

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VICTOR EMANUEL PETRÍCIO GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DA LEVEDURA *MEYEROZYMA CARIBBICA* URM8365 NA
PRODUÇÃO DE XILITOL EM RESPOSTA A PRESENÇA DO ÁCIDO
ACÉTICO**

RECIFE
2023

VICTOR EMANUEL PETRÍCIO GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DA LEVEDURA *MEYEROZYMA CARIBBICA* URM8365 NA
PRODUÇÃO DE XILITOL EM RESPOSTA A PRESENÇA DO ÁCIDO
ACÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra
Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Barros de Souza

RECIFE
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Guimarães, Victor Emanuel Petrócio

Avaliação da levedura *Meyerozyma caribbica* URM8365 na produção de xilitol em resposta a presença de ácido acético / Victor Emanuel Petrócio Guimarães– 2023.

74 f. : il., fig., tab.

Orientador: Emmanuel Damilano Dutra

Coorientador: Rafael Barros de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Recife, 2023.

Inclui referências e anexo.

1. Leveduras (fungos) 2. Fermentação 3. Biomassa I. Dutra, Emmanuel Damilano (orient.) II. Souza, Rafael Barros (coorient.) III. Título

579.563

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -202

VICTOR EMANUEL PETRÍCIO GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DA LEVEDURA *MEYEROZYMA CARIBBICA* URM8365 NA
PRODUÇÃO DE XILITOL EM RESPOSTA A PRESENÇA DO ÁCIDO
ACÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia da Universidade
Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de
Biociências, como requisito para a obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia

Aprovado em: 17/08/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emmanuel Damilano Dutra
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Jorge Luiz Silveira Sonogo
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Paula Katharina Nogueira da Silva
Departamento de Energia Nuclear
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Recife, 17 de agosto de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, a Deus, que foi primordial em toda minha vida e que me deu estrutura para suportar as dificuldades na vigência do mestrado, juntamente a minha família, minha mãe Aurora Petrício, meu pai Carlos Guimarães e meus irmãos Caio Petrício, Marcos do Nascimento, Danilo do Nascimento, e a minha companheira e amiga Vitória Layla, que foram base durante esse processo.

Gratidão a cada pessoa que passou nestes últimos dois anos me auxiliando, destaco entre eles também, Helena Melo, Erick Rodrigues, Mitchell de Barros Lewis e Ricardo Marinho, exemplos de profissionais do setor da saúde, que com pequenas atitudes, mudaram grandes cenários na minha vida.

Agradeço também aos meus orientadores, Emmanuel Damilano Dutra e Rafael Barros de Souza, pela oportunidade, paciência, empatia e todo conhecimento compartilhado. Tenho certeza que não haveria pessoas melhores para essa minha formação juntamente ao processo vivido durante ela. Enquadro também Wêndeo Costa como meu amigo e primeiro orientador, que me guiou e apoiou nas escolhas durante e ao fim da graduação.

E por último, mas não menos importante agradeço a toda a equipe de laboratório, que jamais tive a experiência de trabalhar num ambiente em que, independente de qualquer coisa, todos estavam sempre dispostos a ajudar um ao outro. E em especial, destaco Rayssa Karla, Walter Pinto e Bárbara Alencar, jamais esquecerei o tempo que vocês dedicaram para me auxiliar compartilhando seus conhecimentos e experiências. Obrigado também, aos integrantes: Ana Andrade, Brener Lima, Fábio Gabriel, Gabriel Acioli, Giselle da Paixão e Túlio Lira, pelos bons momentos, conversas, disponibilidade e ajuda.

Gratidão a todos!

RESUMO

O xilitol é um poliol de alto valor agregado, podendo ser aplicado a diversos setores industriais na produção de diferentes produtos como goma de mascar, cremes dentais e adoçantes. Atualmente a produção de xilitol ocorre por rota química, que se trata de um processo caro devido às severas condições reacionais empregadas. Logo, surge como uma potencial alternativa o uso de rotas biotecnológicas de produção, que compreende a conversão biológica de xilose em xilitol, na qual as condições de processo exigidas são mais brandas, consequentemente menor impacto ambiental. No entanto, a rota biotecnológica ainda apresenta importantes gargalos e desafios que dificultam o escalonamento da produção. Estratégias e tecnologias modernas que têm potencial para melhorar a bioprodução de xilitol incluem a seleção de cepas microbianas capazes de tolerar inibidores encontrados em hidrolisados ácidos de biomassas lignocelulósicas, e cepas com alta taxa de consumo de xilose durante a etapa de fermentação. Portanto, este trabalho teve como objetivo a avaliação da espécie *Meyerozyma caribbica* quanto à resposta fisiológica de tolerância e capacidade de metabolizar xilose na presença do inibidor ácido acético, comum em hidrolisados ácidos de biomassas lignocelulósicas. Para isso, foi feito teste de crescimento em placa contendo diferentes concentrações do inibidor em meio semissintético contendo xilose e/ou glicose. Em sequência, foram feitas as fermentações em meio com semissintético com xilose e glicose na relação de 1:5 a fim de avaliar capacidade de assimilação e produção de xilitol, contendo ácido acético 0,6, 0,8, 1,6 e 3,7 g/L. A partir disso, foi feito um processo alimentado de fermentação por acréscimo de glicose por pulsos a cada 24 horas, e por fim uma avaliação da relação do pH do meio, concentração do inibidor e uma prévia exposição das células a um pH ácido antes da fermentação, visando a produção de xilitol. Foi possível concluir que há relevante impacto do ácido acético no crescimento da levedura. Além disso, a fonte de carbono influencia diretamente na resposta de adaptação ao meio com inibidor, e no desenvolvimento da cepa para a produção de metabólitos de interesse. Na fermentação, o consumo de xilose e a produção de xilitol foram afetados à medida que eleva a concentração de acetato. Além do xilitol, foi observada a produção de etanol no meio. Outra importante característica foi o consumo do ácido acético pela levedura, e também da relação do pH com o potencial de inibição do ácido. Portanto, *M. caribbica*, foi capaz de consumir e transformar os açúcares que são presentes em hidrolisados lignocelulósicos em produtos de alto valor agregado, como o xilitol.

Palavras-chave: Biomassas; Leveduras; Fermentação; Hidrolisados; Xilitol.

ABSTRACT

Xylitol is a polyol with high added value, which can be applied to several industrial sectors in the production of different products such as chewing gum, toothpastes and sweeteners. Currently, the production of xylitol occurs by chemical route, which is an expensive process due to the severe reaction conditions employed. Therefore, the use of biotechnological production routes emerges as a potential alternative, which comprises the biological conversion of xylose into xylitol, in which the required process conditions are milder, consequently less environmental impact. However, the biotechnological route still presents important bottlenecks and challenges that make it difficult to scale up production. Modern strategies and technologies that have the potential to improve xylitol bioproduction include the selection of microbial strains capable of tolerating inhibitors found in acidic hydrolysates of lignocellulosic biomass, and strains with a high rate of xylose consumption during the fermentation step. Therefore, this work aimed to evaluate the species *Meyerozyma caribbica* regarding the physiological response of tolerance and ability to metabolize xylose in the presence of the acetic acid inhibitor, common in acid hydrolysates of lignocellulosic biomass. For this, a growth test was carried out on plates containing different concentrations of the inhibitor in a semi-synthetic medium containing xylose and/or glucose. In sequence, fermentations were carried out in semi-synthetic medium with xylose and glucose in a ratio of 1:5 in order to evaluate the assimilation capacity and production of xylitol, containing acetic acid 0.6, 0.8, 1.6 and 3, 7 g/L. From this, a fed fermentation process was carried out by adding glucose in pulses every 24 hours, and finally an evaluation of the pH ratio of the medium, inhibitor concentration and a previous exposure of the cells to an acidic pH before fermentation, targeting the production of xylitol. It was possible to conclude that there is a relevant impact of acetic acid on yeast growth. In addition, the carbon source directly influences the adaptation response to the medium with inhibitor, and the development of the strain for the production of metabolites of interest. In fermentation, xylose consumption and xylitol production were affected as the acetate concentration increased. In addition to xylitol, ethanol production was observed in the medium. Another important feature was the consumption of acetic acid by the yeast, and also the relationship between pH and acid inhibition potential. Therefore, *M. caribbica* was able to consume and transform the sugars that are present in lignocellulosic hydrolysates into products with high added value, such as xylitol.

Keywords: Biomasses: Yeasts; Fermentation; Hydrolysates; Xylitol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tamanho do Mercado Global de Xilitol por Regiões	15
Figura 2 - Composição do material lignocelulósico.	16
Figura 3 – Ilustração dos componentes da estrutura da celulose, mostrando em verde, as microfibrilas compostas pelas regiões amorfas e cristalinas.....	17
Figura 4 - Esquema estrutura lignina-celulose-hemicelulose com consequente efeito de pré tratamento.	17
Figura 5 – Estrutura química de cada fração formadora da biomassa lignocelulósica.	18
Figura 6 - Estrutura da cana-de-açúcar	19
Figura 7 - Fluxogramas de rotas de produção de xilitol	22
Figura 8 - Representação de rotas de assimilação por leveduras fermentadoras de xilose	24
Figura 9 - Mecanismo de estresse do ácido acético em <i>S. cerevisiae</i>	29
Figura 10 - Avaliação do crescimento celular nas diferentes condições de cultivo. Experimento realizado em meio semissintético com triplicata técnica e diluições seriadas (1/10), em diferentes composições de carboidratos YPX (xilose), YPD (glicose) e YPDx (glicose:xilose) e concentrações de ácido acético. Células cultivadas por 72 h.....	34
Figura 11 - Crescimento em placas com YPDx (1:5) com células tratadas e não tratadas. Legenda: YPDx (1:5) com diluições seriadas (1/10). (A) Grupo controle, (B) grupo com ácidoacético 1,6 g/L. N - células sem tratamento, 2 - células com tratamento em pH 2, 2,5 - células tratadas com pH 2,5	36
Figura 12 – Fermentação com 20g/L YPDx (1:5). Consumo de carboidratos e produção de xilitol. (A) Grupo controle; (B) grupo com ácido acético 0,6 g/L; (C) grupo com ácido acético 0,8 g/L. Xilose (círculo fechado); Glicose (quadrado fechado); Etanol (Losango fechado); Xilitol (triângulo aberto); Ácido acético (círculo aberto)	37
Figura 13 – Fermentação com 80 g/L YPDx (1:5). Consumo de carboidratos e produção de xilitol. (A) Grupo controle; (B) grupo com ácido acético 1,6 g/L; (C) grupo com ácido acético 3,7 g/L. Xilose (círculo fechado); Glicose (quadrado fechado); Etanol (losango fechado); Xilitol (triângulo aberto); Ácido acético (círculo aberto)	40
Figura 14 – Perfil fermentativo da levedura <i>M. caribbica</i> em meio com glicose e xilose na proporção 1:5 como fonte de carbono à 80 g/L. Xilose (círculo fechado); glicose (quadrado fechado); etanol (losango fechado) e xilitol (triângulo aberto). (A) Meio de referência; (B) Meio YPDx com pulso de glicose à cada 24h; (C) Meio YPDx com 1,6 g/L de ácido acético e (D) Meio YPDx com 1,6 g/L de ácido acético e pulsos de glicose à cada 24 h.....	41
Figura 15 – Perfil fermentativo da levedura <i>M. caribbica</i> em meio com glicose e xilose na	

proporção 1:5 como fonte de carbono à 80 g/L. Xilose (círculo fechado); glicose (quadrado fechado); etanol (losango fechado) e xilitol (triângulo aberto).
(A) Meio YPDX com 1,6 g/L de ácido acético e pulso de glicose à cada 24 h
(B) Meio YPDX com 1,6 g/L de ácido acético e pulso de glicose fermentado com células pré-tratadas em pH ácido e pH do meio ajustado.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais diferenças entre a celulose e hemicelulose	18
Tabela 2 - Componentes do bagaço da cana-de-açúcar in natura	19
Tabela 3 - Composição lignocelulósica da biomassa bagaço de cana-de-açúcar.....	20
Tabela 4 - Produção de xilitol por diferentes espécies de leveduras.....	26
Tabela 5 - Principais inibidores encontrados em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.....	28
Tabela 6 -Valores de rendimento e etanol e xilitol das fermentações com 20 e 80 g/L de glicose+xilose YPDX (1:5)	40
Tabela 7 – Parâmetros fermentativos do ensaio com pulsos de glicose.....	43
Tabela 8 - Parâmetros fermentativos do ensaio com pulsos de glicose + tratamento ácido em meio com glicose e xilose na proporção 1:5 como fonte de carbono à 80 g/L contentodo ácido acético 1,6 g/L. O grupo tratamento teve células previamente expostas á meio com pH 2,0 e pHdo meio de fermentação ajustado para 4,0. Dados do grupo sem tratamento até o 4º dia de fermentação, pois no 5º dia o xilitol já é consumido consideravelmente).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DO - Densidade óptica

g/L - Gramas por Litro

NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

nm - Nanômetros

pH - Potencial hidrogeniônico

RPM - Rotação por minuto

YPD - Yeast Peptone Dextrose/Extrato de Levedura Dextrose

YPDX - Yeast Peptone Dextrose Xylose/Extrato de Levedura Dextrose com Xilose

YPDX (1:5) - Yeast Peptone Dextrose Xylose/Extrato de Levedura Dextrose com Xilose na proporção de 1 de glicose para 5 de xilose

YPX - Yeast Peptone Xylose/Extrato de Levedura com Xilose

SUMÁRIO

1 ITNRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Mercado e produção de xilitol	15
3.2 Biomassa lignocelulósica	16
3.3 Cana-de-açúcar	19
3.4 Pré-tratamento e hidrólise da biomassa	20
3.5 Rotas de produção de xilitol	21
3.6 Bioquímica da produção de xilitol	24
3.7 Micro-organismos	25
3.8 Inibidores da fermentação do hidrolisado hemicelulósico	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Micro-organismos e meio de cultura	31
4.2 Ensaios de crescimento	31
4.3 Avaliação do tratamento ácido no crescimento	31
4.4 Ensaios de fermentação	32
4.5 Ensaios de fermentação com pulsos de glicose	32
4.6 Avaliação da correlação entre os fatores que interferem na produção de xilitol durante a fermentação	32
4.7 Análises de dados	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Avaliação do crescimento de <i>M. caribbica</i> na presença de ácido acético	34
5.2 Avaliação da capacidade de produção de xilitol na presença de ácido acético	37
6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A – Artigo científico - co-autoria - <i>Meyerozyma caribbica</i>	58

1. INTRODUÇÃO

A produção de xilitol atualmente vem tentando se enquadrar nas estratégias que diminuam a capacidade de impacto ambiental. As questões ambientais e alterações climáticas, além da limitação de recursos, estão levando a mudanças globais nos sistemas de produção. Visto isso, a Organização das Nações Unidas (ONU) fez o lançamento da Agenda 2030, que tem como alvo o apelo pela proteção e equilíbrio ambiental e da sociedade, a partir da criação dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (ONU, 2015). Dentre as ODS, as indústrias estão inclusas, buscando mudar e adaptar seu funcionamento para processos sustentáveis, a fim de uma produção com respeito ao meio ambiente, solicitada pela ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura) (ONU, 2015). Portanto, é de grande relevância o aprimoramento de processos biotecnológicos que substituam os processos químicos usados atualmente em grande escala, uma vez que possuem potencial de serem sistemas de produção mais sustentáveis (Yamakawa; Qin; Mussatto, 2018).

Por isso, a biomassa lignocelulósica se destaca como importante fonte de matéria-prima renovável e alto potencial de uso na indústria (Yaashikaa et al., 2023). No Brasil, a cana-de-açúcar é muito usada na produção de eletricidade, açúcar e biocombustível (Dos Santos et al. 2016). O primeiro levantamento, da safra 2023/2024, resultou em uma produção de 637 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (CONAB, 2023). O processamento dessa biomassa rende grandes volumes de bagaço cana-de-açúcar, cerca de 250 kg/t de cana (Rodrigues, 2011; Dos Santos et al. 2016; Oliveira, 2016). Esses resíduos podem ser hidrolisados para obtenção de outros produtos por meio da conversão microbiana desse hidrolisado (Hoang et al., 2020). A partir da biomassa lignocelulósica é possível obter o hidrolisado rico em pentoses, por meio de um tratamento ácido diluído. Na hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica ocorre a liberação de açúcares fermentescíveis como a glicose e xilose. Esses açúcares são utilizados por micro-organismos para a produção de biocombustíveis e produtos de valor agregado, como o etanol e o xilitol, respectivamente (Felipe Hernández-Pérez et al., 2019).

Nesse contexto, o xilitol é um dos produtos que tem recebido importante atenção para produção por via biotecnológica por ser uma biomolécula de alto valor agregado com muitas aplicações em diversos setores industriais. Se estima que a produção global anual de xilitol já seja maior que 200 mil toneladas (Dasgupta, 2017; Felipe Hernández-Pérez et al., 2019; GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2019). Porém, a produção do xilitol por rotas biotecnológicas pode ser limitada pela presença de compostos inibidores encontrados nos hidrolisados ácidos lignocelulósicos (Felipe Hernández-Pérez et al., 2019). Na hidrólise ácida

diluída ocorre a formação de inibidores como 5-HMF, furfural e ácido acético podem interferir severamente na produção de xilitol pelos dos micro-organismos, principalmente devido a mudança do pH intracelular, perda da integridade da membrana e geração de estresse oxidativo (Almeida et al., 2007; Caspeta; Castillo; Nielsen, 2015). Dentre os inibidores, o ácido acético tem sido relatada como um severo limitador da produção de xilitol (Tadioto, et al. 2022).

Neste sentido, é de suma importância a busca por micro-organismos que tenha a capacidade de produzir xilitol e tolerar as condições adversas do processo industrial. As espécies do gênero *Meyerozyma*, como *M. guilliermondii* e *M. caribbica*, vêm mostrando relatos de eficiência e adaptação a ambientes estressantes, e capacidade de conversão da xilose em xilitol (Santos et al., 2020). Recentemente, nosso grupo de pesquisa tem estudado a levedura selvagem *Meyerozyma caribbica* URM8365 isolada do solo da produção de cana de açúcar e em um trabalho recente do grupo esta levedura apresentou um interessante potencial para a produção de produtos de valor agregado como o xilitol. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial fermentativo da levedura *M. caribbica* URM8365 na produção de xilitol em resposta a presença de ácido acético no meio, um potente inibidor encontrado em altas concentrações no meio utilizado para produção do bioproduto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial fermentativo da levedura *Meyerozyma caribbica* URM8365 na produção de xilitol e a relação com sua resposta fisiológica e adaptação em meios contendo ácido acético.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a influência do inibidor ácido acético no crescimento da levedura *M. caribbica* URM8365;

Determinar a produtividade e o rendimento de xilitol da levedura *M. caribbica* URM8365 na presença de ácido acético e avaliar a melhor condição de fermentação em meio semissintético.

Avaliar relação do ácido acético com diferentes parâmetros da fermentação durante o processo de consumo de xilose e produção de xilitol pela *M. caribbica* URM8365.

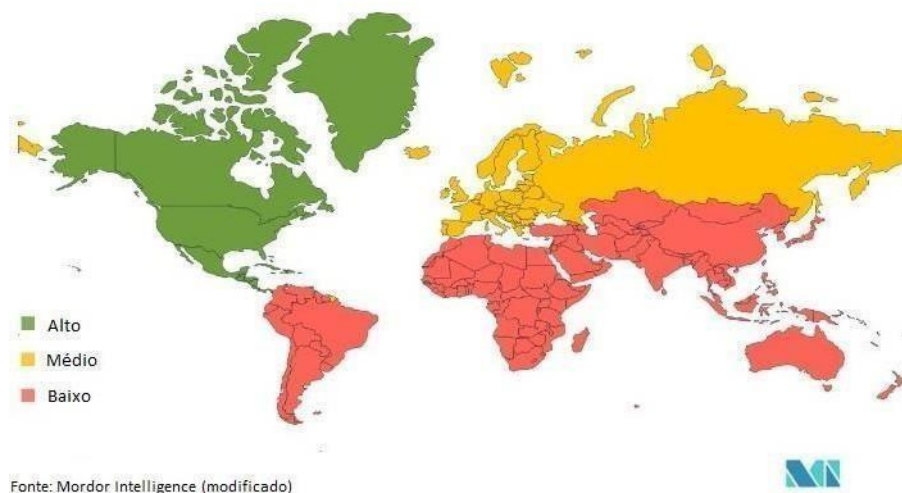
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mercado e produção de Xilitol

A xilose é um açúcar de cinco carbonos (pentose) encontrado na composição da biomassa lignocelulósica, que pode ser usado como matéria-prima na produção de diversos produtos biotecnológicos, como etanol, propanodiol, ácido glicólico e xilitol. O xilitol é um poliol de grande interesse nas indústrias farmacêutica, odontológica e alimentícia, devido às suas propriedades anticariogênicas e edulcorantes, além de outras características como alta solubilidade e baixo índice glicêmico (De Albuquerque et al., 2014; Trichez et al., 2019).

