contento nitrato foram inferiores em relação a amônia por ser uma fonte de nitrogênio de requer um maior gasto energético para ser assimilada (DE BARROS PITA et al., 2011). Hahn-Hägerdal et al (2005) salientaram o quanto a composição do meio pode afetar fortemente o estado fisiológico e o desempenho de fermentação dos micro-organismos.

O Glicerol é um dos principais subprodutos formados durante a fermentação alcoólica (MATTAM et al., 2013). Cerca de 4 a 5% do carbono metabolizado poderá ser destinado à síntese de glicerol durante a fermentação (NAVARRETE et al., 2014). Podemos observar que a geração de glicerol ocorreu apenas em meios contendo glicose como única fonte de carbono, onde as concentrações e os rendimentos mantiveram-se equivalentes em ambos os experimentos, independentemente das diferentes fontes de nitrogênio. As produções de glicerol deste estudo foram inferiores em relação a outros, aos quais apresentaram concentrações superiores a 1 g/L (CHEN et al., 2016; NAGHSHBAND et al., 2019; VAUDANO et al., 2019). Mutton et al (2019) relata que a produção glicerol e etanol são inversamente proporcionais. Vila Nova et al (2009) correlacionaram a síntese reduzida de glicerol às baixas concentrações de oxigênio, e esta afirmativa coincide com os resultados apresentados, dado que o experimento foi realizado sem aeração. No entanto, as concentrações de glicose utilizadas nesse estudo também podem ter sido um dos fatores que corroboraram para a baixa produção de glicerol.

## 5 CONCLUSÃO

- Espécimes de *Meyerozyma caribbica* que assimilam nitrato como fonte de nitrogênio estão presentes em solos de área fertirrigada e não fertirrigada com vinhaça.
- Os isolados de *M. caribbica* de solo da área fertirrigada são capazes de tolerar e crescer em pH mais baixo do que os da área não fertirrigada.
- A cepa URM8365 de *M. caribbica* não fermentou a xilose em ambos os ensaios de fermentação como única fonte de carbono e o consumo da xilose ocorreu apenas quando o meio de fermentação continha glicose.
- Os experimentos realizados em meios contendo sulfato de amônio apresentaram maior produtividade e rendimento do etanol.
- O fato da *Meyerozyma caribbica* na literatura não assimilar nitrato, torna esse estudo importante por apresentar um novo viés, sendo necessárias mais pesquisas visando o melhor entendimento do seu metabolismo energético e aperfeiçoar seu potencial biotecnológico para fins industriais.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, Constantine John et al. **Introductory mycology**. John Wiley and Sons, 1996.
- ALMEIDA, Aliny Costa de. **Caracterização de leveduras isoladas de queijos de coalho**. 2011.
- ALVES, Paulo Roger L. et al. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science of the Total Environment**, v. 526, p. 222-232, 2015.
- AMORIM, Soraya Sander et al. Manganese (Mn<sup>2+</sup>) tolerance and biosorption by Meyerozyma guilliermondii and Meyerozyma caribbica strains. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 6, n. 4, p. 4538-4545, 2018.
- AMORIM, HV de; LEÃO, Regina Machado. Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia. **Piracicaba: Fermentec**, v. 448, 2005.
- APEL, Amanda Reider et al. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.
- ÁVILA, Julio et al. Clustering of the YNA1 gene encoding a Zn (II) 2Cys6 transcriptional factor in the yeast Hansenula polymorpha with the nitrate assimilation genes YNT1, YNI1 and YNR1, and its involvement in their transcriptional activation. **Biochemical journal**, v. 335, n. 3, p. 647-652, 1998.
- AYDIN, Merve et al. Identification of medically important yeasts by sequence analysis of the internal transcribed spacer and D1/D2 region of the large ribosomal subunit. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 36, n. 3, p. 129-138, 2019.
- BALOTA, Elcio Liborio et al. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, n. 4, p. 641-649, 1998.
- BARBOSA NETO, Adauto Gomes Barbosa et al. Proteome responses to nitrate in bioethanol production contaminant *Dekkera bruxellensis*. **Journal of proteomics**, v. 104, p. 104-111, 2014.
- BARNETT, James A. A history of research on yeasts 5: the fermentation pathway. **Yeast**, v. 20, n. 6, p. 509-543, 2003.
- BASÍLIO, A. C. M. et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 322-326, 2008.
- BASSO, Luiz C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

BASTOS, Rafaela Koglin et al. Produção de bioetanol de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 2, n. 3, 2013.

BAUTISTA-ROSALES, Pedro Ulises et al. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological control**, v. 65, n. 3, p. 293-301, 2013.

BEBÉ, Felizarda V. et al. Avaliação de solos sob diferentes períodos de aplicação com vinhaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 6, p. 781-787, 2009.

271-283, 2019.

BERNHARD, Anne. The nitrogen cycle: Processes. **Players, and Human**, 2010.

BERNARDI, Beatrice; WENDLAND, Jürgen. Homologous Recombination: A GRAS Yeast Genome Editing Tool. **Fermentation**, v. 6, n. 2, p. 57, 2020.

BETTANI, Silvia Raquel et al. Sugarcane vinasse and microalgal biomass in the production of pectin particles as an alternative soil fertilizer. **Carbohydrate polymers**, v. 203, p. 322-330, 2019.

BLOMQVIST, Johanna et al. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. **Yeast**, v. 29, n. 7, p. 265-274, 2012.

BOER, Erik et al. Characterization and expression analysis of a gene cluster for nitrate assimilation from the yeast *Arxula adeninivorans*. **Yeast**, v. 26, n. 2, p. 83-93, 2009.

BRANDT, Mary E.; LOCKHART, Shawn R. Recent taxonomic developments with *Candida* and other opportunistic yeasts. **Current fungal infection reports**, v. 6, n. 3, p. 170-177, 2012.

CAMPBELL, Mary K., et al. **Bioquímica**. Vol. 4. Thomson, 2004.

CARDONA, Carlos A.; SÁNCHEZ, Óscar J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

CASANOVA NAVARRO, Hector Mauricio et al. Diversidade e taxonomia polifásica de leveduras associadas à família Bromeliaceae na Mata Atlântica Setentrional. 2018.

CERRI, Bianca Carreiro et al. Evaluation of new environmental friendly particulate soil fertilizers based on agroindustry wastes biopolymers and sugarcane vinasse. **Waste Management**, v. 108, p. 144-153, 2020.

CHEN, Yingying et al. Co-fermentation of cellobiose and xylose by mixed culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic modeling. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0199104, 2018.

- COELHO, Maria Paula Mancini et al. Toxicity evaluation of leached of sugarcane vinasse: Histopathology and immunostaining of cellular stress protein. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 165, p. 367-375, 2018.
- CONTERNO, Lorenza et al. Genetic and physiological characterization of Brettanomyces bruxellensis strains isolated from wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 57, n. 2, p. 139-147, 2006.
- COOPER, Terrance G. Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 3, p. 223-238, 2002.
- COSTA, Misael Silva Ferreira. Diversidade de leveduras do solo do SEMI-ÁRIDO da BAHIA, BRASIL. 2006.
- COSTA, Ohana Yonara Assis et al. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 73-84, 2015.
- CHEN, Yun et al. High-purity propionate production from glycerol in mixed culture fermentation. **Bioresource technology**, v. 219, p. 659-667, 2016.
- CHRISTOFOLLETTI, Cintya Aparecida et al. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752-2761, 2013.
- DA SILVA, Mellissa Ananias Soler et al. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.
- DA SILVA, Teresa Cristina Domingos et al. Distribution of Dekkera bruxellensis in a sugarcane-based fuel ethanol fermentation plant. **Letters in applied microbiology**, v. 62, n. 4, p. 354-358, 2016.
- DA SILVEIRA, Fernando Augusto et al. Isolation of xylose-assimilating yeasts and optimization of xylitol production by a new *Meyerozyma guilliermondii* strain. **International Microbiology**, p. 1-10, 2019.
- DAS, Maitreyi; BHAT, Paike Jayadeva. Disruption of MRG19 results in altered nitrogen metabolic status and defective pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 91-98, 2005.
- DE BARROS PITA, Will. **Análise da expressão dos genes relacionados à assimilação do nitrato na levedura Dekkera Bruxellensis**. 2009.
- DE BARROS PITA, Will et al. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 1, p. 99-107, 2011.
- DE BARROS PITA, Will et al. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. **Yeast**, v. 30, n. 3, p. 111-117, 2013.