Impulsionado pela crescente consciência em saúde, aumento populacional e busca crescente por produtos com menos açúcar para melhorar o estilo de vida, o mercado global de xilitol atingiu um valor de US\$ 976,12 milhões em 2022. Com aumento da necessidade de maiores demandas de xilitol, a projeção para o mercado de xilitol de 2023 para 2028 é que seja de US\$ 1,345,87 milhões (EXPERT MARKET RESEARCH, 2018). As principais regiões responsáveis pelo mercado de xilitol são América do Norte, América Latina, Ásia-Pacífico, África, Oriente Médio e Europa, sendo o último representando a maior indústria do produto (Figura 1) (MORDOR INTELLIGENCE), sendo a Du Pont, Roquette Frères SA, Cargill, Incorporated, Ingredion Incorporated, ZuChem, Inc. Etc as principais e mais relevantes empresas fabricantes de xilitol são: (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2019).

Figura 1. Tamanho do Mercado Global de Xilitol por Regiões.



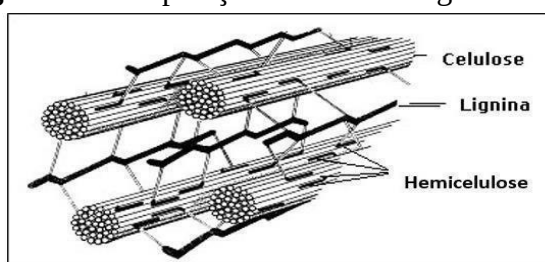
Atualmente, para os modelos existentes de produção de xilitol, a indústria utiliza hidrolisado da biomassa lignocelulósica, uma vez que, a depender do tipo de biomassa, pode conter um alto teor de xilose, monossacarídeo de 5 carbonos mediador da produção de xilitol. Para que se entenda sobre essa produção, é necessário saber mais sobre a matéria prima do xilitol.

3.2 Biomassa lignocelulósica

Os subprodutos lignocelulósicos representam os maiores recursos renováveis do mundo, sendo produzidos milhões de toneladas no ano por atividade agroindustrial. As frações constituintes da estrutura da biomassa lignocelulósica são, principalmente, celulose, hemicelulose e lignina, ressaltando que essas porções variam de acordo com cada fonte e propriedades físicas das biomassas; esses componentes podem ser utilizados como substrato para obtenção de produtos de alto valor agregado, como xilitol (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2020).

Os polímeros de celulose e hemicelulose são firmemente ligados à lignina, através de interações de hidrogênio e covalentes, tornando a estrutura resistente à despolimerização (Figura 2). O nível de cristalinidade da celulose, proteção por lignina, heterogeneidade das partículas da biomassa, área de superfície acessível, contribuem para esta resistência, acarretando em diferentes graus de digestão (Mosier et al., 2005).

Figura 2 - Composição do material lignocelulósico

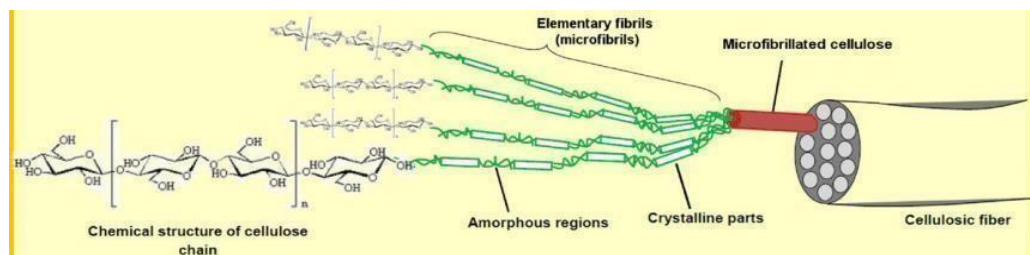


Fonte: SHLESER, 1994 (modificado).

A celulose é um homopolímero linear formado por unidades repetitivas de centenas a milhares de D-glicose, ligadas por ligações β - 1,4 glicosídicas; os dímeros de glicose em repetições são chamados de celobiose (HU e RAGAUSKAS, 2012). Essa estrutura resulta na formação potencial de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, que tornam a celulose nativa altamente cristalina, insolúvel e resistente ao

ataque enzimático. As regiões altamente cristalinas da celulose na parede celular da planta são separadas por regiões amorfas menos ordenadas (Saini et al., 2015). Essa recalcitrância é um limitador na obtenção do carboidrato glicose, pois quanto maior a cristalinidade, maior o grau de compactação das microfibrilas formadoras da estrutura (Figura 3), impedindo a chegada de agentes a matriz celulósica, como ácidos e celulasas, compostos estes, que realizam hidrólise desse material.

Figura 3 - Ilustração dos componentes da estrutura da celulose, mostrando em verde, as microfibrilas compostas pelas regiões amorfas e cristalinas.

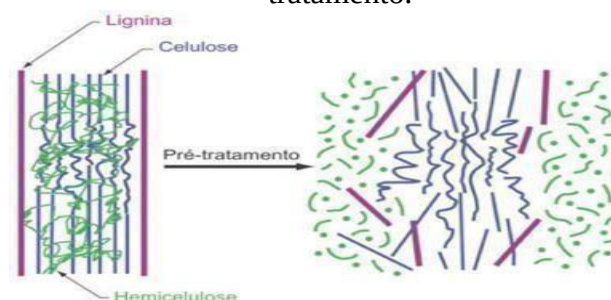


Fonte: Lavoine et al. (2012).

Já a hemicelulose é polissacarídeo constituído por diferentes açúcares, os principais são as hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses, (xilose e arabinose). Dentre as pentoses, a xilose é o carbono que representa cerca de 30% da estrutura da biomassa lignocelulósica, o que pode implicar em potencial bioenergético, utilizado como um dos substratos para obtenção de produtos de alto valor agregado, como o xilitol (Ramos, 2003; Pu et al., 2008; PETRECHEN, 2017).

Ao sofrerem processos de hidrólises, são liberados os monossacarídeos constituintes da estrutura hemicelulósica (Hu; Ragauskas, 2012). Este heteropolímero apresenta toda sua estrutura de forma amorfa, polímeros de cadeia lateral curta e afinidade hidrofílica, facilitando a liberação dos monômeros no meio reacional (Figura 4), apresentando vantagem na remoção dos carboidratos da estrutura (Santos et al., 2012).

Figura 4 - Esquema estrutura lignina-celulose-hemicelulose com consequente efeito de pré-tratamento.



Fonte: (Santos et al., 2012).

Portanto, pela diferença em sua conformação, é possível visualizar algumas das diferenças entre a celulose e a hemicelulose, o que influencia diretamente no processamento destas biomassas lignocelulósicas (Tabela 1).

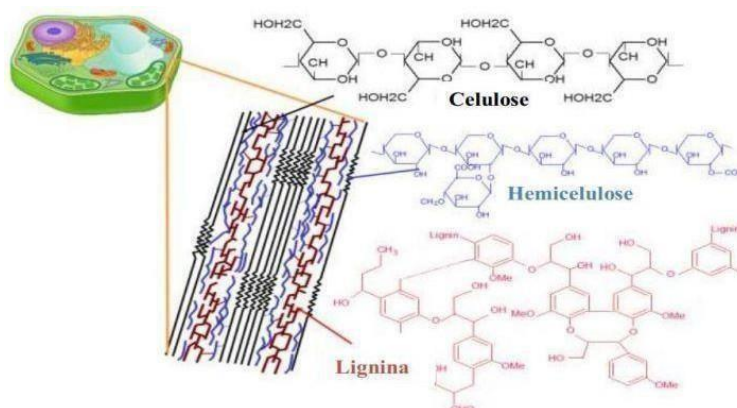
Tabela 1 - Principais diferenças entre a celulose e hemicelulose.

CELULOSE	HEMICELULOSE
FOORMADAS POR UNIDADES DE GLICOSE LIGADAS ENTRE SI (HOMOPOLISSACARÍDICA)	Formada por várias unidades de pentoses e hexoses ligadas entre si (Heteropolissacarídica)
ALTO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO (10.000 A 15.000)	Baixo grau de polimerização (50 a 300)
FORMA ARRANJO FIBROSO	Não formam arranjo fibroso
APRESENTA REGIÕES CRISTALINAS E AMORFAS	Apresentam somente regiões amorfas
É ATACADA LENTAMENTE POR ÁCIDO INORGÂNICO DILUÍDO A QUENTE	São atacadas rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente
É INSOLÚVEL EM ÁLCALIS	São solúveis em álcalis

Fonte: Adaptado Fengel e Wegener, (1989).

A biomassa lignocelulósica é composta também de lignina, a macromolécula mais encontrada, depois da glicose (Santos et al., 2012). Formada por três unidades diferentes de fenilpropanos: álcoois p-coumarílico, coniferílico e sinapílico (Fengel e Wegener, 1989; Dias, 2014). A lignina é estruturada de forma heterogênea, com estruturas globulares e regiões amorfas, variando a sua composição/organização entre espécies, de acordo com a relação entre a celulose e hemicelulose (Figura 5).

Figura 5 – Estrutura química de cada fração formadora da biomassa lignocelulósica



Fonte: Zampieri, 2011.

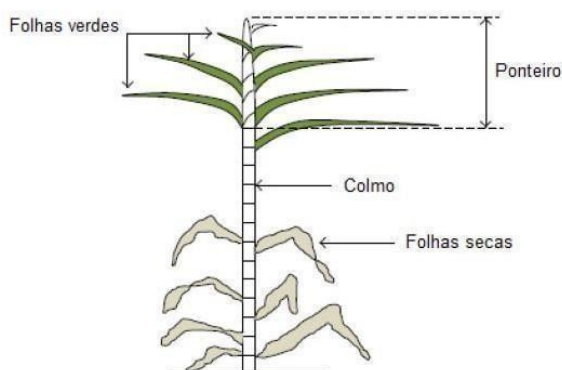
A lignina age como um fator limitante nos processos de hidrólise das biomassas lignocelulósicas, atuando como barreira física para enzimas e micro-organismos que possuem

finalidade de hidrolisar as frações hemicelulósicas e celulósicas das biomassas, além da diminuição dessas enzimas para reação, pois a lignina captura as mesmas, dificultando a recuperação dessas enzimas após o processo de hidrólise (Lu et al., 2012). Por isto, é uma das principais responsáveis pela adição de pré-tratamentos das biomassas lignocelulósicas, para que facilite o encontro de agentes hidrolíticos a matriz celulósica.

3.3 Cana-de-açúcar

Saccharum officinarum, comumente chamada como cana-de-açúcar, foi introduzida no Brasil pelos portugueses, sendo hoje muito cultivada no país, nas regiões tropicais e subtropicais (Rosillo-Calle et al., 2005). Ocorreram diversas modificações fisiológicas e morfológicas ao longo do tempo, gerando uma diversidade de espécies, diferindo entre elas, principalmente, o conteúdo de açúcares e fibras. Sua estrutura esta dividida em partes aéreas (folhas, colmo e flores) e subterrâneas (raízes e rizomas) (Figura 6) (Triana et al., 1990).

Figura 6 - Estrutura da cana-de-açúcar



Fonte: Canilha et al., 2012 (modificado).

Ela é composta predominantemente por água e açúcares, concentrados no colmo. Sua composição química é muito variável em relação à quantidade de seus elementos (Tabela 2) (Schlittler, 2006).

Tabela 2 - Componentes do bagaço da cana-de-açúcar in natura.

Componentes (%)	In natura
Celobiose	3,34
Glicose	46,2
Hidroximetilfurfural	0,3
Ácido fórmico	0,56

Xilose	24,21
Arabinose	1,7
Furfural	1,25
Ácido glucurônico	1,09
Ácido acético	2,64
Lignina solúvel	2,61
Lignina insolúvel	23,66
Cinzas	1,61
Extrativos	-

Fonte: Canilha et al., 2007 (modificado).

A própria indústria sucroalcooleira reutiliza os resíduos gerados a partir do uso dessa cana, como o bagaço, como fonte para gerar energia e calor (Dos Santos et al. 2016). Sabendo disto, tem sido objetivo de pesquisas, a utilização deste resíduo agrícola como fonte de carbono para processos fermentativos para obtenção de novos e potenciais bioprodutos de alto valor agregado, como biocombustíveis e xilitol, através de preparo de hidrolisados celulósico.

A composição é de suma importância, pois são as características relevantes na escolha do tipo de biomassa lignocelulósica que será utilizada nos processos fermentativos, inferindo diretamente no seu potencial para obtenção de bioprodutos (Tabela 3).

Tabela 3 - Composição lignocelulósica da biomassa bagaço de cana-de-açúcar

Compostos (%)	Bagaço de cana-de-açúcar (BIZZO et al., 2014)
Celulose	35,3
Hemicelulose	24,0
Lignina	22,9

Fontes: Adaptado Bizzo et al. (2014).

3.4 Pré-tratamento e hidrólise da biomassa

O pré-tratamento da biomassa é uma etapa realizada para que se facilite o acesso de enzimas e micro-organismos na matriz celulósica, modificando a estrutura da biomassa através da quebra da estrutura recalcitrante da lignocelulose, liberando açúcares redutores, como a glicose e a xilose (Figura 4) (Zhang; Yuan; Cheng, 2017). Há diferentes tipos de tratamentos para desconstruir material lignocelulósico para obtenção de xilose, são eles: hidrólise ácida ou enzimática, tratamentos hidrotérmicos ou ruptura mecânica (Mussato, 2016).

A hidrólise com ácido diluído é um dos métodos mais usados para liberar xilose da biomassa lignocelulósica para produção de xilitol, por ser um método eficiente na ruptura da hemicelulose, diminuindo a cristalinidade da biomassa e as ligações entre a lignina e

carboidratos, tornando estes mais facilmente acessíveis (Alvira et al., 2010; Agbor et al., 2011; Mussato, 2016).

O pré-tratamento com ácido diluído despolimeriza principalmente a fração hemicelulósica de biomassas lignocelulósicas, liberando açúcares como xilose, arabinose, glicose, e compostos não-açúcares como ácido acético. Além disso, esse processo acarreta na formação de 5-hidroximetilfurfural e furfural, produtos da desidratação de pentoses e hexoses.

A celulose e a lignina também são degradadas, gerando glicose e compostos fenólicos, respectivamente (Mussato; Roberto, 2004). Após a hidrólise, há formação de uma fração líquida, conhecida como hidrolisado hemicelulósico, que é rico em xilose e pode ser utilizado na produção de xilitol a partir de rotas químicas ou biotecnológicas.

Mesmo com sua alta eficiência na liberação de xilose da hemicelulose, o uso de ácidos traz algumas desvantagens, como corrosão nos equipamentos, reduzindo a vida útil do mesmo e a formação dos compostos não-açúcares, que, dependendo da rota em que esse hidrolisado seja utilizado, pode comprometer o processo, como é o caso da fermentação microbológica. Devido a isto, o pré-tratamento por hidrotermia tem sido considerado uma opção interessante, pois utiliza apenas água em altas temperaturas e não requer adição de ácidos, sendo também uma alternativa mais ecológica (Carvalho et al., 2016).

É importante que essa etapa apresente baixo custo de operação, recuperação da maioria dos compostos lignocelulósicos, além de tentar evitar produção de inibidores da fermentação (Chandra et al., 2007).

3.5 Rotas de produção de xilitol

Na indústria, o xilitol é atualmente produzido por hidrogenação química de xilose purificada obtida a partir de hidrolisados hemicelulósicos. O processo consiste nas seguintes etapas: hidrólise da biomassa lignocelulósica, purificação da xilose da fração hemicelulósica, uma vez que esse hidrolisado é um meio complexo e pode prejudicar a purificação do xilitol na etapa subsequente, recuperação, purificação por cromatografia e cristalização do xilitol em baixas temperaturas, que será seco e embalado para comercialização (Martínez et al., 2015; Arcaño et al., 2020; Queiroz et al., 2022).

Em outras palavras, em decorrência das várias etapas de purificação, uma solução de xilose ultrapura é submetida a uma reação de hidronegação catalítica em alta temperatura (140-200 °C) e pressão (acima de 50 atm), utilizando como catalisador o níquel metálico (Dasgupta et al., 2017).

A síntese química do xilitol é uma produção não ecológica e usa muitas etapas de

purificação tanto no início e fim do processo que aumentam o gasto de energia e tempo de produção, elevando o valor do produto final. Esse preço elevado do xilitol acaba comprometendo o uso desta molécula para outras aplicações industriais. Na busca de métodos de produção eficaz, sustentáveis e de menor custo, vários centros de pesquisas no Brasil estão usando rotas biotecnológicas como alternativa para produção de xilitol (Figura 7) (Mussatto e Roberto, 2002; Arcaño et al., 2020; Queiroz et al., 2022).

Diferente da rota química, a rota biotecnológica não requer as etapas extensas para purificação da xilose, uma vez que é empregada a etapa de conversão microbiana, a qual é um processo biologicamente seletivo (Felipe Hernández-Pérez et al., 2019). As rotas biotecnológicas para produção de xilitol podem consistir nas etapas de Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica; Concentração e desintoxicação do hidrolisado hemicelulósico; Bioconversão de xilose em xilitol; Purificação e recuperação de xilitol (Figura 7) (Felipe Hernández-Pérez et al., 2019).

Figura 7. Fluxogramas de rotas de produção de xilitol



Fonte: Adaptado MUSSATTO e ROBERTO, 2002.

São diversas as vantagens da produção biotecnológica quando comparado ao processo químico. O uso de resíduos agroindustriais de baixo custo, como as biomassas lignocelulósicas (entre eles o bagaço de cana, palha de arroz e de trigo e sobras de eucalipto, por exemplo) servem de matéria-prima para os processos de produção, que junto a estratégias de fermentação microbiana, representam uma alternativa interessante para a produção de xilitol de menor custo (De Albuquerque et al., 2014).

Esse processo dispensa a purificação inicial da xilose, pois na fermentação de hidrolisados hemicelulósicos, por uso de micro-organismos específicos, ocorre a conversão da xilose em xilitol, com bons rendimentos do produto, além da vantagem de dispensar o uso de catalisadores

metálicos. Essa fermentação pode atuar em condições mais amenas, diminuir gastos de produção, podendo atingir rendimentos mais elevados (Mussatto e Roberto, 2002; Mathew, et al. 2018).

Além disso, a união da produção de xilitol em uma biorrefinaria pode elevar a viabilidade econômica do processo, permitindo produção em larga escala do produto, potencializando a capacidade de produção sustentável, uma vez que o gasto energético desse processo pode ser compensado pela cogeração de energia a partir da combustão dos resíduos sólidos gerados. (Yamakawa et al., 2020). O objetivo de uma biorrefinaria sustentável é alcançar o máximo de uso de uma biomassa na produção de energia e produtos de alto valor agregado, que podem auxiliar no aumento do crescimento da economia de base biológica (Dragone., 2020).

Este conceito se enquadra perfeitamente na Agenda 2030, programa lançado pela Organização das Nações Unidas (ONU), que tem como alvo o apelo pela proteção e equilíbrio ambiental e da sociedade, a partir da criação dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) (ONU, 2015). Dentre as ODS, as indústrias estão inclusas, buscando mudar e adaptar seu funcionamento para processos sustentáveis, a fim de uma produção com respeito ao meio ambiente, solicitada pela ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura) (ONU 2015).

Além disso, avaliações técnico-econômicas e ambientais, na perspectiva de potencializar melhorias na bioprodução de xilitol, vêm sendo levantadas, como a proposta de desenvolvimento de cepas robustas e metodologias, que promovam melhorar a competitividade da bioprodução de xilitol, uma vez que atualmente não é tão eficiente quanto a rota química. Essas avaliações são importantes também na indicação de etapas potenciais, que requerem atenção, bem como fornecer uma estimativa sobre o investimento adequado, como custos, lucro, balanço de massa e energia do processo, impactos ambientais, entre outros parâmetros relevantes para aplicação industrial (Martínez-Ruano., 2018).

Estudos que visam melhoramento na eficiência e custos do processo vêm avançando. O uso de cepas por evolução adaptativa, modificação genética por engenharia genética e na cadeia de processamento (etapas upstrea, fermentação e downstream) têm trazido inovações para que a rota biotecnológica se torne cada vez mais uma realidade nos sistemas de produção de xilitol, assim como de outros bioprodutos. Nesse contexto, esses estudos técnico-econômicos têm considerado diferentes cenários de biorrefinaria para produção de xilitol utilizando diferentes subprodutos e resíduos agroindustriais como matéria-prima, como bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho entre outros (Queiroz et al., 2022).