- DE CRAENE, Johan-Owen et al. The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 43939-43948, 2001.
- DEAK, Tibor. Environmental Factors Influencing Yeasts. **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, p. 155-174, 2006.
- DELLIAS, Marina de Toledo Ferraz et al. Biofilm formation and antimicrobial sensitivity of lactobacilli contaminants from sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 9, p. 1631-1644, 2018.
- DE SOUZA LIBERAL, A. T. et al. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in applied microbiology**, v. 40, n. 1, p. 19-23, 2005.
- DE SOUZA LIBERAL, A. T. et al. Identification of Dekkera bruxellensis as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 538-547, 2007.
- DIONÍSIO, J. A.; PIMENTEL, I. C.; SIGNOR, D. Biomassa microbiana. **Embrapa Semiárido-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2016.
- DOS SANTOS, Eric Francisco Simão et al. O Efeito da Complexidade Estrutural da Fonte de Carbono e Nitrogênio no Desempenho Fermentativo de Leveduras Industrias. **Ciência e Natura**, v. 35, n. 2, p. 9-14, 2013.
- DOS SANTOS, Tânia Marta Carvalho et al. Efeito da fertirrigação com vinhaça nos microrganismos do solo. **Revista caatinga**, v. 22, n. 1, p. 155-160, 2009.
- DUAN, Shou-Fu et al. Reverse evolution of a classic gene network in yeast offers a competitive advantage. **Current Biology**, v. 29, n. 7, p. 1126-1136. e5, 2019.
- ERNANDES, Fernanda Maria Pagane Guereschi; GARCIA-CRUZ, Crispin Humberto. Zymomonas mobilis: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 361-380, 2009.
- ENSINAS, Adriano V. et al. Analysis of process steam demand reduction and electricity generation in sugar and ethanol production from sugarcane. **Energy Conversion and Management**, v. 48, n. 11, p. 2978-2987, 2007.
- FERNANDES, José AL et al. Evolution and application of inteins in Candida species: a review. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1585, 2016.
- FERREIRA, Eloisa Aparecida Belleza et al. Dinâmica do carbono da biomassa microbiana em cinco épocas do ano em diferentes sistemas de manejo do solo no cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 6, p. 1625-1635, 2007.
- FERREIRA, EP de B. et al. Population and microbial activity of the soil under an agro-ecological production system. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 1, p. 22-31, 2017.
- FERREIRA, Natália Locks et al. Estratégias de fertilização e manipulação microbiana no cultivo superintensivo de camarão marinho em sistema de bioflocos. 2017.

FIGUEIREDO, Bruna Inez Carvalho de. Cruzamentos entre leveduras da fermentação da cachaça para a obtenção de novas estirpes: potencial para produção de cervejas. 2016.

FINNERAN, Kevin T.; POPOVIC, Jovan. Solvent production from xylose. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 20, p. 8707-8715, 2018.

FRANCISCO, Gabriela Amorozo. **Biodegradação da vinhaça resíduo da produção de etanol**. 2008.

FRANDEN, Mary Ann et al. Inhibition of growth of Zymomonas mobilis by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2013.

GALAFASSI, Silvia et al. Utilization of nitrate abolishes the “Custers effect” in Dekkera bruxellensis and determines a different pattern of fermentation products. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 40, n. 3-4, p. 297-303, 2013.

GEISSELER, Daniel et al. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms—a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2058-2067, 2010.

GOBERT, Antoine et al. Non-Saccharomyces yeasts nitrogen source preferences: impact on sequential fermentation and wine volatile compounds profile. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2175, 2017.

GODARD, Patrice et al. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 8, p. 3065-3086, 2007.

GONÇALVES, Raquel Cristina Fonseca et al. Compostos voláteis em cachaças de alambique produzidas por leveduras selecionadas e por fermentação espontânea. **MAGISTRA**, v. 28, n. 3/4, p. 285-293, 2017.

GHARIEB, Mohamed M. et al. Biodegradation of the Azo Dyes Direct Red 81 and Reactive Brilliant Red X-3B by Wild Strains of Yeasts Meyerozyma guilliermondii and Naganishia diffluens. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 9, n. 3, p. 1243-1260, 2020.

GUEIROS, Rute Salgues. **Otimização das técnicas de manipulação genética de leveduras industriais para aplicação na produção de álcool combustível**. 2006.

GUILMAN, Francielle et al. Comparação da produção de etanol por Zymomonas mobilis em meio de melado de cana-de-açúcar puro e pré-tratado com invertase. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 20, n. 2, p. 39-43, 2000.

HAHN-HÄGERDAL, Bärbel et al. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. **Microbial cell factories**, v. 4, n. 1, p. 1-16, 2005.

HAHN-HÄGERDAL, Bärbel et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.

- HAMBY, Kelly A. et al. Associations of yeasts with spotted-wing Drosophila (*Drosophila suzukii*; Diptera: Drosophilidae) in cherries and raspberries. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 14, p. 4869-4873, 2012.
- HUANG, H.-J. et al. Separation and Purification processes for lignocellulose-to-bioalcohol production. In: **Bioalcohol production**. Woodhead Publishing, 2010. p. 246-277.
- IÑIGUEZ-MORENO, Maricarmen et al. Sodium alginate coatings added with Meyerozyma caribbica: Postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado (*Persea americana* Mill. cv. Hass). **Postharvest Biology and Technology**, v. 163, p. 111123, 2020.
- JENSEN, Birgit et al. Characterization of microbial communities and fungal metabolites on field grown strawberries from organic and conventional production. **International journal of food microbiology**, v. 160, n. 3, p. 313-322, 2013.
- JOHNS, Alexander et al. Four inducible promoters for controlled gene expression in the oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides*. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1666, 2016.
- JUNQUEIRA, Tassia L. et al. Techno-economic analysis and climate change impacts of sugarcane biorefineries considering different time horizons. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 50, 2017.
- KAYIKCI, Ömur; NIELSEN, Jens. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 6, p. fov068, 2015.
- KATOH, Kazutaka; STANDLEY, Daron M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.
- KUHAD, Ramesh Chander et al. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4950-4962, 2011.
- KUMAR, Santosh et al. A renewable source of energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 7, p. 1830-1844, 2010.
- KUMAR, Sudhir et al. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- KWAK, Suryang et al. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 2, p. 271-283, 2019.
- KURTZMAN, Cletus P.; ROBNETT, Christie J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 4, p. 331-371, 1998.

LAIME, Eduardo Maciel et al. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 3, 2011.

LEITE, Fernanda Cristina Bezerra et al. Quantitative aerobic physiology of the yeast Dekkera bruxellensis, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS yeast research**, v. 13, n. 1, p. 34-43, 2013.

LIMA, Ana VA et al. Volatile compounds obtained by the hydrodistillation of sugarcane vinasse, a residue from ethanol production. **Rev. Virtual Quim**, v. 9, n. 2, p. 764-773, 2017.

LOUREIRO, Silvia Tereza Azedo et al. Leveduras Isoladas de Sedimento do Manguezal da Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. **Tropical Oceanography (Online)**, v. 39, p. 60-68, 2011.

MAGASANIK, Boris. Regulation of nitrogen utilization. In: Jones EW, Pringle JR, Broach JR (eds). **The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces**, v. 2, p. 283-317. 1992.

MAGASANIK, Boris; KAISER, Chris A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, n. 1-2, p. 1-18, 2002.

MARC, Jillian et al. Impact of oleic acid as co-substrate of glucose on “short” and “long-term” Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial cell factories**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2013

MARTINI, Cristina et al. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 80, 2016.

MARZLUF, George A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 17-32, 1997.

MATOS, Italo Thiago Silveira Rocha et al. Isolation and Characterization of Yeasts Able to Assimilate Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate and Produce Xylitol Associated with Veturius transversus (Passalidae, Coleoptera, and Insecta). **International Journal of Microbiology**, v. 2017, 2017.

MATSUSHIKA, Akinori et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 37-53, 2009.

MATTAM, Anu Jose et al. Fermentation of glycerol and production of valuable chemical and biofuel molecules. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 6, p. 831-842, 2013.

MELO, Hélio Fernandes de. Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial. 2006.

MILLER, Mark A. et al. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: **2010 gateway computing environments workshop (GCE)**. p. 1-8, 2010.

MINEHART, Patricia L.; MAGASANIK, Boris. Sequence of the GLN1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the upstream region in regulation of glutamine synthetase expression. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 6, p. 1828-1836, 1992.