3.6 Bioquímica da produção de xilitol

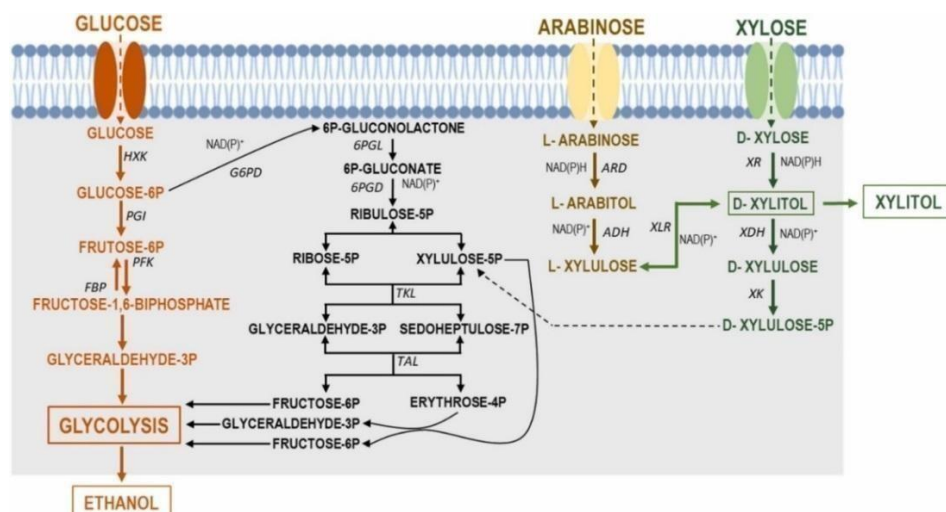
Há micro-organismos selvagens, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, que conseguem converter xilose em xilitol. Atualmente, as leveduras têm sido relatadas como as produtoras de xilitol mais eficientes (De Albuquerque et al. 2014; PAL; Mondal; Sahoo, 2016).

Nas leveduras o metabolismo da xilose inicia pela redução do açúcar pela enzima xilose redutase (XR), que depende de cofatores NADPH/NADH, levando a formação de xilitol. A literatura relata uma diversidade de XR que podem aumentar e/ou facilitar a assimilação da xilose pela levedura e consequentemente sua conversão em xilitol e/ou etanol (Serpa, 2016; Mathew, et al. 2018).

O xilitol produzido pode ser acumulado ou convertido em xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH) dependente da coenzima NAD⁺. Quando os cofatores citados se encontram em desequilíbrio, acarretará na excreção de xilitol (Mathew, et al. 2018). A xilulose é fosforilada em xilulose-5-fosfato e convertida em intermediários glicolíticos, como gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) e frutose-6-fosfato (F6P), através da via fosfato pentose (PPP) (Figura 8).

Com o objetivo de propiciar acúmulo de xilitol e evitar produção de outros metabólitos, é importante a seleção das cepas e de condições ideais de processamento para obter altos rendimentos em xilitol durante a fermentação, impactando fortemente na economia do processo e viabilidade em larga escala (Mathew, et al. 2018; Queiroz et al., 2022).

Figura 8. Representação de rotas de assimilação por leveduras fermentadoras de xilose.



Fonte: (Queiroz et al., 2022)

Para isso, é de grande importância compreender as variáveis presentes durante o processo

da fermentação, assim como garantir o estabelecimento das condições ideais de pH, níveis de oxigênio, temperatura, suplementação de nutrientes, concentração celular, dentre outras variantes que são capazes de otimizar a produção máxima de xilitol (Mathew, et al. 2018). A disponibilidade de oxigênio mensurado por meio do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, é de extrema relevância, pois influencia nas atividades das principais enzimas do metabolismo da xilose, que são XR e XDH, regulando o metabolismo podendo desviar o desempenho microbiano para o produto ou crescimento celular (Pal; Mondal; Sahoo, 2016; de Arruda et al., 2017; Hernández-pérez et al., 2020).

Tem sido observado que em leveduras, a baixa aeração leva ao desequilíbrio redox entre as atividades de XR e XDH devido à redução da taxa de via oxidativa, resultando no acúmulo de xilitol. No entanto, sob condições de alta aeração, o NADH é oxidado a NAD⁺, o que favorece a oxidação do xilitol a xilulose devido ao alto teor de NAD⁺/NADH, diminuindo o acúmulo de xilitol (Pal; Mondal; Sahoo, 2016).

Além disso, sabe-se que a repressão catabólica é um dos fatores que afetam a assimilação da xilose, influenciando diretamente na produção de enzimas envolvidas na captação de outras fontes de carbono, as quais podem ser reprimidas na presença de açúcares hexose, principalmente glicose, por ser o monossacarídeo de consumo primário na maioria dos micro-organismos (Pal; Mondal; Sahoo, 2016). Por isso a importância das vias metabólicas, disponibilidade de cofatores, transporte de xilose em nível celular/molecular e regular sua formação dentro das células é de suma importância no processo de fermentação, pois influenciam na produção microbiana de xilitol e consequentemente na conversão de xilose em xilitol.

3.7 Micro-organismos

É possível a aplicação de leveduras como catalisadores em processos biotecnológicos a partir do uso de biomassa lignocelulósica como matéria-prima graças à presença e diversidade de açúcares em sua composição. Leveduras conhecidas e usadas convencionalmente, como *Saccharomyces cerevisiae*, são muito utilizadas em processos biológicos com sua alta eficiência em assimilação de glicose. Contudo, a busca por “leveduras não-*Saccharomyces*” (Kurtzman, 2011) estão sendo estudadas para aplicação em diferentes setores industriais e capazes de assimilar diferentes fontes de carbono, uma vez que *S. cerevisiae* não possui eficiência para consumir xilose, havendo esforço crescente para descobrir e construir novas linhagens de leveduras capazes de assimilar esta pentose, assim como robustez para tolerar

ambiente inóspito de processamentos (Bergmann et al., 2019).

Além da capacidade de assimilação de pentose, é muito importante que essas leveduras sejam também capazes de suportar ambientes estressantes, como a presença de ácido acético, muito encontrado em hidrolisados lignocelulósicos, que afetam o processo de fermentação.

Dentre algumas espécies de leveduras não-Saccharomyces descritas na literatura, que são naturalmente capazes de consumir a xilose e que podem ser ótimos modelos de estudo para tolerância aos inibidores de hidrolisado, destacam-se as do gênero *Meyerozyma*, as quais vêm sendo avaliadas para testes biotecnológicos (Bergmann et al., 2019).

Além disso, um trabalho recém publicado do grupo (Alencar et al., 2023) (Anexo A) mostra a capacidade de prospecção de *M. caribbica* na produção de biocompostos a partir de substratos industriais. Nas linhagens do gênero *Meyerozyma* é possível ver a capacidade de assimilar xilose dos hidrolisados lignocelulósicos além de serem capazes de produzir xilitol (Tabela 4). Além de manterem produção mesmo na presença de inibidores (Martini et al. 2016), foi relatada como produtora de etanol quando adaptada a presença de 3 g/L de ácido acético, elevando a produção (Moremi et al., 2020).

Tabela 4. Produção de xilitol por diferentes espécies de leveduras

LEVEDURAS	CONC. FINAL DE XILITOL (G/L)	RENDIMENTO XILITOL (G/G)	PRODUTIVIDADE [G/(L.H)]
<i>M. CARIBBICA</i> JA9	11,37 ± 2,60	0,54 ± 0,11	0,10 ± 0,03
<i>SPATHASPORA</i> SP. JA1	22,62 ± 6,33	0,75 ± 0,01	0,20 ± 0,06
<i>S. PASSALIDARUM</i>	0,19 ± 0,06	0,01 ± 0,01	0,003 ± 0
<i>M. GUILLIERMONDII</i>	8,25 ± 1,92	0,44 ± 0,02	0,063 ± 0,01
<i>C. TROPICALIS</i>	-	0,45	-
<i>C. GUILLIERMONDII</i> FT 120037	50,5	0,81	0,6

Fonte: Adaptado de (Carneiro, 2018; Trichez et al., 2019).

Meyerozyma caribbica é uma espécie do grupo, menos estudada, que possui a capacidade natural de fermentar pentoses e hexoses, o que pode facilitar sua utilização biotecnológica nas indústrias de alimentos e saúde, assim como em indústrias de biomassa em biorrefinarias (Bergmann et al., 2019). A espécie foi relatada como capaz de crescer vigorosamente em presença de glicose ou xilose como fonte de carbono, havendo influência dos níveis desses açúcares e de inibidores no meio, como o ácido acético, quando avaliado a fermentação em hidrolisado de biomassa lignocelulósica (Tadioto et al., 2022). Trichez et al. (2019) demonstrou que xilitol foi o principal produto obtido das leveduras isoladas em seu trabalho, sendo a cepa

M. caribbica JA9 uma delas, alcançando uma produção de 17,33 g/L e um rendimento de 0.44 (g/g) de xilitol a partir de hidrolisado de biomassa de cana-de-açúcar; além de também alcançar uma produção de 5,69 g/L de etanol, mostrando o potencial de bioprodução desta levedura.

Análises genômicas comparativas mostraram que as rotas metabólicas da xilose são conservadas entre as leveduras produtoras de xilitol, como revelado por Trichez et al., (2019) em *Spathaspora* sp. JA1, *M. caribbica* JA9 e *Meyerozyma guilliermondii*. Leveduras produtoras de xilitol apresentaram xilose redutase estritamente dependente de NADPH enquanto que o xilitol-desidrogenase dependente de NAD⁺. Este desequilíbrio de cofatores favorece o alto rendimento de xilitol nos processos de fermentação. Trichez et al., (2019) também avaliou a quanto a capacidade de *M.caribbica* JA9 de destoxificação do meio em relação aos inibidores encontrados em hidrolisados lignocelulósicos, sendo eles o HMF e Furfural a qual foram reduzidos a partir dos cofatores NADH e NADPH, influenciando, portanto, na rota de produção de xilitol. Além disso, relatou que os furaldeídos provavelmente não foram os principais inibidores durante a fermentação dos hidrolisados.

Já o ácido acético não é tão esclarecido quanto o seu efeito no metabolismo em leveduras produtoras de xilitol, porém a menor produtividade de xilitol pode estar relacionada com o aumento da atividade enzimática na presença deste ácido, que apesar de promover a formação do xilitol por aumento da atividade de xilose redutase, é consumido pelo mesmo aumento da xilose desidrogenase (Lima, 2002).

Portanto, uma vez que *M. Caribbica* possui capacidade de assimilar as duas principais fontes de carbono encontradas nas matérias-primas utilizadas por biorrefinarias, e os produtos de sua fermentação possuem alto valor agregado e desejados pela bioindústria e sua robustez em ambiente com inibidores, tornam significativos os estudos com esse micro-organismo.

3.8 Inibidores da fermentação do hidrolisado hemicelulósico

A biomassa pode sofrer perda de parte de seus açúcares durante o processo de pré-tratamento e hidrólise, levando à formação e liberação de inibidores. Os compostos não-açúcares agem como inibidores do metabolismo celular, interferindo o desempenho dos micro-organismos durante a fermentação, por isso há necessidade de uma etapa de desintoxicação do hidrolisado hemicelulósico antes de seguir para a próxima rota, a fim de reduzir/eliminar a concentração desses compostos, encarecendo o processo (Meighan, 2016; Queiroz et al., 2022).

Existem três classes de inibidores comumente formados durante a pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, que são os ácidos orgânicos, compostos furaldeídos e compostos

fenólicos.

Nos ácidos orgânicos, o principal composto inibitório encontrado em biomassa de cana-de-açúcar é o ácido acético, afetando o pH intracelular e atuando sobre a fase lag do metabolismo celular (Almeida, 2007). Outros inibidores encontrados nos hidrolisados são os compostos furaldeídos, sendo os principais compostos desse grupo o furfural e HMF, que quando combinados, afetam o metabolismo celular e consequentemente a fermentação (Almeida, 2008). O furfural é proveniente da desidratação das pentoses, enquanto que o HMF das hexoses (Almeida, 2007). Assim como o ácido acético, os furaldeídos também elevam o tempo de adaptação do micro-organismo no meio, além de alterar a integridade da membrana, trazendo consequências em seu metabolismo e, portanto, na produção do produto de interesse, como o xilitol (Baptista, 2013).

Já compostos fenólicos são derivados da quebra da lignina durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Esses produtos de degradação, como a vanilina, atuam sobre a integridade da membrana citoplasmática, afetando a sua capacidade seletiva da membrana. Os aumentos da concentração desses produtos também atuam como inibidores do metabolismo microbiano, logo, afetam a produção do produto alvo (Lyra Colombi et al., 2017). Esses compostos inibitórios são comumente encontrados em hidrolisado de biomassa lignocelulósica de bagaço de cana-de-açúcar, como pode ser demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5. Principais inibidores encontrados em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar

Hidrolisado	Inibidor	Concentração	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido acético	2 – 9 (g/L)	González-Ramos et al., 2016
	Furfural	1,1 – 2 (g/L)	Martín al., 2002
	5-HMF	1,7 – 7 (g/L)	Laandan et al., 2008
	Vanilina	0,5 - 2 (g/L)	Endo et al., 2008

Tendo em vista as altas concentrações presentes de ácido acético em hidrolisados ácidos de bagaço de cana de açúcar, é importante compreender os mecanismos inibitórios desse composto no metabolismo microbiano (González-Ramos et al., 2016). O ácido acético é formado a partir da quebra da hemicelulose durante a hidrólise ácida da biomassa (BK et al., 2022). Os níveis desse composto comprometem a taxa de crescimento celular, interferindo diretamente no processo fermentativo (COLOMBI et al., 2017).

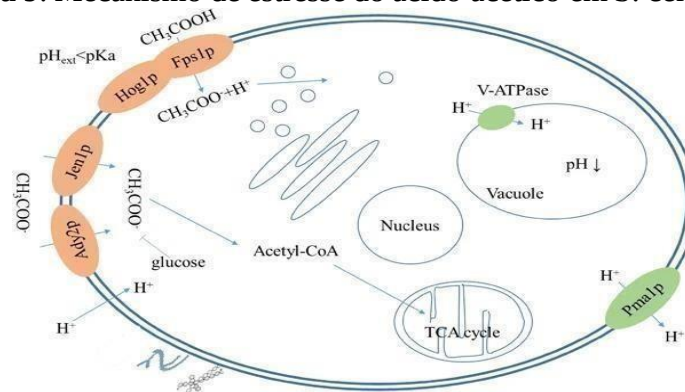
Kaur et al (2023) mostrou queda no rendimento de xilitol em *C. tropicalis* e *M. caribbica* com o aumento da concentração de ácido acético no meio de fermentação. Além disso, relatou a máxima produção de xilitol na presença do ácido quando o pH do meio de cultivo foi 5,5 em relação a outros testados. É possível visualizar que há uma relação entre o pH do meio e a

toxicidade do ácido acético na célula.

Isso se explica pelo fato que, em condições de baixo pH, o ácido se encontra protonado, podendo entrar na célula por difusão simples (Kaur et al., 2023). Ao chegar no citoplasma, o ácido acético se dissocia em ânions acetato e prótons, acarretando em acidificação intracelular e inibição de algumas importantes funções metabólicas, podendo levar até mesmo a morte celular. Perna; Bastos; Ceccato-Antonini (2018) revelaram que a diminuição do pH de 5,5 para 3,5 do meio de cultivo com 10,5 g/L de ácido acético, inibiu completamente o crescimento de *M. guilliermondii*, contudo, houve consumo do ácido acético.

Há leveduras que podem sobreviver a presença deste inibidor em baixas concentrações, já que o acetato pode ser metabolizado e convertido em acetil-CoA, e consequentemente utilizado em outras rotas, como a do ácido tricarboxílico (Geng; Zhang; Shi, 2017). As leveduras resistentes ao ácido acético possuem alterações na parede e membrana celular, mecanismos de recuperação do pH e desintoxicação (Figura 9). Para que haja a manutenção do pH intracelular, assim como para outros processos fisiológicos, existe a necessidade de que a célula gaste ATP para ativação de enzimas responsáveis pelo bombeamento e expulsão dos prótons, conhecidas como ATPase (Geng; Zhang; Shi, 2017; perna; bastos; ceccato-antonini, 2018). Em altas concentrações de ácido no citosol, ocorre esgotamento e depleção da atividade enzimática e de ATP, levando a queda no pH citosólico (Palmqvist; Hähn-Hagerdal, 2000).

Figura 9. Mecanismo de estresse do ácido acético em *S. cerevisiae*.



Fonte: GENG; ZHANG; SHI, 2017.

Esse gasto energético compromete metabolicamente a célula, incluindo a produção de xilitol. Portanto, torna-se essencial determinar, para cada micro-organismo específico, a concentração máxima tolerável deste composto tóxico presente no hidrolisado hemicelulósico, de modo a garantir que a eficiência do processo fermentativo não seja comprometida (Pereira et al., 2011).

Encontrar uma solução de baixo custo para superar a presença de inibidores no

hidrolisado hemicelulósico para obter um desempenho microbiano eficiente durante a fermentação é um dos pontos mais relevantes que demandam esforços para o desenvolvimento de um bioprocesso robusto para produção de xilitol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos e meio de cultura

A linhagem utilizada foi *Meyerozyma caribbica* URM8365 (Alencar et al., 2023). O cultivo de micro-organismos foi feito por uso de meio de cultivo YPD, no qual foi usada as seguintes proporções: 2% de glicose e peptona, e 1% de extrato de levedura. O crescimento ocorreu em erlenmeyers de 250 mL, mantidos em shaker, a temperatura de 30°C e a 150 rpm. Ao final do processo, os micro-organismos foram centrifugados e pesados, a fim de alcançar a quantidade celular desejada para posteriormente serem ressuspensos nos meios de fermentação.

Para o crescimento em placas, foi utilizado meio sólido YPD, YPX. A constituição do meio sólido YP é 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% para glicose ou xilose (YPD e YPX respectivamente) e ágar a 2%. Para o meio YPDX (1:5), ou seja, as duas fontes de carbono no meio, foi usado a concentração de 2% total dos açúcares, sendo a proporção de 1 de glicose para 5 de xilose. Essa proporção (1:5) foi estabelecida como a melhor para produção de xilitol por *M. caribbica*, por trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Alencar et al., 2023).

4.2 Ensaios de crescimento

Foram realizados ensaios fisiológicos em diferentes condições para avaliar os efeitos dos inibidores no perfil de crescimento da levedura *M. caribbica*. As células foram pré-cultivadas em meio YPD à 30°C com agitação de 150 RPM por 24 horas. Em sequência as células foram centrifugadas a 3600 rpm durante 5 min, lavadas com solução salina e ressuspensas em água para uma densidade ótica final de 1,0 nm. Em seguida foram realizadas diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) e as células foram inoculadas em meio YPD, YPX e YPDX (1:5 glicose/xilose) sólido, com uso de ágar a 2%, sem e com ácido acético nas concentrações de 0,6, 0,8, 1,6 e 3,7 g/L e incubadas em estufa a 30°C durante 5 dias e acompanhadas para avaliar o crescimento da cepa.

4.3 Avaliação do tratamento ácido no crescimento

O ensaio de crescimento com células tratadas foi feito a fim de avaliar a resposta após uma pré-adaptação das células ao estresse ácido. As células foram reinoculadas em YPD com pH corrigido para 2 e 2,5 (Lucena et al., 2020), com uso de ácido sulfúrico, mantidas em pouca agitação durante 2 horas. Após isso foram inoculadas em placas YPDX (1:5) utilizando as

diluições seriadas de 10-1, 10-2, 10-3, sem e com ácido acético nas concentrações submetidas nos ensaios de crescimento descritos anteriormente. Esses valores de pH foram utilizados pois se enquadram na metodologia usada por usinas produtoras de etanol, pela necessidade de reciclagem celular, são tratadas e então recuperadas para novas fermentações (Beckner, 2011).

4.4 Ensaios de fermentação

Todos os ensaios foram realizados utilizando 5% m/v de inóculo (massa úmida) em 30 mL de meio YPDX (1:5). Foram mantidos nas condições de 150 RPM a 30° C em frascos erlenmeyers de 125 mL. As concentrações utilizadas nas fermentações foram de 20 g/L de glicose + xilose (20 g/L YPDX (1:5)), sem e com ácido acético 0,6 e 0,8 g/L durante 48 horas, e YPDX 80 g/L sem e com ácido acético 1,6 e 3,7 g/L durante 96 horas. Dentro do período de fermentação, foram realizadas coletas pontuais, centrifugadas durante 10 min a 10000 rpm e filtradas para que posteriormente fosse quantificado o consumo dos açúcares e produção de metabólitos através de cromatografia líquida de alta eficiência.

4.5 Ensaio de fermentação com pulsos de glicose

Para o ensaio de fermentação com pulso de glicose foi utilizado a condição de 80 g/L de glicose + xilose (80g/L YPDX (1:5)) com 1,6 g/L de ácido acético, acrescentado 13,3 g/L de glicose a cada 24 horas. Foram realizadas coletas de amostras antes e depois dos pulsos, durante 120 horas, nas mesmas condições descritas anteriormente (item 4.4)

4.6 Avaliação da correlação entre os fatores que interferem na produção de xilitol durante a fermentação

A fim de criar uma relação entre os fatores que são limitantes na fermentação, foi realizado uma nova fermentação. Foram associados 3 fatores, sendo eles o pH do meio de fermentação, a presença de ácido acético, e a pré-exposição das células, que chamamos de tratamento, em um pré-cultivo com pH ácido antes da fermentação. O meio de fermentação se manteve 80g/L YPDX (1:5), assim como a otimização por pulsos de glicose a cada 24 horas, agitação de 150 rpm a 30° C. A fermentação durou um total de 120 horas, com coletas a cada 24 horas antes e depois dos pulsos.

4.7 Análises de dados

A quantificação de açúcares (glicose, xilose), ácido acético, xilitol e etanol foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), detectado por índice de refração, em coluna Aminex® (HPX-87H+, Bio- Rad, EUA), com vazão 0,6 mL/min, 35°C e, como fase móvel, H₂SO₄ (5 mM).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

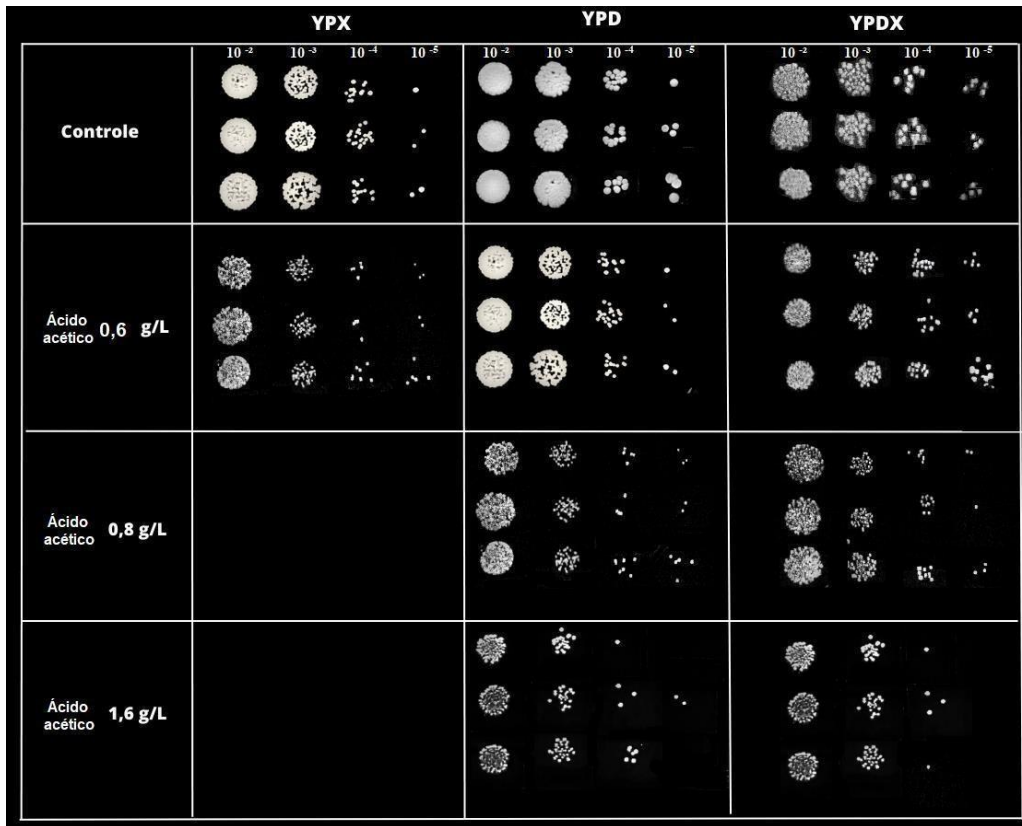
5.1 Avaliação do crescimento de *M. caribbica* na presença de ácido acético

É bastante relatado na literatura que os compostos 5-HMF, furfural, ácido fórmico e ácido acético são os principais inibidores do processo fermentativo dos hidrolisados lignocelulósicos e, portanto, métodos de detoxificação desses compostos tem sido cada vez mais necessário (Chen et al., 2023). Contudo, o ácido acético mesmo após o processo de detoxificação fica presente no hidrolisado e mesmo em baixas concentrações consegue inibir tanto o crescimento microbiano quanto o consumo dos açúcares e produção dos principais metabólitos (Campos et al., 2022).

Portanto, com o objetivo de determinar o efeito da concentração do ácido acético no crescimento de *M. caribbica* foi realizado um ensaio de crescimento em meio YP sólido contendo glicose, xilose e Glicose + Xilose (1:5), como carboidratos e 0,6 g/L, 0,8 g/L e 1,6 g/L de ácido acético (Figura 10). Inicialmente é possível notar que o efeito inibidor do ácido acético é relativo a fonte de carboidrato. No meio com glicose, a o micro-organismo teve capacidade de crescer na presença de até 1,6 g/L do ácido acético.

Também foi realizado o cultivo com 3,7 g/L de ácido acético com total inibição do crescimento nos três meios. Em xilose como única fonte de carbono, o efeito inibitório máximo já ocorre com 0,8 g/L de ácido acético. Na presença de glicose/xilose, o crescimento é reestabelecido na concentração de 0,8 g/L e 1,6 g/L do ácido. Esse reestabelecimento se deve graças ao fato de a glicose fornecer cofatores e energia suficiente para adaptação da célula no meio de estresse pelo ácido acético (Lima, 2002).

Figura 10. Avaliação do crescimento celular nas diferentes condições de cultivo. Experimento realizado em meio sintético com triplicata técnica e diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} da esquerda pra direita), em diferentes composições de carboidratos YPX (xilose), YPD (Glicose) e YPDX (glicose:xilose) e concentrações de ácido acético. Células cultivadas por 72 h.



O efeito inibitório do ácido acético no crescimento de leveduras é bastante descrito na literatura. Por exemplo, Bhavana et al. (2022) mostraram que *Pichia stipites* NCIM 3497 teve a taxa de crescimento reduzida mediante presença do ácido acético, assim como Pereira et al. (2011) concluiu que o metabolismo de *C. guilliermondii* é afetado na presença de ácido acético, principalmente quando se trata de crescimento celular. SOARES (2021) mostrou que a cepa *M. caribbica* JA9 conseguiu crescer em 1 g/L de ácido acético, tendo seu crescimento inibido em 2 g/L. O mesmo concluiu que as leveduras necessitavam de mais tempo para se adaptar à toxicidade do inibidor, logo, havendo um aumento da fase lag.

Além disso, há outros fatores que estão interligados com a toxidade do ácido acético, como o pH do meio. Kaur et al., (2023) testaram as leveduras *C. tropicalis* e *M. caribbica* em diferentes concentrações de ácido acético com diferentes valores de pH do meio. Relataram que 10 g/L de ácido acético em pH de 4,5 foi tóxico para ambas as leveduras, tanto para crescimento quanto para produção de xilitol. Porém, ao elevar o pH do meio para 5,5 e 6,5 foram capazes de tolerar bem os 10 g/L do ácido e melhorar sua produtividade.

O pH está intimamente ligado a capacidade de entrada do ácido acético na célula, uma vez que, quando baixo o pH do meio, o ácido aparece na sua forma não dissociada, o qual é lipossolúvel e facilita sua entrada no interior da levedura. Visto isso, a diminuição da massa celular pode ser explicada pelo fato de que o ácido acético pode se difundir pela membrana

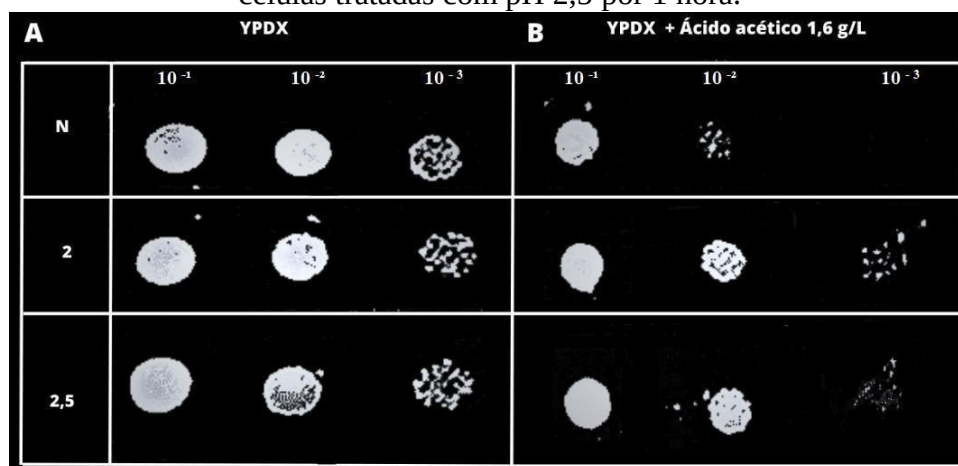
celular da levedura, levando a uma acidificação intracelular. Nesse caso, a célula gasta energia que seria usada no crescimento para restaurar a homeostase, para que diminua a possibilidade de morte celular (Pereira et al., 2011; De Lucena et al., 2015; Bk et al., 2022).

Portanto, foi realizado um ensaio de crescimento para visualizar o efeito da pré-exposição das células a pH ácido. Para isso as células foram pré-cultivadas em meio com pH de 2 e 2,5, ajustado com ácido sulfúrico, antes de cultivadas em meio de crescimento glicose + xilose (1:5) e ácido acético. Quando analisadas e comparadas as células crescidas nas placas para teste do tratamento ao pH ácido, podemos visualizar que, tanto para o grupo controle como no meio com ácido acético, o crescimento das células não tratadas (N) seguiu o padrão estabelecido nos experimentos anteriores, no qual o acetato influencia negativamente no crescimento das células e aumento da fase lag (Figura 11). É importante salientar que essas análises foram qualitativas, a partir de comparações visuais entre as placas ao longo do tempo de incubação, assim como do crescimento anterior. No grupo controle, as condições com ou sem tratamento de pH não revelaram grandes diferenças, apesar de, na maior diluição, ser possível ver uma quantidade de colônias um pouco menos volumosas nas que tiveram sido tratadas por pH antes de gotejadas.

Enquanto que, no grupo com ácido acético 1,6 g/L, as células tratadas e não tratadas mostraram diferentes padrões de crescimento revelado a partir da diluição intermediária (10^{-2}).

Figura 11. Crescimento em placas com YPDX (1:5) com células tratadas e não tratadas.

Legenda: YPDX (1:5) com diluições seriadas (1/10). (A) Grupo controle, (B) grupo com ácido acético 1,6 g/L. N - células sem tratamento, 2 - células com tratamento em pH 2, 2,5 - células tratadas com pH 2,5 por 1 hora.



Foi clara a visualização do impacto do tratamento com pH no crescimento dos cultivos em meio contendo ácido acético. As células submetidas ao estresse ácido, antes de serem gotejadas, revelaram influência na sobrevivência das leveduras quando dispostas no meio com presença do outro agente estressor, o acetato, que está intimamente ligado ao estresse celular.

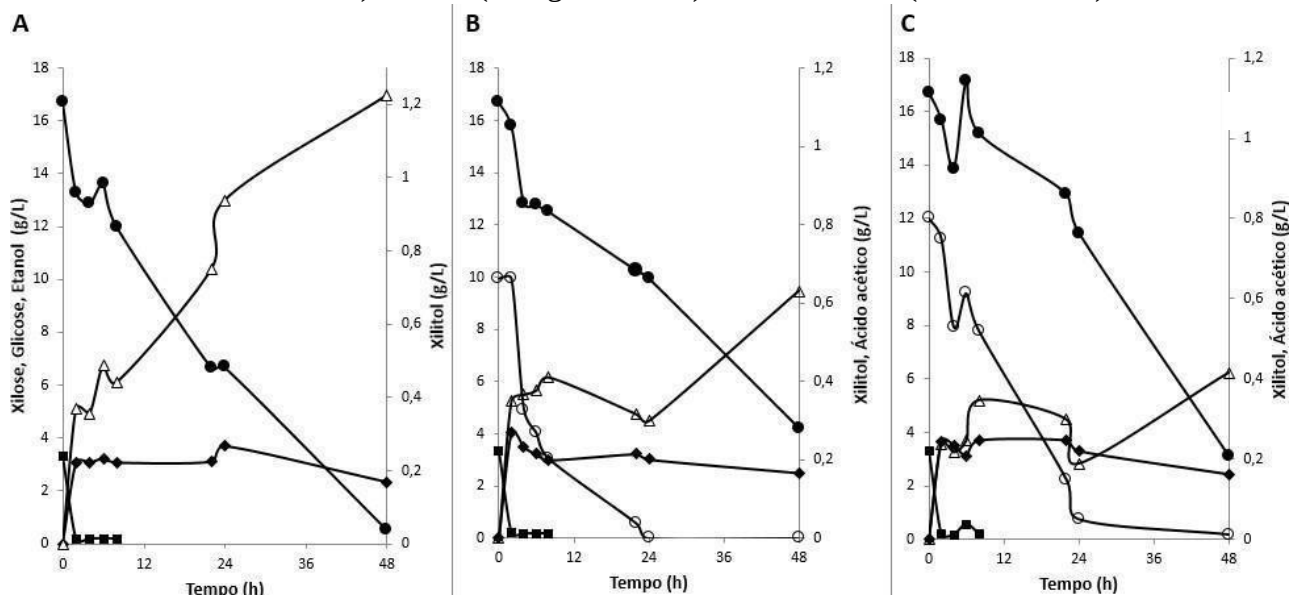
Logo, é possível concluir que as células que foram anteriormente submetidas a uma exposição ácida, possibilitaram, qualitativamente, melhores condições de crescimento na presença do ácido acético quando comparado ao grupo sem ácido (Figura 11). Isso pode ser explicado pelo fato de que a utilização do ácido sulfúrico no tratamento das células permita uma adaptação da célula ao ambiente ácido e, a partir disso, ocorra uma indução gênica nos sistemas de resposta da célula para ao estresse e de manutenção da integridade da parede celular (DE MELO et al., 2010; DE LUCENA et al., 2015).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de crescimento do nosso estudo, é evidente que a levedura apresenta respostas distintas em relação ao comportamento diante do ácido acético e sua concentração, o que também se relaciona com a composição do meio de fermentação e induz diferentes respostas celulares. Com base nessas observações, procedemos à avaliação do impacto metabólico dessas variáveis de fermentações com *M. caribbica*.

5.2 Avaliação da capacidade de produção de xilitol na presença de ácido acético.

Por permitir melhor condicionamento celular na presença do ácido acético, as fermentações realizadas mantiveram a presença de glicose e xilose no meio. A fermentação em 20 g/L YPDX (1:5) como fonte de carbono, tendo como teste as condições com ácido acético 0,6 e 0,8 g/L, baseadas nas concentrações testadas nos ensaios de crescimentos e encontradas em hidrolisados lignocelulósicos de cana-de-açúcar, tiveram as seguintes considerações: em todos os grupos testados, o consumo de glicose, até seu esgotamento se deu nas primeiras 2 horas de fermentação, visto que apenas 3,3 g/L de glicose era presente no meio. Para xilose, com concentração inicial de 16,7 g/L, o seu consumo foi quase total no grupo controle, já nos grupos com acetato houve xilose residual (Figura 12).

Figura 12: Fermentação com 20 g/L YPDX (1:5). Consumo de carboidratos e produção de xilitol. Legenda: (A) Grupo controle; (B) grupo com ácido acético 0,6 g/L; (C) grupo com ácido acético 0,8 g/L. Xilose (círculo fechado); Glicose (quadrado fechado); Etanol (losango fechado); Xilitol (triângulo aberto); Ácido acético (círculo aberto).



Há diversos relatos na literatura que confirmam a glicose como fonte preferencial frente a outros açúcares, como a xilose. O consumo da glicose, mesmo considerando a pouca quantidade deste composto no meio testado frente à xilose, é relatado por autores como Tadioto et al. (2022), no qual a glicose é totalmente consumida em menor tempo que outras fontes de carbono.

Além disso, a glicose foi consumida quase que totalmente nas primeiras 2 horas de fermentação (Figura 12), possivelmente conduzida à formação de etanol, o qual mostrou o ápice de produção também com 2 horas e manteve-se constante até 24 horas de fermentação. Observa-se também que com 48 horas o etanol tem uma queda, o que é possível deduzir o consumo deste metabólito. Estas mesmas observações foram discutidas por Nandal; Sharma & Arora. (2020) e SOARES (2021). Este consumo também pode ser explicado pelo fato de que, com 48 horas de fermentação não havia mais açúcares disponíveis para consumo.

A produção de etanol foi visualizada tanto em meios com presença ou ausência de ácido acético, tendo em vista que não houve grandes disparidades quanto às concentrações produzidas, independente da condição do meio testado, como visto na Figura 12. É possível que, mesmo com pouca diferença, os níveis mais elevados de etanol nos meios com presença de ácido acético, tenham sido devido ao uso da xilose, uma vez que a presença do inibidor influencia no aumento da atividade da xilose redutase e xilitol desidrogenase, podendo explicar essa leve diferença na produção do etanol (Lima, 2002).

Quando avaliado a produção de xilitol pela levedura testada, foi visto uma maior produção no grupo controle do que na presença do ácido acético, mostrando a influência deste inibidor no meio, inclusive sua concentração. A concentração final de xilitol foi maior no grupo com ácido acético 0,6 g/L do que em 0,8 g/L, como ilustrado na Figura 12.

A presença da hexose no meio de fermentação também é um dos fatores que regula a produção de xilitol por leveduras. Pode haver leveduras que não se beneficiem da presença da glicose no meio, havendo aumento da fase lag para consumo da pentose, prejudicando a produção de xilitol (Parajó et al., 1998). Por outro lado, a *C. tropicalis* mostrou melhoramento na produção de xilitol quando o meio é suplementado com glicose, inclusive com menor consumo de xilose (Yahashi et al., 1996). Apesar de contraditório, explica-se pelo fato de que a glicose permite um maior crescimento/adaptação ao meio do que em xilose, uma vez que regula a regeneração de NADPH através das vias das pentoses fosfato, favorecendo a formação de xilitol, por ser cofator para a xilose redutase (Parajó et al., 1998; Lima, 2002). Rosa et al. (1998) constataram o favorecimento de produção de xilitol por *C. guilliermondii*, em meio sintético contendo 30 g/L de xilose e 5,0 g/L glicose.

O consumo da xilose, conseqüentemente a produção de xilitol, foi afetado também pela presença do ácido acético. Nos testes de SOARES (2021) revelou que sua cepa de *M. caribbica* JA9 teve pouco ou nenhum consumo de xilose e pouca formação de produto na presença do ácido, entrando em consenso com os dados obtidos neste trabalho. O efeito do ácido acético no metabolismo de levedura não é tão elucidado, porém a menor produtividade de xilitol pode estar relacionada com o aumento da atividade das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase na presença do ácido (Sousa et al., 1998; Lima, 2002). Ou seja, na presença do ácido, apesar de promover a formação do xilitol por aumento da atividade de xilose redutase, haverá uma declinação do xilitol excretado, uma vez que será consumido pelo fato de que houve o mesmo aumento para a enzima xilose desidrogenase, levando para outras rotas metabólicas. (Lima, 2002). No entanto, o ácido acético presente no meio, além de afetar no metabolismo celular da levedura na produção do xilitol, foi visto que a linhagem de *M. caribbica* consegue internalizar este composto, dados visíveis na Figura 12 - (B e C).

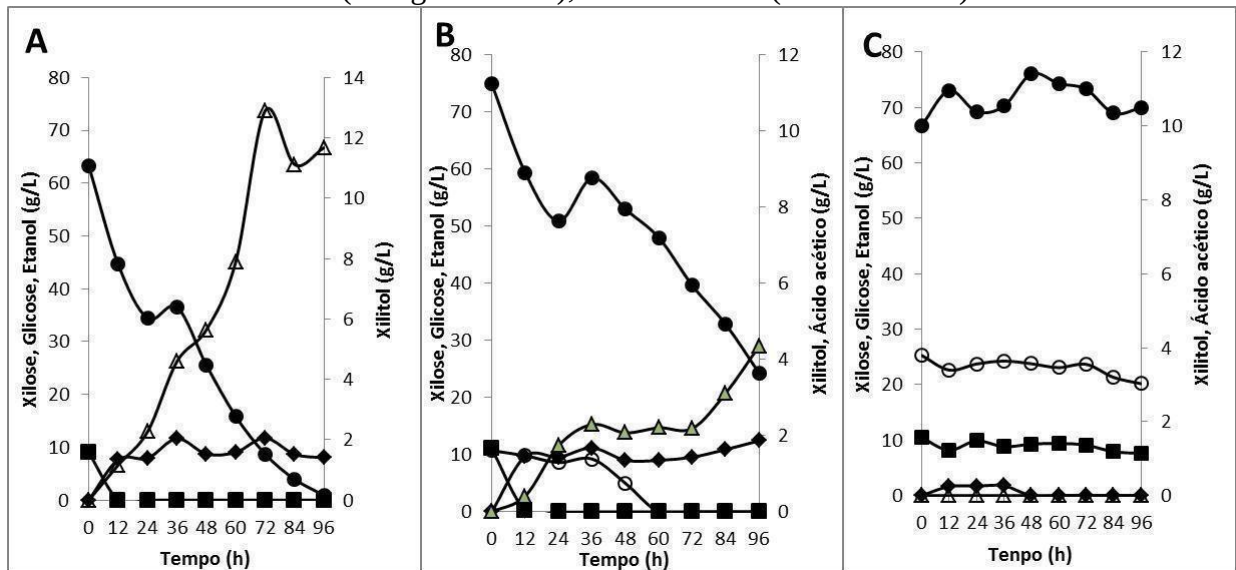
Há variações nos níveis de tolerância ao ácido acético e estas são devidas as diferentes espécies de micro-organismos avaliados e às condições experimentais usadas, especialmente ao pH das fermentações. Ao se testar o efeito do ácido acético na fermentação de xilose utilizando *Candida guilliermondii* FTI 20037, Felipe et al. (1995) constataram que o aumento da concentração do ácido até 1,0 g/L levou a um favorecimento no rendimento e produtividade em xilitol. Também foi observado que a levedura foi capaz de assimilar o ácido juntamente com os açúcares, sendo completamente consumido em concentrações menores que 3,0 g/L, sugerindo que *C. guilliermondii* age como agente de destoxificação do meio.