MOREIRA-DE-SOUZA, Cristina. Avaliação dos impactos gerados pela vinhaça bruta e após ajuste de pH, em representantes da fauna edáfica. 2018.

MONTEIRO MOREIRA, Geisianny Augusta; MARTINS DO VALE, Helson Mario. Soil Yeast Communities in Revegetated Post-Mining and Adjacent Native Areas in Central Brazil. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1116, 2020.

MOYSÉS, Danuza Nogueira et al. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 207, 2016.

MUTTON, Márcia Justino Rossini et al. Interaction between the production of ethanol and glycerol in fed-batch bioreactors. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 389-394, 2019.

NAGHSHBANDI, Mohammad Pooya et al. Progress toward improving ethanol production through decreased glycerol generation in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic and genetic engineering approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, p. 109353, 2019.

NAVARRETE, Clara; NIELSEN, Jens; SIEWERS, Verena. Enhanced ethanol production and reduced glycerol formation in *fps1 $\Delta$*  mutants of *Saccharomyces cerevisiae* engineered for improved redox balancing. **Amb Express**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2014.

N'GUÉSSAN, Kouadio Florent et al. Identification of yeasts during alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer from Côte d'Ivoire. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 4, p. 855-864, 2011.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.

NYLANDER, Johan AA et al. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. **Systematic biology**, v. 53, n. 1, p. 47-67, 2004

OLIVEIRA, Thaís Borges de et al. Leveduras produtoras de AIA e solubilizadoras de P visando a promoção de crescimento de tomateiro. 2016.

ORTEGÓN, Gloria Páez et al. Vinasse application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). **Science of the Total Environment**, v. 539, p. 410-419, 2016.

PACHECO, Thályta Fraga et al. Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. 2010.

PAN, Wei et al. Kinetics of sugars, organic acids and acetaldehyde during simultaneous yeast-bacterial fermentations of white wine at different pH values. **Food research international**, v. 44, n. 3, p. 660-666, 2011.

PARENTE, Denise Castro. Genética do metabolismo de fontes de nitrogênio na levedura Dekkera bruxellensis. 2017.

PARSAEE, Mostafa; KIANI, Mostafa Kiani Deh; KARIMI, Keikhosro. A review of biogas production from sugarcane vinasse. **Biomass and bioenergy**, v. 122, p. 117-125, 2019

PEÑA MORENO, Irina Charlot. **Influência da disponibilidade de nitrogênio na expressão de genes do metabolismo central da levedura Dekkera bruxellensis cultivada em anaerobiose**. 2017.

PEREIRA, Luciana Filgueira et al. The physiological characteristics of the yeast Dekkera bruxellensis in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 529-539, 2012.

PHAFF, H. J. Yeasts associated with plants, insects and soil. **The yeasts**, v. 1, p. 123-180, 1987.

PRADA, Sílvio Miranda et al. Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 249-252, 1998.

PRETORIUS, Isak S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

PROMPT, Alice Heidrich et al. Análise da fermentação de glicose e xilose por leveduras *Spathaspora* isoladas de madeira em decomposição. 2012.

REIS JUNIOR, FB dos; MENDES, I. de C. Biomassa microbiana do solo. **Planaltina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2007.

RIBEIRO, Karol Cristianne Silva. **Investigação da capacidade de tolerância a agentes de estresse industrial na levedura contaminante Dekkera bruxellensis**. 2019.

RODRIGUES, Alda J. et al. Environmental factors influencing the efficacy of different yeast strains for alcohol level reduction in wine by respiration. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 1038-1043, 2016.

RONQUIST, Fredrik; HUELSENBECK, John P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

RUEGGER, Marcelo JS; TAUK-TORNISIELO, Sâmia M. Cellulase activity of fungi isolated from soil of the Ecological Station of Juréia-Itatins, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

SÁ, Clarissa Brito Carvalho de. **Caracterização de Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* para Aplicação na Produção de Bioetanol.** 2012.

SANTA CRUZ, Luiz Felipe Lomanto et al. Análise da viabilidade técnica, econômica e ambiental das atuais formas de aproveitamento da vinhaça: fertirrigação, concentração e biodigestão. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 29, p. 111-127, 2013.

SILVA, Aletéia PM da; BONO, José AM; PEREIRA, Francisco de AR. Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, p. 38-43, 2014.

SILVA, Cristina F. et al. Using the residue of spirit production and bio-ethanol for protein production by yeasts. **Waste Management**, v. 31, n. 1, p. 108-114, 2011.

SILVA, Gilberto Henrique Teles Gomes da. **Análise do metabolismo respiro-fermentativo do acetaldeído na levedura Dekkera bruxellensis.** 2017.

SILVA, José Alexsandro et al. Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1073-1077, 2008.

SILVA, L. C. N. et al. Genetic variability analysis of *Zymomonas mobilis* strains from the UFPEDA microorganisms collection. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 805-814, 2015.

SILVA, Rita de Cássia Ferreira da et al. Assessing the Content of Micronutrients in Soils and Sugarcane in Different Pedogeological Contexts of Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 43, 2019.

SILVA, Teresa Cristina Domingos da. **Ecologia da levedura Dekkera bruxellensis no ambiente da fermentação alcoólica industrial.** 2015.

SIVERIO, José M. Assimilation of nitrate by yeasts. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 3, p. 277-284, 2002.

SIEVERT, Christian et al. Experimental evolution reveals an effective avenue to release catabolite repression via mutations in XylR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 28, p. 7349-7354, 2017.

SLÁVIKOVÁ, Elena; VADKERTIOVÁ, Renata. The diversity of yeasts in the agricultural soil. **Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms**, v. 43, n. 5, p. 430-436, 2003.

SOUSA, JL de; MONTEIRO, R. A. B. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. **FAZU em Revista**, n. 08, 2012.

STAMATAKIS, Alexandros. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.

STOKSTAD, Erik. The nitrogen fix. 2016.

SUKUMARAN, D. et al. Application of biogenic carbon dioxide produced by yeast with different carbon sources for attraction of mosquitoes towards adult mosquito traps. **Parasitology research**, v. 115, n. 4, p. 1453-1462, 2016.

SUKPIPAT, Wiphat et al. Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with l-arabitol dehydrogenase activity from the newly isolated pentose-fermenting yeast Meyerozyma caribbica 5XY2. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 123, n. 1, p. 20-27, 2017.

ŠURANSKÁ, Hana; VRÁNOVÁ, Dana; OMELKOVÁ, Jiřina. Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 1, p. 181-190, 2016.

TER SCHURE, Eelko G. et al. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 67-83, 2000.

THOMAS, Stéphane et al. Blastobotrys adeninivorans and B. raffinosifermentans, two sibling yeast species which accumulate lipids at elevated temperatures and from diverse sugars. **Biotechnology for biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2019.

TORSVIK, Vigdis; OVREÅS, Lise. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

TROPEA, Alessia et al. Development of minimal fermentation media supplementation for ethanol production using two *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Natural product research**, v. 30, n. 9, p. 1009-1016, 2016.

TRICHEZ, Débora et al. Physiological and comparative genomic analysis of new isolated yeasts *Spathaspora* sp. JA1 and *Meyerozyma caribbica* JA9 reveal insights into xylitol production. **FEMS yeast research**, v. 19, n. 4, p. foz034, 2019.

TIUKOVA, Ievgeniia A. et al. Proteome analysis of xylose metabolism in *Rhodotorula toruloides* during lipid production. **Biotechnology for biofuels**, v. 12, n. 1, p. 137, 2019.

VAUDANO, Enrico et al. Yeast distribution in Grignolino grapes growing in a new vineyard in Piedmont and the technological characterization of indigenous *Saccharomyces* spp. strains. **International journal of food microbiology**, v. 289, p. 154-161, 2019.

VAUGHAN-MARTINI, Ann; MARTINI, Alessandro. A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 113-119, 1993.

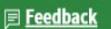
VAUGHAN-MARTINI, Ann et al. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 4-5, p. 463-469, 2005.

VERAS, Henrique César Teixeira et al. Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. **Microbial cell factories**, v. 16, n. 1, p. 153, 2017.