Isso permite comparar a capacidade de *M. caribbica* de assimilar o ácido acético como mencionado por Felipe et al. (1995). Porém, quando analisamos os dados de produção de xilitol, entra em discordância com o autor a respeito de aumento de rendimento em concentração de até 1 g/L de ácido; mas é importante ressaltar que o mesmo utilizou em seu meio uma concentração de 60 g/L de xilose e 15 g/L de glicose, além de suplementar o meio com sulfato de amônio e outros compostos.

Visto as considerações acima relacionadas às primeiras etapas experimentais e que as condições de cultivo influenciam no comportamento da célula frente à presença do ácido acético, seguiu-se para uma nova fermentação para analisar o comportamento com novos parâmetros. O meio de cultivo teve a concentração elevada para 80 g/L YPDX (1:5), já que é aproximadamente o encontrado em hidrolisados ácido de bagaço de cana-de-açúcar, além de que, seria possível visualizar melhor a produção de xilitol, já que pequena foi a concentração de xilitol produzida a partir da fermentação em 20g/L YPDX (1:5). Além disso, as

concentrações de acetato foram alteradas para acompanhar este aumento, mantendo-as dentro da faixa do que é encontrado em hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar. Assim como a fermentação em 20g/L YPD_X (1:5), houve dificuldade de consumo e produção pela célula na presença do agente estressor (Figura 13).

Figura 13. Fermentação com 80 g/L YPD_X (1:5). Consumo de carboidratos e produção de xilitol. (A) Grupo controle; (B) grupo com ácido acético 1,6 g/L; (C) grupo com ácido acético 3,7 g/L. Xilose (círculo fechado); Glicose (quadrado fechado); Etanol (losango fechado); Xilitol (triângulo aberto); Ácido acético (círculo aberto).



Ao comparar os rendimentos da fermentação 20 g/l aos da 80 g/l, podemos evidenciar que a presença do ácido diminui o rendimento dos produtos. Na Tabela 6 é possível ver que os rendimentos em xilitol foram comprometidos à medida que houve acréscimo na concentração do ácido acético.

Tabela 6. Valores de rendimento de etanol e xilitol das fermentações com 20 e 80 g/L de glicose+xilose YPD_X (1:5)

Rendimento s	Grupo fermentação 20 g/L			Grupo fermentação 80 g/L	
	Controle	Acetato 0,6 g/L	Acetato 0,8 g/L	Controle	Acetato 1,6 g/L
Etanol (g/g)	0,12	0,15	0,14	0,11	0,20
Xilitol (g/g)	0,06	0,03	0,02	0,16	0,07

Outro fator importante destacar é que, com o aumento da concentração inicial de xilose, o grupo de meios contendo 80 g/L de açúcares teve aumento no rendimento de xilitol, isso

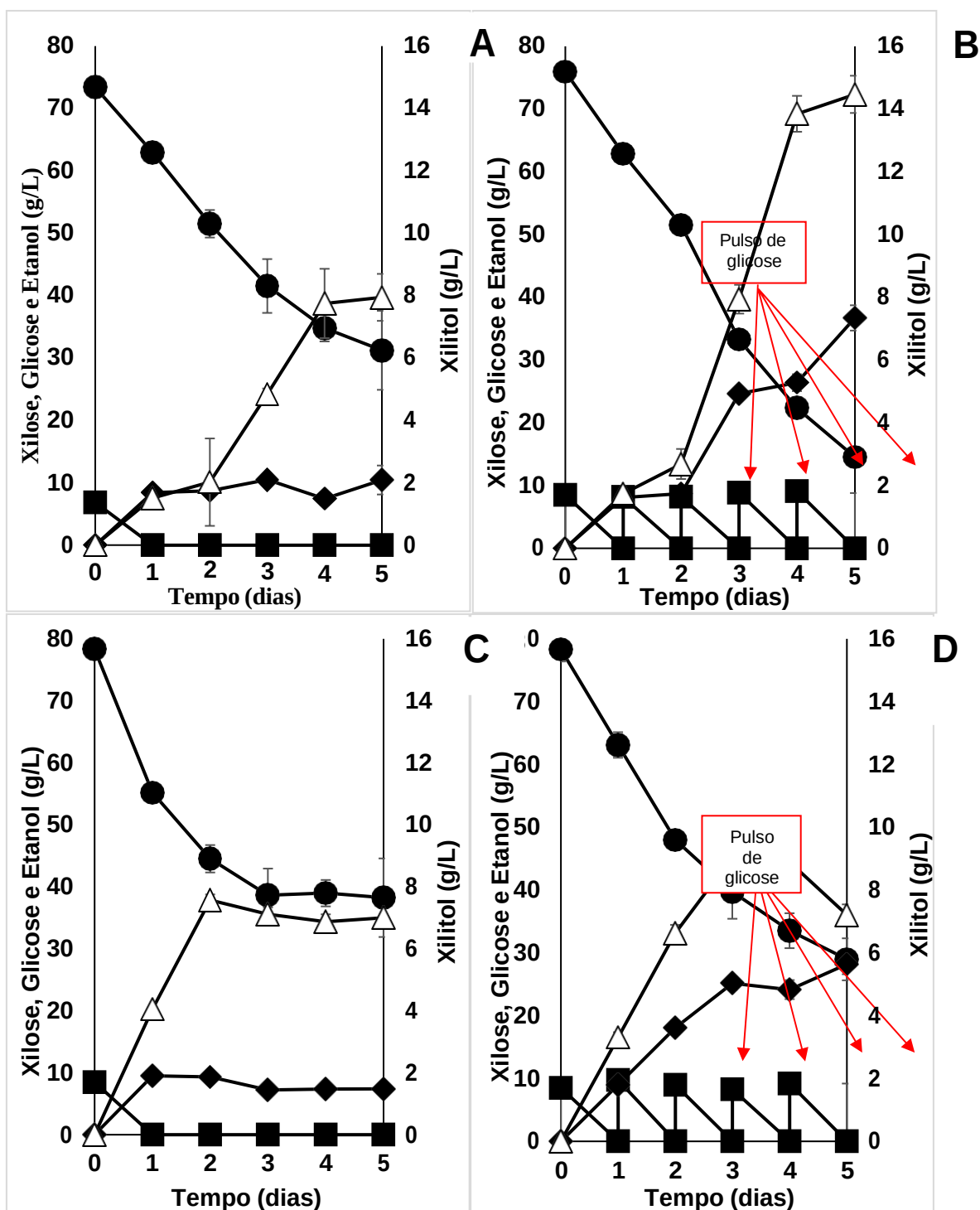
mostra que a quantidade de açúcar inicial é um fator relevante no processo, como visto por Parajó et al. (1998), porém, o aumento até níveis que afetem o equilíbrio osmótico da levedura leva a queda na produtividade rendimento no xilitol. Já o etanol, se manteve um rendimento próximo em todas as variáveis das fermentações. Todavia, nas condições em presença de ácido acético, o rendimento era maior quando comparado aos respectivos grupos controles. Isso pode ser explicado, como anteriormente mencionado, que pela presença do ácido no meio, pode levar ao aumento da atividade de enzimas que utilizam a xilose, consequentemente levando o consumo do xilitol para outras rotas metabólicas (Lima, 2002).

Foi possível visualizar semelhança nos parâmetros fermentativos em relação ao teste com 20 g/L YPD_X (1:5) tanto para o consumo de carboidratos como para a produção de xilitol e etanol. Mesmo com o aumento da concentração destes carboidratos, o ácido impactou assim como no teste anterior. A maior concentração testada do inibidor, 3,7 g/L (Figura 13-C), impactou fortemente, a ponto da célula não conseguir tanto assimilar como produzir nenhum componente no meio, mostrando o grau de intolerância da levedura ao aumento do ácido.

Esse impacto pode ser explicado pelo fato de que a célula utiliza de mecanismos para manutenção homeostática do pH intracelular, que dependem da enzima transmembrânica H⁺ - ATPase que transporta íons H⁺ para fora das células, as custas do consumo de ATP (Lima, 2002; Pereira 2007). Com essa regulação, ocorre o desacoplamento da produção de energia e do transporte de nutrientes, resultando na diminuição do crescimento e do metabolismo do micro-organismo, resultando em menor energia para a biossíntese, como do xilitol apresentado.

Isso levou uma busca para ajustes no processo, uma vez que diversos são os fatores que influenciam na resposta da célula, como os níveis de glicose. Nesse intuito, foi feita uma fermentação com pulsos (adição) de glicose a cada 24 horas para melhor avaliar o efeito desta fonte de carbono no metabolismo de consumo e produção da célula de levedura e sua relação com a presença do inibidor (Figura 14).

Figura 14. Perfil fermentativo da levedura *M. caribbica* em meio com glicose e xilose na proporção 1:5 como fonte de carbono à 80 g/L. Xilose (círculo fechado); glicose (quadrado fechado); etanol (losango fechado) e xilitol (triângulo aberto). (A) Meio de referência; (B) Meio YPD_X com pulso de glicose à cada 24h; (C) Meio YPD_X com 1,6 g/L de ácido acético e (D) Meio YPD_X com 1,6 g/L de ácido acético e pulsos de glicose à cada 24 h.



Foi possível concluir que, ao ser restabelecida a concentração inicial de glicose através de pulsos a cada 24 horas, houve favorecimento na produção de xilitol. No grupo sem ácido acético, ao comparar a produtividade é possível visualizar, na Figura 14-A e 14-B, que a concentração de xilitol subiu de, aproximadamente, 8 g/L para 14,5 g/L, respectivamente. Isso representa um aumento de quase 82%. Enquanto que nos grupos com ácido acético, Figura 14-C e 14-D, considerando o dia 4 da fermentação, houve um aumento de 6,8 g/L para 8,8 g/L,

representando um acréscimo de quase 30%, os dados da fermentação estão representados na Tabela 7. Portanto, os pulsos de glicose no meio, se mostrou uma atividade efetiva, tanto para quando presente o ácido acético, como não. Além da produção, é possível observar uma baixa de produção e/ou o consumo do xilitol a partir do 5º dia de fermentação (Figura 14).

Tabela 7. Parâmetros fermentativos do ensaio com pulsos de glicose

	Controle	Controle + pulso glicose	Ácido acético	Ácido acético + pulso glicose
Xilose consumida (g/L)	38,58 ± 6,26	62,30 ± 3,05	40,07 ± 1,71	46,74 ± 3,40
Glicose consumida (g/L)	7,10 ± 0,69	33,74 ± 0,966	8,30 ± 0,63	30,02 ± 5,35
Total consumido (g/L)	45,68 ± 6,32	96,04 ± 2,68	47,90 ± 2,67	76,76 ± 4,24
Etanol produzido (g/L)	7,43 ± 1,01	26,41 ± 1,33	7,35 ± 0,39	24,14 ± 1,51
Etanol rendimento (g/g)	0,17 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,32 ± 0,02
Xilitol produzido (g/L)	7,75 ± 1,1	13,85 ± 0,57	6,79 ± 0,22	8,9 ± 0,97
Xilitol rendimento (g/g)	0,17 ± 0,04	0,22 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,19 ± 0,03

Obs: dados utilizados até 4º dia de fermentação.

Esses dados permite discutir que o uso de pulsos de glicose pode ser utilizado para manutenção celular, auxiliando no consumo da xilose e consequentemente produção de xilitol, em contrapartida ao uso de grandes concentrações iniciais de glicose no meio, uma vez que, a hexose é de consumo preferencial pelos micro-organismos (Rosa et al., 1998; Soares, 2021). Silva et al. (2004) comparou diferentes proporções de glicose e xilose, e mostrou que o efeito da relação dessas duas fontes de carbono inferem mais sobre o rendimento do que na produtividade. Mudanças nos rendimentos de xilitol, em relação ao pulso de carbono, foram apresentadas na Tabela 7. Diferente do mencionado por Silva et al. (2004), a produtividade teve grande relevância quando usada a estratégia do pulso de glicose.

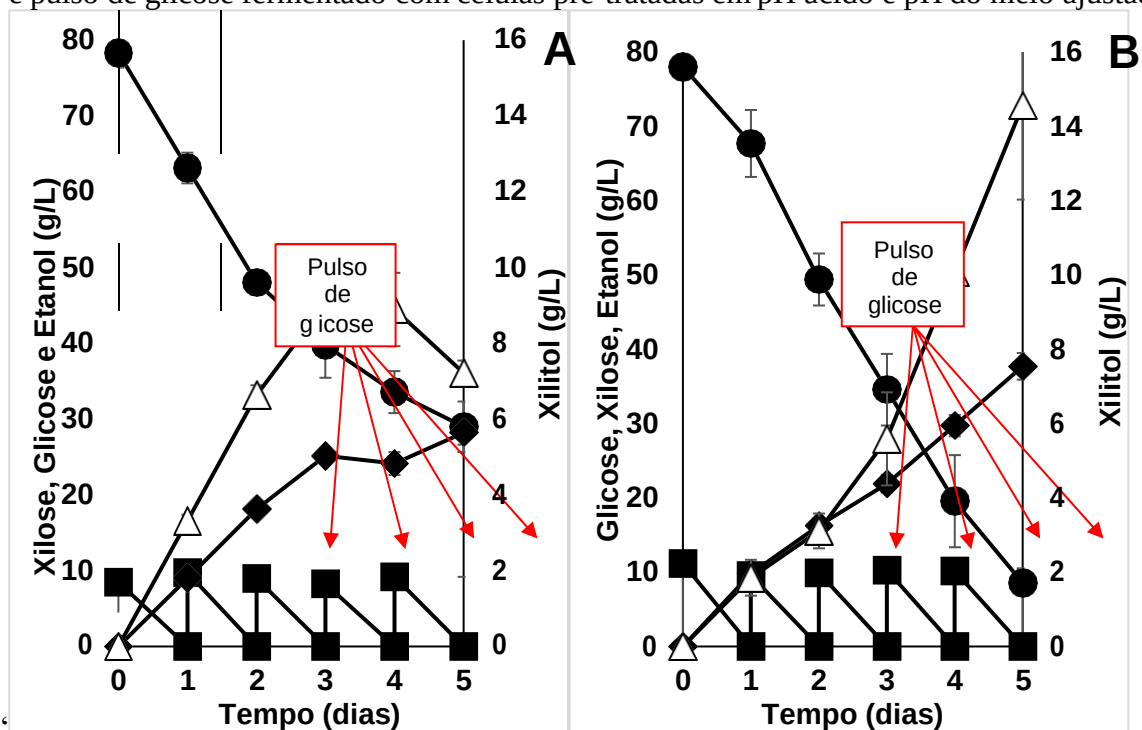
À medida que, a concentração de glicose era mantida no meio, através dos pulsos de glicose, a xilose era consumida, diminuindo sua concentração. Isso permitia que, a cada 24 horas, a relação glicose:xilose fosse alterada, portanto, diferentes respostas metabólicas podem ser esperadas pela célula. Rosa et al. (1998) relatou que, até 10% de relação glicose:xilose (60 g/L de xilose e 5 g/L), não afetaram a taxa de consumo da pentose por *C. guilliermondii* cultivada em meio sintético, obtendo um rendimento de 0,56 g/g, porém, após esse valor (aumento da concentração de glicose), houve redução da taxa de consumo da xilose, e portanto,

queda no rendimento.

Além disso, o consumo dos metabólitos é visto, de maneira clara, na Figura 14-D, com a redução da concentração de xilitol ao fim da fermentação. É mencionado por alguns autores, o uso do etanol e/ou xilitol como fonte de carbono e energia por leveduras produtoras de xilitol, tanto em meio sintético como em hidrolisado lignocelulósico (Flores et al., 2000; Matos et al., 2003; Silva et al., 2004). Visto o impacto da concentração da fonte de carbono na cinética de consumo e produção, assim como a influência do pH do meio no crescimento em placa, foi analisado em seguida, a relação do pH e seu efeito na cinética da célula durante a fermentação com pulsos de glicose.

Quando analisado os parâmetros fermentativos sobre efeito de meio com pH controlado e uma prévia exposição das células a ambiente ácido, podemos visualizar seus efeitos na Figura 15. O pH do meio foi ajustado para 4,0, para ser usado na fermentação, que ocorreu com células tratadas previamente a um ambiente de pH 2,0. Ambos foram ajustados com o uso de ácido sulfúrico. O pH desses meios anteriormente são os do meios YP, que ficam na faixa média de 6,00.

Figura 15. Perfil fermentativo da levedura *M. caribbica* em meio com glicose e xilose na proporção 1:5 como fonte de carbono à 80 g/L. Xilose (círculo fechado); glicose (quadrado fechado); etanol (losango fechado) e xilitol (triângulo aberto). (A) Meio YPDX com 1,6 g/L de ácido acético e pulso de glicose à cada 24 h (B) Meio YPDX com 1,6 g/L de ácido acético e pulso de glicose fermentado com células pré-tratadas em pH ácido e pH do meio ajustado.



É possível visualizar que o a exposição ao ácido acético influencia diretamente na

fermentação, sendo a variável com maior contribuição na produção volumétrica de xilitol, como visto ao longo do trabalho. Porém, como mencionado nos experimentos anteriores, o poder inibitório do ácido acético não está relacionado apenas a sua presença no meio, mas também a sua interação com outros fatores. A Figura 15 mostra o quanto a relação entre a presença de ácido acético e o pH do meio em que a levedura está inserida, influenciam na produção de xilitol.

A presença do ácido acético foi atenuada quando o pH do meio foi alterado assim como as células pré expostas a um ambiente de estresse ácido. Felipe et al., (1997) e Morita; Silva (2000) mostram que as produtividades volumétricas do xilitol foram baixas no pH inicial de 4,0 e que seus valores aumentaram com a elevação do pH do meio. Está claro que o efeito tóxico do ácido acético no metabolismo da xilose depende das condições de fermentação e da cepa de levedura empregada. Porém, diferente do visto pelos autores supracitado, ao utilizarmos *M. caribbica* após ser tratada com um pH de 2,0 para fermentar em meio com ajuste de pH 4,0, obtivemos uma maior produtividade de xilitol quando comparado a um meio YPD_X sem ajuste de pH e sem células tratadas (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros fermentativos do ensaio com pulsos de glicose + tratamento ácido em meio com glicose e xilose na proporção 1:5 como fonte de carbono à 80 g/L contendo ácido acético 1,6 g/L. O grupo tratamento teve células previamente expostas á meio com pH 2,0 e pH do meio de fermentação ajustado para 4,0. Dados do grupo sem tratamento até o 4º dia de fermentação, pois no 5º dia o xilitol já é consumido consideravelmente).

	Ácido acético + pulso glicose (4º dia)	Células tratadas (4º dia)	Células tratadas (5º dia)
Xilose consumida (g/L)	46,74 ± 3,40	54,94 ± 1,55	69,55 ± 0,97
Glicose consumida (g/L)	30,02 ± 5,35	40,85 ± 2,58	51,01 ± 2,01
Total consumido (g/L)	76,76 ± 4,24	95,79 ± 4,02	120,55 ± 2,88
Etanol produzido (g/L)	24,14 ± 1,51	29,70 ± 1,44	37,71 ± 1,79
Etanol rendimento (g/g)	0,32 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,31 ± 0,02
Xilitol produzido (g/L)	8,9 ± 0,97	10,05 ± 0,75	14,56 ± 2,53
Xilitol rendimento (g/g)	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,21 ± 0,03

O uso do tratamento ácido em pH de 2,0 foi estabelecido uma vez que durante o uso industrial da biomassa de levedura, é normalmente reciclada por tratamentos com ácido sulfúrico, a fim de controlar contaminação por outros agentes microbiológicos (De Melo et al.,

2010). Esse tipo de tratamento pode levar à perda da viabilidade celular, diminuindo o rendimento da fermentação. Lucena et al., (2020) mostraram que diversas vias de sinalização, genes para integridade da parede celular e vias de resposta ao estresse, são induzidas na presença de baixo pH por ácidos inorgânicos, como o ácido sulfúrico. Relataram também que sua cepa mutante *S. cerevisiae* para genes de integridade de parede celular, teve a viabilidade recuperada quando exposta a meio com pH extremamente baixo, e foi dependente da queda induzida do pH do citosol. O pH citosólico é, portanto, um sinal que direciona o equilíbrio entre estresse de crescimento e tolerância na levedura.

Isso pode explicar o porquê a maior produtividade do xilitol se deu quando as células foram tratadas com pH ácido (Figura 15-B), o que provavelmente levou a uma pré-adaptação a um ambiente de estresse. Logo, permitindo cascatas de sinalizações e gênicas, proporcionando melhor resitência a célula na presença do ácido acético, elevando a produtividade em xilitol. É importante salientar que, não necessariamente a mudança do pH do meio irá causar inibição na produção e crescimento da célula. Porém, quando presente o ácido acético em um estado protonado, juntamente ao baixo pH do meio, ocasiona a entrada facilitada deste pela membrana, interferindo no pH intracelular. (Oriji, 2009).

O pKa (constante de dissociação) do ácido acético é 4,75. Em um meio de fermentação em que o pH esteja abaixo do valor do pKa do ácido, isso fará com que o ácido acético esteja predominantemente protonado no meio, que é sua forma tóxica para levedura, enquanto que em pH mais alto, a forma desprotonado é predominante (Morita; Silva, 2000b). O pH do interior da célula é controlado graças a membrana e parede celular, porém a influência do meio externo pode acarretar no desequilíbrio do pH intracelular. Na presença de um meio rico em ácido acético na forma protonada, esse ácido é capaz de atravessar a membrana celular facilmente por difusão, resultando na acidificação do citosol da célula. Isso ocorre devido ao pH do citosol, que é maior que o pKa do ácido acético, ocasionando a dissociação do ácido no interior da célula (Parawira, Tekere, 2011; Geng; Zhang; Shi, 2017).

Para impedir os efeitos negativos desse desequilíbrio no pH intracelular, a célula utiliza como recurso a expulsão dos prótons e ânions, além de mudança na parede celular para lidar com esses componentes tóxicos. Porém, esses mecanismos de reação levam a um gasto energético pelo metabolismo celular, diminuindo o crescimento e produção (Lima, 2002; Pereira 2007; Lucena et al., 2020).

Sene et al. (2000) conseguiu testar a melhor faixa de pH para a máxima atividade das enzimas responsáveis pela redução da xilose e consumo do xilitol (xilose redutase e xilitol desidrogenase) da levedura *C. guilliermondii* que foi de pH 5,5 e 8,5, respectivamente. Já

Morita et al. (2000a) utilizando a mesma espécie, para fermentação em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, obteve os melhores parâmetros de consumo de xilose, rendimento e produtividade de xilitol quando ajustado o meio para pH de 7,0. Ainda Morita et al. (2000b) relata que até o fim de uma fermentação com pH 7,0 não houve total assimilação do ácido acético, enquanto que em pH 4,0 houve rapidamente, implicando no discutido acima sobre o pH e sua relação com o ácido orgânico no meio.

Nesse contexto, é possível visualizar a importância das análises nas relações entre os parâmetros utilizados durante a fermentação, pois diferentes são as respostas frente a cada variável isolada e em sinergia. Assim como Saputra et al. (2020), relatam que o grau de toxicidade do ácido acético, capacidade de assimilação pela levedura e produção de xilitol estão diretamente ligadas às condições de cultivo, sendo elas: disponibilidade de oxigênio, pH, temperatura, concentração inicial e idade do inóculo, concentração inicial de xilose, relação da concentração xilose/ácido acético e também a presença de outros glicídios.

Desta maneira, os perfis de crescimento e de fermentação desta levedura mostram a ação biológica do inibidor presente no meio, juntamente sua relação com outras variáveis. Sabendo este comportamento, é importante avaliar as melhores condições de uso de *M. caribbica* para fermentação efetiva de hidrolisados lignocelulósicos para obtenção de xilitol; uma vez que estes resultados estão relacionados a testes isolados em meios semisintéticos, havendo necessidade de avaliação futura deste comportamento em hidrolisado lignocelulósico, visando a otimização do processo, superando os gargalos atuais. Portanto, além das variáveis testadas, muitas outras são de importância para melhor serem estudadas. Pois, é a partir dessas análises, que será possível alcançar o melhor parâmetro para o uso da levedura na produção de xilitol e/ou outros bioprodutos na indústria.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Conclui-se que a presença de inibidores influencia negativamente a adaptação do micro-organismo no meio, elevando sua fase lag, assim como na produção de produtos, como o xilitol. Além da influência dos inibidores no meio, a fonte de carbono e a relação entre elas, como glicose:xilose disponibilizada nesse meio também é importante para manutenção do micro-organismo, afetando diretamente sua capacidade de adaptação ao inibidor presente e na dinâmica metabólica de produção. No caso de produção de xilitol a partir de *M. caribbica* URM8365, o ácido acético foi o inibidor muito impactante, à medida que sua concentração aumenta, diminui a atividade metabólica de crescimento e bioprodução de xilitol da levedura.

Além da influência do inibidor ácido, diversos são os fatores que interferem no consumo da pentose e produção do açúcar de álcool. Nesse contexto, há necessidade de estabelecer os melhores modelos de produção, como análise por planejamento fatorial, relacionando cada variável que interfere no processo. Foi estabelecido, portanto, os parâmetros que mais refletiram no bioprocessamento, dentre eles, o pH, concentração de ácido acético e concentração de açúcares iniciais e sua proporção. A partir disso é que será possível a otimização do processo para a produção do xilitol e ou etanol. Além desses fatores estudados, alguns outros possuem grande impacto na produção de xilitol quando presente ácido acético no meio, como: oxigenação, temperatura, quantidade de biomassa celular inicial etc.

Portanto, para que haja produção de xilitol de maneira economicamente viável, é necessário a integração do sistema industrial ao de pesquisa, que visem a superação desses gargalos, para que a levedura esteja robusta suficiente para tolerar dinâmicas industriais e concentrações mais elevadas de ácido acético, assim como outros inibidores encontrados em hidrolisados lignocelulósicos, com o intuito de melhorar rendimentos e produtividade na produção de bioprodutos de valor agregado, dentre estes, o xilitol.

REFERÊNCIAS

- AGBOR, Valery B. et al. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.
- ALENCAR, Bárbara Ribeiro Alves et al. Enzymatic hydrolysis of cactus pear varieties with high solids loading for bioethanol production. *Bioresource technology*, v. 250, p. 273-280, 2018.
- ALENCAR, Bárbara Ribeiro Alves et al. *Meyerozyma caribbica* Isolated from Vinasse-Irrigated Sugarcane Plantation Soil: A Promising Yeast for Ethanol and Xylitol Production in Biorefineries. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 8, p. 789, 2023.
- ALIAKBARIAN, Bahar et al. An assessment on xylitol recovery methods. In: *D-xylitol*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 229-244.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Mini-Review Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol*, v. 82, p. 340–349, 2007.
- ALMEIDA, J. R. M. et al. NADH- vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 78, n. 6, p. 939–945, 2008.
- ALVIRA, Petal et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- ARCAÑO, Yaimé Delgado et al. Xilitol: Uma revisão sobre os avanços e desafios de sua produção por via química. *Catálise Hoje*, v. 344, p. 2-14, 2020.
- BAPTISTA, Cátia Vanessa Rodrigues. Efeitos inibitórios do hidroximetilfurfural na fermentação alcoólica: avaliação por Citometria de Fluxo. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa (Portugal).
- BECKNER, Margareth; IVEY, Melissa L.; PHISTER, Trevor G. Contaminação microbiana de fermentações de etanol combustível. *Cartas em microbiologia aplicada*, v. 53, n. 4, pág. 387-394, 2011.
- BERGMANN, Jessica C. et al. Biotechnological application of non-conventional yeasts for xylose valorization. *Non-conventional yeasts: from basic research to application*, p. 23-74, 2019.
- BIZZO, Waldir Antonio et al. The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugarcane, its characterization and its use in energy production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 29, p. 589-603, 2014.
- BK, Bhavana et al. Effect of furfural, acetic acid and 5-hydroxymethylfurfural on yeast growth and xylitol fermentation using *Pichia stipitis* NCIM 3497. *Biomass Conversion and Biorefinery*, p. 1-15, 2022.

CAMPOS, Valquíria Júnio et al. Physiological comparisons among *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae*, and *Scheffersomyces stipitis* reveal the bottlenecks for their use in the production of second-generation ethanol. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 977-990, 2022.

CANILHA, L. et al. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. *Bioquímica e Biotecnologia*. Associação Brasileira de Química–ABQ, 2007.

CANILHA, Larissa et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2012, 2012.

CARNEIRO, Clara Vida Galvão Corrêa. Prospecção de leveduras para produção de xilitol a partir de hidrolisados de biomassa de cana. 2018.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 67, n. 11, p. 849–864, 2008.

CARVALHEIRO, F. et al. Hydrothermal/liquid hot water pretreatment (autohydrolysis): A multipurpose process for biomass upgrading. In: *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery*. Elsevier, 2016. p. 315-347.

CASPETA, L.; CASTILLO, T.; NIELSEN, J. Modifying yeast tolerance to inhibitory conditions of ethanol production processes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 3, n. NOV, p. 1–15, 2015.

CHANDRA, Richard P. et al. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?. In: *Biofuels*. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 67- 93.

CHEN, Xue-fang et al. Removal of Fermentation Inhibitors from Sugarcane Bagasse Hydrolysate via Post-cross-linked Hydrophilic-Hydrophobic Interpenetrating Polymer Networks. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 1-20, 2023.

COLOMBI, Bruna Lyra et al. Efeito de compostos inibidores na bioconversão de glicose em etanol por levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Engevista*, v. 19, n. 2, p. 339-352, 2017.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Produção de cana-de-açúcar deve crescer 4,4% na safra de 2023/24, estimada em 637,1 milhões de toneladas. 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4982-producao-de-cana-de-acucar-deve-crescer-4-4-na-safra-2023-24-estimada-em-637-1-milhoes-de-toneladas>. Acesso em: 27 jun. 2023

DASGUPTA, Diptarka et al. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. *Microbiological Research*, v. 197, p. 9-21, 2017.

DE ALBUQUERQUE, Tiago Lima et al. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: a review. *Process Biochemistry*, v. 49, n. 11, p. 1779-1789, 2014.

DE ARRUDA, Priscila Vaz et al. Ampliação da produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 47, p. 297-302, 2017.

DE LUCENA, Rodrigo Mendonça et al. Transcriptomic response of *Saccharomyces cerevisiae* for its adaptation to sulphuric acid-induced stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 108, p. 1147-1160, 2015.

DE MELO, H. F. et al. Physiological and molecular analysis of the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* imposed by strong inorganic acid with implication to industrial fermentations. *Journal of applied microbiology*, v. 109, n. 1, p. 116-127, 2010.

DIAS, L. M. S. Síntese e caracterização de adesivos de lignina kraft de eucalipto. Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2014.

DOS SANTOS, Leandro Vieira et al. Second-generation ethanol: the need is becoming a reality. *Industrial Biotechnology*, v. 12, n. 1, p. 40-57, 2016.

DRAGONE, Giuliano et al. Innovation and strategic orientations for the development of advanced biorefineries. *Bioresource technology*, v. 302, p. 122847, 2020.

Dutra, E. D., Barbosa Neto, A. D., De Souza, R. B., Morais Jr, M. A., Tabosa, J. N. e Menezes, R. S. C. Ethanol production from the stem juice of different sweet sorghum cultivars in the state of Pernambuco, Northeast of Brazil. *Sugar Tech.* 2013, 15:316-321.

FELIPE HERNÁNDEZ-PÉREZ, Andrés et al. Xylitol bioproduction: state-of-the-art, industrial paradigm shift, and opportunities for integrated biorefineries. *Critical reviews in biotechnology*, v. 39, n. 7, p. 924-943, 2019.

FELIPE, Maria GA et al. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Journal of basic microbiology*, v. 35, n. 3, p. 171-177, 1995.

FELIPE, M. G. A. et al. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 18, n. 4, p. 251-254, 1997.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Polyoses (hemicelluloses). *Wood—chemistry, ultrastructure, reactions*, p. 109-111, 1989.

FLORES, Carmen-Lisset et al. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS microbiology reviews*, v. 24, n. 4, p. 507-529, 2000.

FONSECA, B. G. Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis*. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2009.

GDS – Gestão da Sustentabilidade. XXIV ENANGRAD, Resumos. Florianópolis, SC. 2013.

GENG, Peng; ZHANG, Liang; SHI, Gui Yang. Omics analysis of acetic acid tolerance in

Saccharomyces cerevisiae. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 33, p. 1-8, 2017.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. Xylitol Market Size By Application, Downstream Application Potential, Industry Analysis Report, Regional Outlook, Production Technology, Price Trend, Competitive Market Share & Forecast 2019–2025. Sample report, 2019.

Global Xylitol Market: By Form: Solid, Liquid; By Application: Chewing Gum, Confectionery, Pharmaceuticals and Personal Care, Others; Regional Analysis; Historical Market and Forecast (2018-2028); Market Dynamics; Value Chain Analysis; Price Analysis; Manufacturing Process; Competitive Landscape; Industry Events and Developments. Expert Market Research, 2018. Disponível em: <https://www.expertmarketresearch.com/reports/xylitol-market>. Acesso em: 30 Jul. 2023.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, Andrés Felipe et al. Valorization of the sugarcane bagasse and straw hemicellulosic hydrolysate through xylitol bioproduction: effect of oxygen availability and sucrose supplementation as key factors. Biomass Conversion and Biorefinery, p. 1-15, 2020.

HOANG, Minh Trang et al. Esterification of sugarcane bagasse by citric acid for Pb 2+ adsorption: effect of different chemical pretreatment methods. Environmental Science and Pollution Research, p. 1-13, 2020.

HU, Fan; RAGAUSKAS, Art. Pretreatment and lignocellulosic chemistry. Bioenergy Research, v. 5, n. 4, p. 1043-1066, 2012.

KAUR, Sundeep; GULERIA, Payal; YADAV, Sudesh Kumar. Evaluation of Fermentative Xylitol Production Potential of Adapted Strains of *Meyerozyma caribbica* and *Candida tropicalis* from Rice Straw Hemicellulosic Hydrolysate. Fermentation, v. 9, n. 2, p. 181, 2023.

KUMAR, Vinod et al. Improved upstream processing for detoxification and recovery of xylitol produced from corncob. Bioresource technology, v. 291, p. 121931, 2019.

KURTZMAN, Cletus P.; FELL, Jack W.; BOEKHOUT, Teun (Ed.). The yeasts: a taxonomic study. Elsevier, 2011.

LAVOINE, Nathalie et al. Microfibrillated cellulose—Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. Carbohydrate polymers, v. 90, n. 2, p. 735-764, 2012.

LIMA, LUANNE HELENA AUGUSTO. Efeito do ácido acético nas enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase. Faculdade de engenharia química de Lorena, Departamento de biotecnologia, São Paulo, 2002.

LU, Yanpin et al. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. Applied biochemistry and biotechnology, v. 98, n. 1, p. 641-654, 2002.

LUCENA, Rodrigo Mendonça et al. Extreme low cytosolic pH is a signal for cell survival in acid stressed yeast. Genes, v. 11, n. 6, p. 656, 2020.

LYRA COLOMBI, B. et al. EFEITO DE COMPOSTOS INIBIDORES NA

BIOCONVERSÃO DE GLICOSE EM ETANOL POR LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*. *Engevista*, v. 19, n. 2, p. 339, 2017.

MARTINEZ, Ernesto A. et al. Strategies for xylitol purification and crystallization: a review. *Separation Science and Technology*, v. 50, n. 14, p. 2087-2098, 2015.

MARTÍNEZ-RUANO, Jimmy Anderson et al. Techno-economic and environmental assessment of biogas production from banana peel (*Musa paradisiaca*) in a biorefinery concept. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 36, p. 35971-35980, 2018.

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. 1-9, 2016.

MATHEW, Anil K. et al. Lignocellulosic Biorefinery Wastes, or Resources? In: *Waste Biorefinery*. Elsevier, 2018. p. 267-297

MATOS, G. S.; FELIPE, Maria das Graças de A.; SILVA, S. S. Formação de xilitol, etanol e glicerol por *Candida guilliermondii* FTI 20037 durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, Florianópolis. Anais do 14º SINAFERM, Florianópolis, 2003.

MEIGHAN, B. N. Fracionamento De Bagaço De Cana-De-Açúcar Por Processo Hidrotérmico E Organossolve No Contexto Da Biorrefinaria Lignocelulósica. Universidade Federal de Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental Mestrado em Engenharia Ambiental, 2016.

Mercado de Xilitol- Crescimento, tendências e previsões (2023-2028). Mordor Intelligence, 2016. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/xylitol-market>. Acesso em: 30 Jul. 2023.

MOHANTY, Sujit K.; SWAIN, Manas R. Bioethanol production from corn and wheat: food, fuel, and future. In: *Bioethanol production from food crops*. Academic Press, 2019. p. 45- 59.

MOREMI, Mahlatse Elias; JANSEN VAN RENSBURG, Elbert Lukas; LA GRANGE, Daniël Coenrad. The improvement of bioethanol production by pentose-fermenting yeasts isolated from herbal preparations, the gut of dung beetles, and marula wine. *International Journal of Microbiology*, v. 2020, 2020.

MORITA, Tihany A.; SILVA, Silvio S.; FELIPE, Maria GA. Effects of initial pH on biological synthesis of xylitol using xylose-rich hydrolysate. In: *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals: Proceedings of the Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 2–6, 1999, in Fort Collins, Colorado*. Humana Press, 2000a. p. 751-759.

MORITA, Tihany A.; SILVA, Silvio S. Inhibition of microbial xylitol production by acetic acid and its relation with fermentative parameters. In: *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals: Proceedings of the Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 2–6, 1999, in Fort Collins, Colorado*. Humana Press, 2000b. p. 801-808.

MOSIER, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 96(6), 673-686.

MUSSATTO, Solange Inês (Ed.). *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery*. Elsevier, 2016

MUSSATTO, Solange Inês; ROBERTO, Ines Conceicao. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource technology*, v. 93, n. 1, p. 1-10, 2004.

MUSSATTO, Solange Inês; ROBERTO, Inês Conceição. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, p. 401-413, 2002.

NANDAL, P.; SHARMA, S.; ARORA, A. Bioprospecting non-conventional yeasts for ethanol production from rice straw hydrolysate and their inhibitor tolerance. *Renewable Energy*, v. 147, p. 1694–1703, 2020.

OLIVEIRA, B. C. Complexidade em biorrefinarias. p. 125, 2016.

Organização das Nações Unidas (ONU). *Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável*, 2015. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: [27/06/2023].

ORIJ, Rick et al. In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology*, v. 155, n. 1, p. 268-278, 2009.

PAL, Suksham; MONDAL, Alok K.; SAHOO, Debendra K. Molecular strategies for enhancing microbial production of xylitol. *Process Biochemistry*, v. 51, n. 7, p. 809-819, 2016.

PALMQVIST, Eva; HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource technology*, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PARAJÓ, Juan Carlos; DOMÍNGUEZ, Herminia; DOMÍNGUEZ, JoséManuel. Biotechnological production of xylitol. Part 2: operation in culture media made with commercial sugars. *Bioresource technology*, v. 65, n. 3, p. 203-212, 1998.

PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production. *Critical reviews in biotechnology*, v. 31, n. 1, p. 20-31, 2011.

PEREIRA, Rogério Santos. Efeito do ácido acético, ácido ferúlico e siringaldeído sobre a bioconversão de xilose em xilitol. Faculdade de engenharia química de Lorena, Departamento de biotecnologia, São Paulo, 2007.

PEREIRA, Rogério S.; MUSSATTO, Solange I.; ROBERTO, Inês C. Inhibitory action of

toxic compounds present in lignocellulosic hydrolysates on xylose to xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 38, n. 1, p. 71-78, 2011.

PERNA, Michelle dos Santos Cordeiro; BASTOS, Reinaldo Gaspar; CECCATO-ANTONINI, Sandra Regina. Single and combined effects of acetic acid, furfural, and sugars on the growth of the pentose-fermenting yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *3 Biotech*, v. 8, p. 1-10, 2018.

PETRECHEN, G. P. Caracterização dos materiais lignocelulósicos da castanha do Brasil (*bertholletia excelsa*), preparação e caracterização de seus compósitos com polipropileno. [s.l.] Universidade federal de São Carlos, 2017.

PU, Yunqiao et al. The new forestry biofuels sector. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 2, n. 1, p. 58-73, 2008.

QUEIROZ, Sarah S. et al. Scaling up xylitol bioproduction: Challenges to achieve a profitable bioprocess. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 154, p. 111789, 2022.

RAMOS, Luiz Pereira. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v. 26, p. 863-871, 2003.

RODRIGUES, J. A. R. Do Engenho a Biorrefinaria. A Usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. *Química Nova*, v. 34, n. 7, p. 1242-1254, 2011.

ROSA, S. M. A. et al. Xylose reductase production by *Candida guilliermondii*. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 70, p. 127-135, 1998.