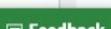
- VILLA-CARVAJAL, Mercedes et al. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8 S ribosomal DNA gene. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 2, p. 171-181, 2006.
- VILA NOVA, Meiriana Xavier Vila et al. Yeast species involved in artisanal cachaca fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 460-466, 2009.
- WHEALS, Alan E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in biotechnology**, v. 17, n. 12, p. 482-487, 1999.
- WOLF, Klaus. **Nonconventional yeasts in biotechnology: a handbook**. Springer Science & Business Media, 2012.
- WONG, Koon Ho et al. Recent advances in nitrogen regulation: a comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 6, p. 917-925, 2008.
- WOOLFIT, Megan et al. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 4, p. 721-733, 2007.
- XUE, Saisi et al. Water-soluble phenolic compounds produced from extractive ammonia pretreatment exerted binary inhibitory effects on yeast fermentation using synthetic hydrolysate. **PLoS one**, v. 13, n. 3, p. e0194012, 2018.
- YANG, Yongfu et al. Progress and perspective on lignocellulosic hydrolysate inhibitor tolerance improvement in *Zymomonas mobilis*. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2018.
- YURKOV, Andrey M.; DLAUCHY, Dénes; PÉTER, Gábor. *Meyerozyma amylolytica* sp. nov. from temperate deciduous trees and the transfer of five *Candida* species to the genus *Meyerozyma*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 3977-3981, 2017.
- ZAMORA, Fernando. Biochemistry of alcoholic fermentation. In: **Wine chemistry and biochemistry**. Springer, New York, NY, p. 3-26, 2009.
- ZANI, Caio F. et al. Vinasse application and cessation of burning in sugarcane management can have positive impact on soil carbon stocks. **PeerJ**, v. 6, p. e5398, 2018.
- ZHANG, Min et al. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. **Science**, v. 267, n. 5195, p. 240-243, 1995.

**ANEXO A – Relatório obtido no site www.ncbi.nlm.nih.gov para a sequência de nucleotídeos da região dos domínios D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal dos isolados.**

**Figura 1.** Sequências que formaram percentual de similaridade significativo com o isolado W13.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy													
Sequences producing significant alignments										Download	New	Select columns	Show	100	?		
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected										GenBank		Graphics		Distance tree of results			
	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession								
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Meyerozyma caribbica strain DTO 423-B5 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Meyerozyma ca...	953	953	100%	0.0	100.00%	842	MT251155.1								
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Meyerozyma guilliermondii isolate JP-4-2 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Meyerozyma g...	953	953	100%	0.0	100.00%	584	MN736499.1								
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Meyerozyma guilliermondii strain BSS 121 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Meyerozyma g...	953	953	100%	0.0	100.00%	570	MN736498.1								
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Meyerozyma caribbica isolate 92A large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Meyerozyma ca...	953	953	100%	0.0	100.00%	554	MN736497.1					 Feedback			

**Figura 2.** Sequências que formaram percentual de similaridade significativo com o isolado BE4.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy													
Sequences producing significant alignments										Download	New	Select columns	Show	100	?		
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected										GenBank		Graphics		Distance tree of results			
	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession								
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida maltosa isolate CA109 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Candida maltosa	989	989	100%	0.0	100.00%	586	MK110302.1								
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida maltosa isolate CA110 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Candida maltosa	989	989	100%	0.0	100.00%	587	MK110301.1								
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida maltosa isolate CA115 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Candida maltosa	989	989	100%	0.0	100.00%	591	MK110300.1								
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Candida maltosa isolate CA612 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Candida maltosa	989	989	100%	0.0	100.00%	589	MK110303.1					 Feedback			

**Figura 3.** Sequências que formaram percentual de similaridade significativo com o isolado RAC.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy										
Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show 100	?	
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected										GenBank	Graphics	Distance tree of results		
Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession						Feedback
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza caribbica strain DTO 423-B5 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meyeromyza ca...	990	990	100%	0.0	100.00%	842	MT251155.1						
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza guilliermondii isolate JP-4-2 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meyeromyza g...	990	990	100%	0.0	100.00%	584	MN736499.1						
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza guilliermondii strain BSS 121 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meyeromyza g...	990	990	100%	0.0	100.00%	570	MT446317.1						
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza caribbica strain CBS 9966 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri... Meyeromyza ca...	Meyeromyza ca...	990	990	100%	0.0	100.00%	2883	MH545919.1						