ROSILLO-CALLE, Francisco; BAJAY, Sergio Valdir; H.(ORG.) ROTHMAN. Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira. Unicamp, 2005.

SAINI, Jitendra Kumar; SAINI, Reetu; TEWARI, Lakshmi. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, v. 5, n. 4, p. 337-353, 2015.

SANTOS, C. et al. High xylose yield from stem and external fraction of sugarcane biomass by diluted acid pretreatment. *Biomass Conversion and Biorefinery*, p. 1-9, 2020.

SANTOS, Fernando A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química nova*, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SAPUTRA, H. et al. Efficiency of xylitol production from *Meyerozyma caribbica* Y67 with cell initiation and volume fermentation. In: *IOP conference series: earth and environmental science*. IOP Publishing, 2020. p. 012032.

SCHLITTNER, L. A. F. S. Engenharia de um Bioprocesso para a Produção de Etanol de Bagaço de Cana-de-açúcar. 2006. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

SENE, L. et al. Effects of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production by *Candida guilliermondii*. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 84, p. 371-380, 2000.

SERPA, Juliana de França. Produção da enzima xilose redutase por *Candida tropicalis* ATCC750 usando hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju. 2016.

SHLESER, R. Ethanol Production in Hawaii: Processes, Feedstocks, and Current Economic Feasibility of Fuel Grade Ethanol Production in Hawaii Prepared for State of Hawaii Department of Business, Economic Development & Tourism Final Report July, 1994.

SILVA, DDV et al. Influência da relação glicose/xilose na formação dos subprodutos glicerol e etanol durante a obtenção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana. In: Congresso brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável, Costão do Santinho–Florianópolis–Santa Catarina, Anais. 2004. p. 2293-2302.

SILVA, Mateus Ribeiro; PEREIRA, Adriana Rito; MAURÍCIO, DAYANE DAS NEVES. IMPACTOS SOCIAIS DA EXPANSÃO DOS LATIFÚNDIOS RELACIONADOS À AGROENERGIA NO ESTADO DE PERNAMBUCO. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, v. 16, n. 1, p. 75-88, 2019.

SOARES, Carlos Emanuel Vieira Flores. Caracterização fisiológica e comparação de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* na presença de diferentes inibidores presentes no hidrolisado lignocelulósico. Embrapa Agroenergia-Tese/dissertação (ALICE), 2021.

SOUSA, Maria João et al. Mechanisms underlying the transport and intracellular metabolism of acetic acid in the presence of glucose in the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology*, v. 144, n. 3, p. 665-670, 1998.

SOUZA-FILHO, Pedro Ferreira et al. Simultaneous saccharification and fermentation of cactus pear biomass—evaluation of using different pretreatments. *Industrial Crops and Products*, v. 89, p. 425-433, 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.

TADIOTO, Viviani et al. Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 38, n. 2, p. 1-14, 2022.

TRIANA, O. et al. El bagazo de la caña de azúcar. *Atlas del Bagazo de la Caña de Azúcar*. Cuba-9, GEPLACEA, PNUD, ICIDCA, p. 39-44, 1990.

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.

YAASHIKAA, P. R. et al. A biotechnological roadmap for decarbonization systems

combined into bioenergy production: Prelude of environmental life-cycle assessment. *Chemosphere*, p. 138670, 2023.

YAHASHI, Y. et al. D-glucose feeding for improvement of xylitol productivity from D-xylose using *Candida tropicalis* immobilized on a non-woven fabric. *Biotechnology letters*, v. 18, p. 1395-1400, 1996.

YAMAKAWA, Celina K.; QIN, Fen; MUSSATTO, Solange I. Advances and opportunities in biomass conversion technologies and biorefineries for the development of a bio-based economy. *Biomass and bioenergy*, v. 119, p. 54-60, 2018.

YAMAKAWA, Celina K. et al. Exploiting new biorefinery models using non-conventional yeasts and their implications for sustainability. *Bioresource technology*, v. 309, p. 123374, 2020.

ZACCHI, Guido. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology progress*, v. 19, n. 4, p. 1109-1117, 2003.

ZAMPIERI, Denise. Expressão do complexo celulolítico em *Penicillium echinulatum*. 2011.

ZHANG, Hongdan et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse with ferric chloride pretreatment and surfactant. *Bioresource Technology*, 2017.



Article

Meyerozyma caribbica Isolated from Vinasse-Irrigated Sugarcane Plantation Soil: A Promising Yeast for Ethanol and Xylitol Production in Biorefineries

Bárbara Ribeiro Alves Alencar ^{1,2,†}, Renan Anderson Alves de Freitas ^{2,†}, Victor Emanuel Petricio Guimarães ³, Rayssa Karla Silva ^{2,3}, Carolina Elstein ², Suzyanne Porfírio da Silva ¹, Emmanuel Damilano Dutra ¹, Marcos Antonio de Moraes Junior ^{2,*} and Rafael Barros de Souza ^{3,*}

¹ Laboratory of Biomass Energy, Department of Nuclear Energy, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil; barbara.ribeiro.dbbs@gmail.com (B.R.A.A.); suzyaneeporfirio@gmail.com (S.P.d.S.); emmanuel.dutra@ufpe.br (E.D.D.)

² Laboratory of Microbial Genetics, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil; renan_anderson@hotmail.com (R.A.A.d.F.); raayssa.karla@gmail.com (R.K.S.); carolinaelstein@gmail.com (C.E.)

³ Laboratory of Microbial Metabolism, Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Recife 50110-000, Brazil; victor.petricio@ufpe.br

* Correspondence: marcos.moraisjr@ufpe.br (M.A.d.M.J.); rafael.souza@upe.br (R.B.d.S.); Tel.: +55-91-991725917 (M.A.d.M.J.); +55-81-985213505 (R.B.d.S.)

† These authors equally contributed to this work.



Citation: Alencar, B.R.A.; de Freitas, R.A.A.; Guimarães, V.E.P.; Silva, R.K.; Elstein, C.; da Silva, S.P.; Dutra, E.D.; de Moraes Junior, M.A.; de Souza, R.B. *Meyerozyma caribbica* Isolated from Vinasse-Irrigated Sugarcane Plantation Soil: A Promising Yeast for Ethanol and Xylitol Production in Biorefineries. *J. Fungi* **2023**, *9*, 789. <https://doi.org/10.3390/jof9080789>

Academic Editor: Laurent Dufosse

Received: 20 June 2023

Revised: 12 July 2023

Accepted: 24 July 2023

Published: 26 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The production of fuels and other industrial products from renewable sources has intensified the search for new substrates or for the expansion of the use of substrates already in use, as well as the search for microorganisms with different metabolic capacities. In the present work, we isolated and tested a yeast from the soil of sugarcane irrigated with vinasse, that is, with high mineral content and acidic pH. The strain of *Meyerozyma caribbica* URM 8365 was able to ferment glucose, but the use of xylose occurred when some oxygenation was provided. However, some fermentation of xylose to ethanol in oxygen limitation also occurs if glucose was present. This strain was able to produce ethanol from molasses substrate with 76% efficiency, showing its tolerance to possible inhibitors. High ethanol production efficiencies were also observed in acidic hydrolysates of each bagasse, sorghum, and cactus pear biomass. Mixtures of these substrates were tested and the best composition was found for the use of excess plant biomass in supplementation of primary substrates. It was also possible to verify the production of xylitol from xylose when the acetic acid concentration is reduced. Finally, the proposed metabolic model allowed calculating how much of the xylose carbon can be directed to the production of ethanol and/or xylitol in the presence of glucose. With this, it is possible to design an industrial plant that combines the production of ethanol and/or xylitol using combinations of primary substrates with hydrolysates of their biomass.

Keywords: cactus; hydrolysate; lignocellulose; mixed substrate; non-conventional yeast

1. Introduction

The use of lignocellulosic biomass to produce biofuels, thermal and electrical energy, fertilizers, biomaterials, and high added value chemicals has been a strategy to reduce greenhouse gas emissions and reduce the negative impact of climate change [1]. It is estimated that 181.5 billion tons of lignocellulosic biomass are produced in the world, which clearly indicates the importance of this bioresource for humanity [2]. However, the technical, economic, social, and environmental feasibility of using lignocellulosic biomass has been questioned, especially when production arrangements operate for the production of few products with low added value. To improve these indicators, the concept of biorefineries emerged to convert all lignocellulosic biomass fractions and process by-products into

energy, biofuels and high value-added bioproducts [3–5]. Solarte-Toro and Alzate [6] have recently published a very interesting review on the concept, design and critical points relating to biorefineries. Among the points of discussion raised, the use of multifeedstock appears as one of the relevant factors to be considered.

An example of biorefineries is the successful case of first-generation ethanol production in Brazil, where the predominant raw material is sugarcane with a harvest of approximately 631 million tons per year [7]. Its processing generates the production of sugar and ethanol (28 billion liters) and its by-products are bagasse (180 million tons), straw (203 million tons), filter cake (24 million tons) and vinasse (420 billion liters). These by-products are already used in the production of thermal and electrical energy, as fertilizer in the crop field and in the production of biogas [8]. Despite this, many studies seek to take advantage of the chemical composition of these biomasses to improve the production of biofuels and new products, such as studies with fractioning of sugarcane bagasse components [9,10].

In addition to sugarcane biomass, other sources of biomass are beginning to gain ground in some regions of Brazil, such as the production of ethanol from corn in the Midwest and research into sweet sorghum [11] in Northeast Brazil. All these biomasses have cellulose, hemicellulose, and lignin fractions in the composition of the plant cell wall and that can be used in biorefinery arrangements [2,3,6,12]. Recently, we have shown the potential of sweet sorghum bagasse as energy biomass that can be considered in this biorefinery context as well [13–15].

In addition to these conventional lignocellulosic biomasses, our inter-laboratory research group has also studied the potential of pectin-rich biomasses, such as those from the *Opuntia* and *Neopala* cacti, for ethanol production from the hydrolysis of the prickly pear cladodes [16,17]. The hydrolysis of its biomass generates a substrate rich in glucose that can be fermented by *Saccharomyces cerevisiae* at high yield [16]. However, this is no bagasse production in this case, which makes unprofitable the production of ethanol solely using this biomass. Therefore, the cactus hydrolysate serves as complement in mixture with more conventional substrates, such as sugarcane and sweet sorghum. The main advantages for the use of these substrates relies on the lower demand for water, especially the cactus, than sugarcane. It means that areas already degraded with low supply of water could be explored instead of natural areas and stop deforestations.

In addition to the search for different substrates, the concept of biorefineries also presupposes the search for strains of microorganisms capable of using the different sugars present in these substrates, as well as producing different products [2,3]. In the case of biomass such as bagasse and wood derivatives, the released xylose can be converted to ethanol or partially reduced to xylitol [2]. This use will depend on the microorganisms with capacity to metabolise this pentose. Several yeast species stand out as capable candidates for producing many of those products [18–21], such as the yeast *Meyerozyma caribbica* [22]. This is the new epithet of *Pichia caribbica* and the teleomorph of *Candida fermentati* (Division Ascomycota, class Saccharomycetes, order Saccharomycetales, family Debaryomycetaceae—Index Fungorum). This yeast has been isolated from soils around the world [23] and in the phylloplane of sugarcane leaves in different provinces of Thailand [24]. It was also isolated from rotting corn samples [22], among other niches worldwide. It was identified in the yeast population of the industrial fermentation processes for fuel-ethanol production in northeast Brazil that use sugarcane juice and/or molasses as substrate [25], as well as in the fermentation process to produce cachaça spirit from sugarcane juice substrate in stills in the state of Pernambuco, northern Brazil [26]. This is one the species found in high abundance in coffee fermentation [27]. It was isolated from the nectar of tropical flowers of India, being the better xylitol producer of that osmotolerant yeast community [28], as well as from the ripe fruits of camu-camu plant from the Brazilian Amazon [29]. Therefore, this species presents a promising biotechnological potential, serving as a biofactory to produce ethanol from cellulose-derived glucose and ethanol and/or xylitol from hemicellulose-derived xylose. The metabolic pathway taken by the cells, whether producing ethanol or xylitol, is directly linked to the availability of oxygen. The objective of this work was to evaluate

the potential of the yeast *M. caribbica*, isolated in sugarcane soil irrigated with vinasse, to produce first- and second-generation ethanol as well as xylitol.

2. Materials and Methods

2.1. Soil Characteristics and Sampling

Soil samples were taken in March 2019 from sugarcane plantations in the surroundings of the Japungu Agroindustrial distillery, municipality of Santa Rita, Paraíba state, Brazil (latitude: -7.11631 ; longitude: -34.9812 ; south: $7^{\circ} 6' 59''$; west: $34^{\circ} 58' 52''$). The region is basically formed from an oxisols, generally composed by iron oxides, quartz and kaolinite, a clay mineral highly weathered, with average pluviometry of $115 (\pm 6)$ mm and daily air temperature variation from 23 to 35°C in the sampling period. The soil was constantly irrigated with the vinasse resulting from distillation of the fermented must. In that particular distillery of study, sugarcane harvesting goes from July to January and the fermentation process uses cane juice as substrate. However, the fermentation process extends to March mostly using the molasses coming from food sugar production as fermentation substrate. It means that at the time of sampling, the soil had been irrigated with molasses-based vinasse, whose average composition was: pH = $4.6 (\pm 0.6)$, biochemical oxygen demand = $22.4 \text{ gO}_2/\text{L} (\pm 3.6)$, chemical oxygen demand = $55 \text{ gO}_2/\text{L} (\pm 14)$, total solids = $67.1 \text{ g/L} (\pm 20.3)$, volatile solids = $30 \text{ g/L} (\pm 14.1)$, total carbon = $17.5 \text{ g/L} (\pm 7.6)$, total nitrogen = $1.16 \text{ g/L} (\pm 0.64)$, C/N ratio = 16.3 , potassium = $6.2 \text{ g/L} (\pm 2.28)$, sulfur = $5.06 \text{ g/L} (\pm 1.89)$, calcium = $4.87 \text{ g/L} (\pm 0.43)$, magnesium = $1.11 \text{ g/L} (\pm 0.58)$, phosphorus = $245 \text{ mg/L} (\pm 63.7)$ (data from the period of vinasse irrigation kindly provided by the distillery). It means that the yeasts in the soil were exposed and tolerant to high concentration of minerals, especially to potassium, sulfur and calcium in combination.

2.2. Soil Processing and Yeast Isolation

Samples were taken in ten different spots of each area, in 0–20 cm deep that were mixed in sterile plastic bags and transported to the lab in thermic boxes under refrigeration ($2\text{--}8^{\circ}\text{C}$). The amount of 50 g of the soil blend was suspended with 250 mL of Wallerstein Nutrient (WLN) broth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) containing a mix of the antibiotic ampicillin, chloramphenicol and nalidixic acid at $100 \mu\text{g/mL}$ each and cycloheximide at 5 mg/L in 500 mL flasks. The suspensions were incubated for 24 h at 30°C under orbital agitation of 160 rpm for enrichment in non-*Saccharomyces cerevisiae* yeasts. Afterwards, the suspensions were submitted to serial dilutions with 0.85% sterile NaCl 0.9% w/v solution and 100 mL of each dilution were plated on synthetic medium containing 1.7 g/L yeast nitrogen base (YNB) without amino acids and ammonium (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA), 20 g/L glucose and 5 g/L ammonium sulphate, supplemented with antibiotics and cycloheximide as above. The plates were incubated for five days at 30°C . The colonies were transferred for YPD plates (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L glucose and 20 g/L bacto-agar) and incubated for more five days at 30°C . Colonies were separated by morphological inspection and checked for purity.

2.3. Yeast Molecular Identification

Selected yeast colonies were identified by molecular analysis. Cells of each isolate were cultivated in YPD medium for 16–18 h at 30°C at 160 rpm and used for DNA extraction [25]. Samples of one mL were transferred to 1.5 mL microtubes, and cells were harvested by centrifugation. The supernatant was thrown out and the cell pellets suspended with 600 μL of extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.0; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8.0). Sodium dodecyl sulphate (SDS) was added to 10% (w/v) to each suspension and homogenised by vortexing. Then, the tubes were incubated at 65°C for 10 min, with constant homogenisation. The lysates were centrifuged for 5 min at 10,000 rpm at 4°C . A volume of 500 μL of the supernatants was transferred to new microtubes and mixed with 500 μL of extraction buffer and 10 μL Proteinase K solution (10 mg/mL). Following the incubation for 30 min at 56°C , 425 μL of the lysate was transferred to the cartridges of DNA

IQ Casework Pro Kit (Promega, Madison, WI, USA) for DNA purification in Maxwell® 16 device (Promega) according to manufacturer instruction. Purified DNA was eluted with 50 µL elution buffer, quantified in Nanodrop equipment (Thermo scientific, Waltham, MA, USA) and checked for integrity in 1% agarose gel using 0.5x Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer.

Yeast isolates were identified using molecular markers previously described [25,26]. Total DNA was subjected to amplification of the ITS1-5.8s-ITS2 locus using the primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAA-3') and the D1/D2 variable domains of the rDNA 26S gene using the primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') in 25 µL PCR reactions containing: 1.25 mM MgCl₂, 10 mM each dNTP, 0.5 U Taq DNA polymerase, 5 mM each primer and 50 ng DNA. The cycling parameters were: initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles of 94 °C/30 s for denaturation, 55 °C/1 min for annealing and 72 °C/1 min for polymerization, with final extension at 72 °C for 5 min. The amplicons were checked for integrity in 1% agarose gel electrophoresis in 0.5x TBE buffer and then purified using Wizard® PCR Preps DNA Purification System kit (Promega) following the manufacturer instructions. Samples were sent to the DNA sequencing and gene expression platform in the Centre of Biosciences of the Federal University of Pernambuco for sequencing in ABI Prisma 3500 devices. The chromatograms were analysed with the use of the BioEdit (v7.2.6) software and the clean nucleotide sequences used for yeast identification with the BLASTn tool in the GeneBank at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (accessed on 10 July 2023)). Molecular identification used the criterion indicated for industrial yeast identification [26].

For phylogenetic analysis, these sequences were aligned in the online interface MAFT v.7 software [30] and manually edited in MEGA v.7 software. Afterwards, the sequences were submitted Bayesian analysis with that aid of MrBayes 3.2.7 software [31] available in the CIPRES Science Gateway portal [32], with the substitution models generated with MrModel 2.3 software [33]. Maximum-likelihood phylogeny was constructed using RAxML v7.2.8 6 available in XSEDE 8.2.12 accessed from the CIPRES Science Gateway portal [34]. Standard patterns were conducted with 1000 replicates of bootstrap. The phylogenetic tree was visualised in FigTree v.1.44 software.

2.4. Physiological Tests

Yeast isolates were cultivated in YPD as above and cell suspension were prepared in NaCl 0.9% *w/v* solution to around 1.0 absorbance unit at 600 nm (A₆₀₀). Dilutions of 10× and 100× of the cell suspensions were prepared in NaCl 0.9% *w/v* solution and 10 µL of each dilution were spotted on selective plates composed of 1.7 g/L YNB plus a carbon source (20 g/L glucose or xylose) and a nitrogen source (5 g/L ammonium sulphate). To test for acid tolerance, yeast cells were inoculated in YNB containing glucose and ammonium sulphate and adjusted to different pH values with sulphuric acid (50% *v/v* solution).

The growth capacity of *M. carribica* was evaluated in different fermentation media composition (Table 1). For the assays, the yeast was previously grown in YPD medium (2% *w/v* glucose, 2% *w/v* peptone, and 1% *w/v* yeast extract) for 24 h. After that, the microbial suspension was centrifuged at 3600 rpm for 5 min. Afterward, the cells were washed three times with 0.9% *w/v* NaCl and centrifuged (3600 rpm; 5 min) to remove the dirty liquid between each wash. After that, the cells were transferred to the different substrates to the initial concentration of 0.1 A₆₀₀. The cultivations were performed in orbital shakers for 24 h, at 30 °C and 200 rpm. Biomass production was quantified by direct inspection of media absorbance variation. All experiments were performed in biological triplicates.

Table 1. Composition of fermentation substrates and blends.

Substrate	TFC	Total N	Conductivity		Composition			
	(g/L)	(%)	C/N	(ms/cm)	ML	SCB	SSB	CPB
ML	107.51	4.01	160.8	33.1	100%	--	--	--
SCB	21.27	1.81	70.5	122.0	--	100%	--	--
SSB	17.96	1.96	55.0	109.8	--	--	100%	--
CPB	64.09	4.21	91.4	57.0	--	--	--	100%
M1	127.42	3.21	238.2	54.7	70% *	10%	10%	10%
M2	94.66	3.31	171.6	64.8	50% *	16.7%	16.7%	16.6%
M3	52.31	2.46	127.5	83.8	25% *	25%	25%	25%
M4	306.97	6.76	272.5	29.9	50%	16.7%	16.7%	16.6%
M5	108.8	5.11	127.7	56.4	25%	25%	25%	25%
M6	36.63	3.26	67.4	93.4	10%	30%	30%	30%

Abbreviations: TFC—Total fermentable carbohydrates; ML—Molasses; SCB—sugarcane bagasse hydrolysate; SSB—sweet sorghum bagasse hydrolysate; CPB—cactus pear biomass hydrolysate. * Molasses was diluted six times before being mixed with the SCB, SSB, and CPB hydrolysates.