**Figura 4.** Sequências que formaram percentual de similaridade significativo com o isolado 53T2.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy										
Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show 100	?	
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected										GenBank	Graphics	Distance tree of results		
Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession						Feedback
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza caribbica strain DTO 423-B5 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meyeromyza ca...	994	994	100%	0.0	100.00%	842	MT251155.1						
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza guilliermondii isolate JP-4-2 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meyeromyza g...	994	994	100%	0.0	100.00%	584	MN736499.1						
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza guilliermondii strain BSS 121 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meyeromyza g...	994	994	100%	0.0	100.00%	570	MT446317.1						
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza caribbica strain CBS 9966 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri... Meyeromyza ca...	Meyeromyza ca...	994	994	100%	0.0	100.00%	2883	MH545919.1						
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza caribbica strain CSJJ3-12 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meyeromyza ca...	994	994	100%	0.0	100.00%	589	MH545919.1						

**Figura 5.** Sequências que formaram percentual de similaridade significativo com o isolado CA3

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy										
Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show 100	?	
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected										GenBank	Graphics	Distance tree of results		
Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession						Feedback
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza caribbica strain DTO 423-B5 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meyeromyza ca...	990	990	97%	0.0	100.00%	842	MT251155.1						
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza guilliermondii isolate JP-4-2 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meyeromyza g...	990	990	97%	0.0	100.00%	584	MN736499.1						
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza guilliermondii strain BSS 121 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meyeromyza g...	990	990	97%	0.0	100.00%	570	MT446317.1						
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza caribbica strain CBS 9966 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri... Meyeromyza ca...	Meyeromyza ca...	990	990	97%	0.0	100.00%	2883	MH545919.1						
<input checked="" type="checkbox"/> Meyeromyza caribbica strain CSJJ3-12 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Meyeromyza ca...	990	990	97%	0.0	100.00%	589	MH545919.1						

**Figura 6.** Sequências que formaram percentual de similaridade significativo com o isolado RAF

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy										
Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show 100	?	
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected										GenBank	Graphics	Distance tree of results		
	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Meyeromyza caribbica strain DTO 423-B5 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Meyeromyza ca...	968	968	100%	0.0	100.00%	842	MT251155.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Meyeromyza guilliermondii isolate JP-4-2 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Meyeromyza g...	968	968	100%	0.0	100.00%	584	MN736499.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Meyeromyza guilliermondii strain BSS 121 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Meyeromyza g...	968	968	100%	0.0	100.00%	570	MT446317.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Meyeromyza caribbica strain CBS 9966 18S small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer, partial sequence</a>	Meyeromyza ca...	968	968	100%	0.0	100.00%	2883	MT251155.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Meyeromyza caribbica strain CSJ3-12 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Meyeromyza ca...	968	968	100%	0.0	100.00%	589	MT251155.1					

**Figura 7.** Sequências que formaram percentual de similaridade significativo com o isolado RA1

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy										
Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show 100	?	
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected										GenBank	Graphics	Distance tree of results		
	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Blastobotrys raffinosfermentans strain HM08 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Blastobotrys raf...	1016	1016	100%	0.0	100.00%	562	MT609892.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Blastobotrys adeninivorans culture CBS 7370 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Blastobotrys ad...	1016	1016	100%	0.0	100.00%	608	KY106200.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Blastobotrys adeninivorans culture CBS 8335 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Blastobotrys ad...	1016	1016	100%	0.0	100.00%	842	KY106199.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Blastobotrys adeninivorans culture CBS 7377 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Blastobotrys ad...	1016	1016	100%	0.0	100.00%	915	KY106198.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Blastobotrys raffinosfermentans isolate UTHSCSA019_179LSU large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Blastobotrys raf...	1016	1016	100%	0.0	100.00%	619	MT609892.1					

**Figura 8.** Sequências que formaram percentual de similaridade significativo com o isolado ZB2

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy										
Sequences producing significant alignments										Download	Select columns	Show 100	?	
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected										GenBank	Graphics	Distance tree of results		
	Description	Common Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodotorula toruloides isolate 2Y38 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Rhodotorula tor...	974	974	100%	0.0	100.00%	854	MT293236.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodotorula toruloides isolate CA321 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Rhodotorula tor...	974	974	100%	0.0	100.00%	592	MK110341.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodotorulidiobolus sp. strain MCA4124 28S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Rhodotorulidiob...	974	974	100%	0.0	100.00%	971	MG588961.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodotorula toruloides strain IG15 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Rhodotorula tor...	974	974	100%	0.0	100.00%	578	MK027322.1					
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodotorula toruloides culture CBS 12050 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	Rhodotorula tor...	974	974	100%	0.0	100.00%	911	KM027322.1					