2.5. Acid Hydrolysates Production and Molasses

Hydrolysates of sugarcane and sweet sorghum bagasses and *Opuntia* were produced by applying a solid load of 10 *w/v* for bagasse and 15% *w/v* for *Opuntia*. For this, a solution of 1.5% *v/v* of H₂SO₄ was used [35]. The flasks containing the biomass and the acid solution was kept in an autoclave for 30 min at 121 °C and 1 atm. After cooling, the suspension was centrifuged at 3600 rpm, for 5 min, with the liquid fraction, which is rich in carbohydrates, was collected and stored in a freezer at −20 °C. The molasses was kindly provided by the Ipojuca Agroindustrial distillery, located in the municipality of Ipojuca, Pernambuco, Brazil.

2.6. Fermentation Assays

Yeast cells were cultivated in YPB broth by successive batches to produce enough biomass. Then, they were collected by centrifugation and washed with NaCl 0.9% *w/v* solution. Fermentation substrates were composed by YNB broth containing 5 g/L ammonium sulphate and the carbon sources (40 g/L glucose or xylose alone or a mixture of glucose and xylose at 20 g/L each). Each substrate was inoculated with yeast biomass to around 100 g/L and fermentations were performed at 30 °C without agitation for up to 120 h. Samples were taken, centrifuged and the supernatant filtered in 0.22 µm Millipore filters. Every fermentation was performed in biological triplicates, with technical duplicates each. Metabolic flux distribution models were prepared according to Teles et al. [36], taking in account the input of carbon from the consumed sugar and the metabolic NADPH requirement to assimilate the consumed xylose.

Fermentation experiments using sugarcane juice, sugarcane molasses, plant biomass hydrolysates were performed as previously reported in our previous works [11,13,14,16,19,37,38]. In addition, mixed substrates were prepared according to Table 1 without nutritional supplementation. In brief, the yeast cells were cultivated in YPD medium at 30 °C and 200 rpm for 24 h. The cells were collected and resuspended in the same volume of fresh medium for further cultivation. This procedure was repeated until reaching enough biomass for the fermentation experiments. Then, the cells were collected and re-suspended in the fermentation substrate to initial biomass of 100 g/L. Static incubations at 30 °C lasted for different times according to the substrate. Whenever necessary, the flasks were slightly agitated at 70 rpm in rotatory shaker. Samples were withdrawn at indicated intervals, depending on the type of substrate, centrifuged and the supernatant stored for metabolites quantifications. *Saccharomyces cerevisiae* industrial strain JPI was used as reference [11,13,16]. All experiments were performed in biological triplicates.

For the quantification of total nitrogen, 20 mL of the fermentative substrates were added in a test tube, which was attached to the apparatus. In a 125 mL Erlenmeyer flask,

10 mL of boric acid solution, with indicator, was pipetted. Into the distiller's beaker, 10 mL of 13N NaOH will be pipetted. The sample was distilled to a volume of 50 mL. The distillate was titrated with 0.07143 N HCl until it turned from green to dark pink. Conductivity was determined by measuring with a conductivity meter. All experiments were performed in biological triplicates with technical triplicates each.

2.7. Substrate Detoxification

The detoxification of the sugarcane bagasse hydrolysates and substrate blends were performed with the application of biochar produced from the sugarcane bagasse. For this, the sugarcane bagasse was kept in a pyrolyzer for 1h at 600 °C. After that, the biochar produced was kept in hermetically sealed glass and protected from light. The detoxification assays were performed according to Ahuja et al. [39], with the following adaptations: 10% *w/v* biochar loading in the substrates and incubation shaker for 3 min at 100 rpm and 25 °C, followed by substrate centrifugation at 3600 rpm for 5 min. The detoxified substrates were recovered and used in the fermentation assays as above.

2.8. Effect of Acetate on Fermentation

Fermentation assays were carried out for evaluated the effect of acetic acid in the fermentative metabolism of *M. caribbica*. For that, experiments were performed using YP medium contend glucose and xylose as carbon sources in the proportion of 1:5 (total of 80 g/L of carbon sources). Yeast cell were pre cultivated in YPD medium at 30 °C and 200 rpm for 24 h. The cells were collected and resuspended in the YPD medium contend 1.6 and 3 g/L of acetic acid to initial biomass of 50 g/L. The flasks were incubated at 30 °C with slightly agitation at 70 rpm in rotatory shaker. Samples were collected every 24 h for 120 h for metabolites quantifications. The assays were performed in biological triplicate.

2.9. Analytical Methods

Consumed sugar and other metabolites (glycerol, xylitol, acetic acid and ethanol) were identified by HPLC in Agilent Technologies 1200 Series device with a refractive index detector (RID), using HPX87H+ column (BioRad, Hercules, CA, USA) and mobile of 5 mM sulphuric acid at 45 °C. Calibration curves of standard metabolites were used for quantification and fermentative parameters were calculated.

2.10. Statistical Analysis

Values in the graphics and table represent the arithmetic mean ($\pm$ standard deviation). The results were subjected to variance analysis (ANOVA) and were compared by the Tukey test ($\alpha = 0.05$) using the software ASSISTAT v1.0 (Informer Technologies, Inc., <https://assistat.software.informer.com/> (accessed on 10 July 2023)).

3. Results

3.1. Yeast Isolation and Identification

In the present work, we screened the yeast population in the soil of sugarcane plantations irrigated with vinasse, which turns those soils with high loads of minerals that can be toxic for most microorganisms. Following a series of dilutions and spreading in WLN medium, colonies of given morphotypes were isolated, checked for purity and submitted to molecular identification by 26S rDNA sequencing. Fives isolates were identified as *M. caribbica* (Figure 1). Phenotype quantitative tests showed that all *M. caribbica* isolates could grow aerobically on plates containing glucose or xylose as the single carbon source and the isolates W13, 53T2, RAC and RAF grew in medium adjusted to pH 2.5 with sulfuric acid. Then, the isolated RAC stood out as the most acid tolerant among the isolated yeasts and was chosen for further analysis. This isolated was deposited at the Department of Mycology Culture Collection (URM-Recife), Federal University of Pernambuco, which is part of the World Directory of Collections of Culture of Microorganisms (WFCC) under

registration number 604 and can be released for research purposes upon request. This yeast was henceforth designated strain URM 8365 (Figure 1).

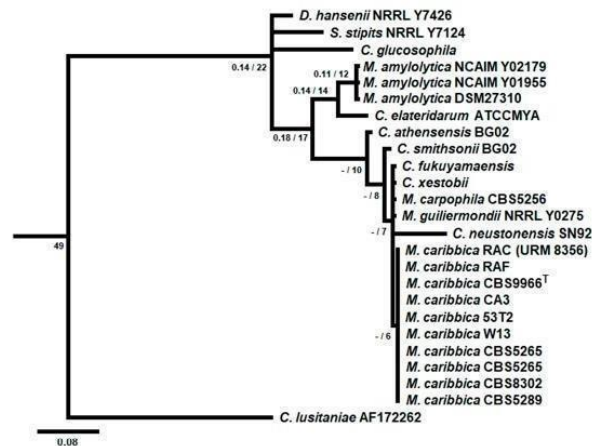


Figure 1. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequence of D1/D2 domain of the 26S rRNA gene for the identification of yeast isolated from the vinasse-irrigated sugarcane plantation soils.

3.2. Ethanol Fermentation of Mineral Medium and Carbon Distribution Analysis

Fermentation assays in the mineral medium were carried out to evaluate the ethanol production by *M. caribbica* URM8365 from glucose and xylose as carbon sources. The results showed that all glucose was consumed and produced ethanol to a yield of 0.43 g/g and the glycerol was also detected as a by-product of fermentation (Table 2). On the other hand, all initial xylose was detected at the end of fermentation (Table 2). This result contrasts with the experiments of aerobic growth on a plate, revealing the incapacity of this yeast to assimilate xylose when the oxygen supply is limited or absent. Then, glucose and xylose were mixed to approximately the same initial concentration. In this case, glucose was exhausted while only 21.7% of the initial xylose was consumed (Table 2). No xylitol was detected under this oxygen-limitation condition, while ethanol was the unique fermentation product. However, the final ethanol yield was calculated as 0.55 g/g if only glucose uptake was taken into consideration, above the maximal theoretical of 0.51 g/g. It indicated that part of the consumed xylose was also transformed to ethanol.

Table 2. Fermentative parameters of *Meyerozyma caribbica* URM8365 isolated from vinasse-irrigated sugarcane plantation soil in synthetic medium containing different sugars.

Parameter	Glucose	Xylose	Glucose + Xylose
Initial glucose (g L ⁻¹)	37.85 (±0.90)	-	17.00 (±0.23)
Initial xylose (g L ⁻¹)	-	38.82 (±0.96)	18.95 (±0.20)
Final glucose (g L ⁻¹)	0.0 (±0.00)	-	0.0 (±0.00)
Final xylose (g L ⁻¹)	-	38.62 (±0.99)	14.84 (±0.31)
Ethanol produced (g L ⁻¹)	16.19 (±1.09)	0.00	9.29 (±1.73)
Glycerol produced (g L ⁻¹)	0.67 (±0.12)	0.00	0.00
Ethanol yield (g/g)	0.43 (±0.03)	0.00	0.44 (±0.04)
Glycerol yield (g/g)	0.02 (>0.00)	0.00	0.00
CO ₂ yield (g/g) *	0.41	0.00	0.42
Biomass yield (g/g)	0.03	0.00	0.09
Carbon balance (%)	89%	0.00	95%

* Stoichiometrically calculated from ethanol [36].

To calculate how much of xylose was fermented, we simulated a metabolic model taking into consideration that the amount of 28 mmol (4.11 g) xylose that was consumed by

the cells would require 28 mmol of NADPH for the first enzymatic step of xylose reductase that converts xylose to xylitol (Figure 2). This reducing equivalent can be produced by the deviation of part of glucose-6P to the Pentose Phosphate Pathway (PPP) or via the acetaldehyde dehydrogenase in the Pdh bypass pathway [36]. Since acetate was not detected (Table 2), then we considered that NADPH was the majority produced by the PPP with the metabolization of 14 mmol of glucose (Figure 2). In this case, the sum of metabolites flowing directly through glycolysis with those metabolites returning from PPP would produce 181 mmol of ethanol, resulting in a yield of 0.49 g ethanol per gram of glucose. This is 13% above the yield calculated from glucose alone (Table 2). In parallel, the 28 mmol of xylose consumed would produce 14 mmol of ethanol from glyceraldehyde-3P. The theoretical production of 195 mmol (9.02 g) of ethanol and the ethanol yield of 0.43 g/g was in the range of the experimental ethanol concentration of 9.29 g/L (± 1.73) and yield of 0.44 g/g (Table 2). Therefore, the ethanol yield from xylose was calculated as 0.16 g/g. The major concern about this metabolic adjustment regards the surplus of NADH produced by xylitol oxidation (Figure 2). Taking the fact that xylose has been consumed and no xylitol was detected, this unbalanced redox state was somehow surpassed by the yeast metabolism. Hence, it was plausible to suppose that the excess of 28 mmol of NADH might be used together with 14 mmol of fructose-6P from xylose and 38 mmol of ammonium from the medium to produce biomass. This hypothesis was experimentally supported by the production of twice more biomass at the end of fermentation in a sugar mix medium (2.09 g) than in a glucose medium (1.13 g) (Table 2). Thus, xylose consumption in oxygen limitation might be dependent on the presence of some glucose in the substrate.

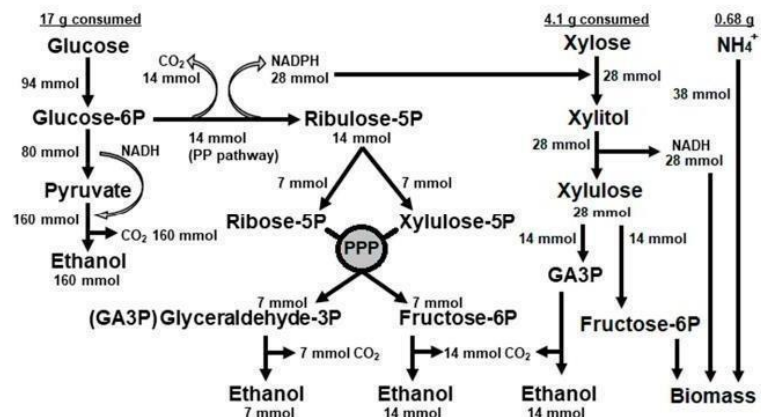


Figure 2. Metabolic model for carbon distribution in the central metabolism of *Meyerozyma caribbica* URM 8365 based on the physiological parameters calculated from the fermentation assays in mineral medium containing mixture of glucose and xylose. Stoichiometric calculations were performed according to Teles et al. [33].

3.3. Ethanol Fermentation of Industrial Substrates

Fermentation experiments were performed in molasses as the reference of industrial substrate for first-generation fuel ethanol (Figure 3A). Complete consumption of sucrose was achieved at six hours of fermentation, followed by glucose. Fructose concentration was raised during sucrose consumption, indicating that the cells secrete the enzyme invertase and, therefore, sucrose hydrolysis occurs in the medium (Figure 3A). All sugar was completely consumed at 72 h of fermentation to produce 46 g/L of ethanol and 5 g/L of glycerol (Figure 3A), with respective yields of 0.39 g/g and 0.04 g/g. It was compared to fermentation of a defined mineral medium used as reference of laboratory condition (Figure 3B). The results were physiologically like molasses after seven hours of fermentation: external hydrolysis of sucrose with transient fructose accumulation, ethanol yield of 0.38 g/g and glycerol yield of 0.04 g/g. These results indicated that *M. caribbica* URM

8365 can efficiently ferment molasses without suffering the interference of any possible inhibitors present at average levels in the substrate.

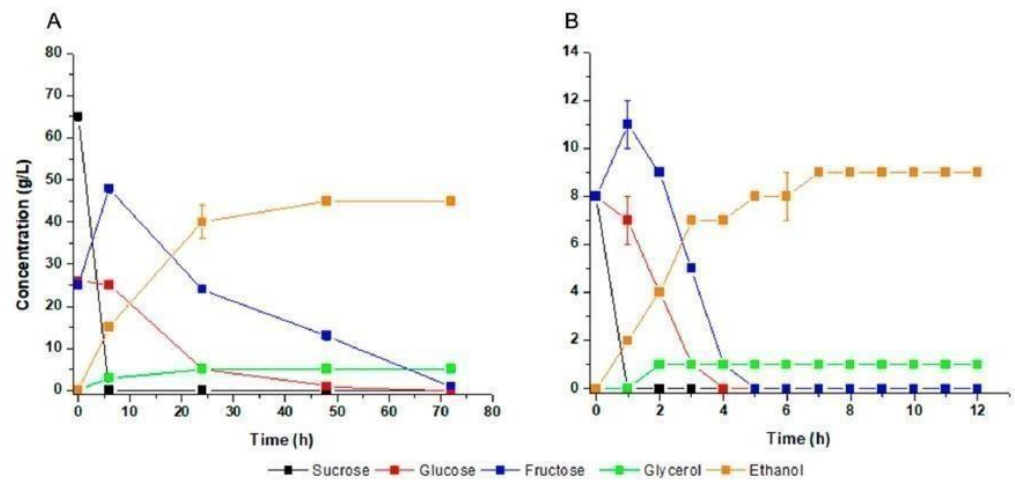


Figure 3. Fermentation profile of *Meyerozyma caribbica* URM 8365 in sugarcane molasses (A) and in mineral medium containing sucrose (B).

Afterwards, hemicellulose hydrolysates were tested as substrates for second-generation fuel ethanol. The hydrolysis produced substrates with xylose:glucose ratios of 7:1 for sugarcane bagasse (Figure 4A) and 2.5:1 for sweet sorghum (Figure 4B). In both cases, all glucose was consumed resulting in ethanol yields of 0.42 g/g and 0.45 g/g for sugarcane and sweet sorghum, respectively. These values were higher than those calculated for molasses and mineral medium. On the other hand, xylose remained untouched in these substrates. The explanation rested on the presence of the acetic acid in the hydrolysates, an already-known inhibitor of xylose metabolism. The concentration of this acid was between 2 to 3 g/L (34 to 50 mM) in the hydrolysates (Figure 4A,B). Thus, the challenge is to remove most of the acetate by physical procedures or to dilute it by mixing the hydrolysates with other substrates.

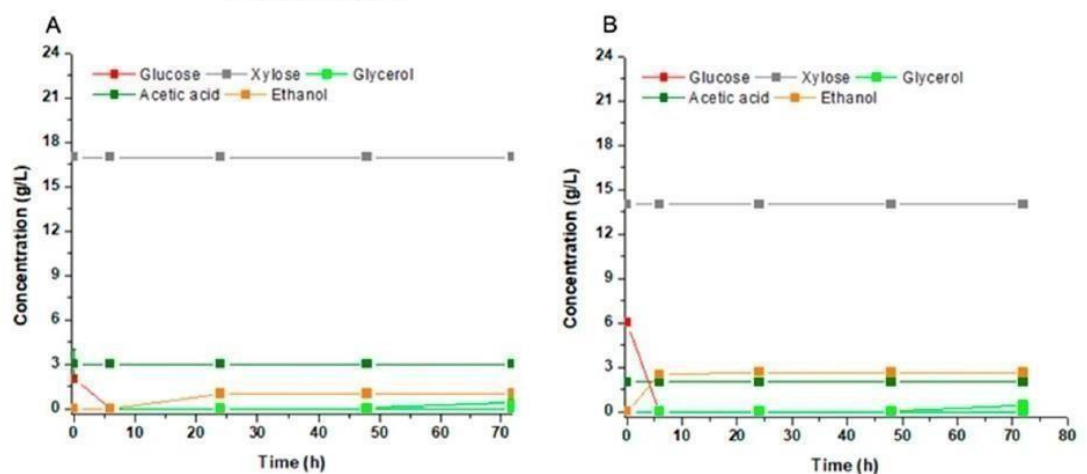


Figure 4. Fermentation profile of *Meyerozyma caribbica* URM 8365 in acid hydrolysates of sugarcane (A) and sweet sorghum (B) bagasses.

The glucose-rich cactus pear hydrolysate was fermented by *M. caribbica* URM 8365 cells. All glucose was consumed in six hours to produce 27 g/L of ethanol, with a final yield of 0.49 g/g.

3.4. Fermentation of Mixed Industrial Substrates

The results above showed that *M. caribbica* URM 8365 fermented biomass hydrolysates at even higher efficiency than molasses. However, it is not feasible to concept an ethanol industry based solely on these alternative substrates. Instead, the idea is to incorporate these hydrolysates into the conventional sugarcane-based matrix, especially considering the use of molasses produced from the crystal sugar milling process. Based on this, a series of combinations were prepared by mixing sugarcane molasses and bagasse hydrolysates (Table 1). The influence of these compositions on cell physiology was first tested in aerobic cultures (Figure 5). The results showed a higher cell growth in the molasses than in the hydrolysates, which might rely on the difference of nitrogen content since the hydrolysates were not supplemented with nutrients. In a way, it helped to explain the highest ethanol yields on the hydrolysates. The final yeast biomass achieved in the blends depends on the proportion of molasses in the mixture. The lowest growth was observed with the blends M4 and M5 (Figure 5), which might be the consequence of the high gravity condition above 300 g/L of sugar in the mixture. No significant difference in yeast growth was observed when the substrates were supplemented with ammonium, except for M4 and M5 where it at least doubled the final yeast biomass (Figure 5).

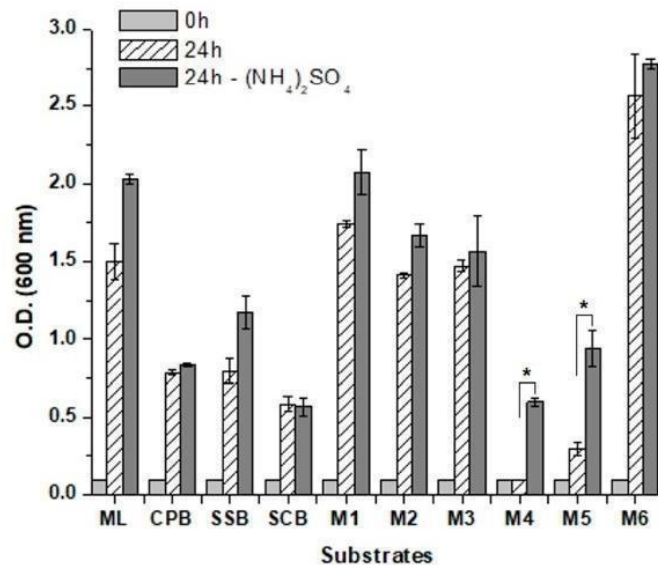


Figure 5. Aerobic growth of *Meyerozyma caribbica* URM 8365 in sugarcane molasses (ML), in hydrolysates of cactus pears (CPB), sugarcane (SCB) or sweet sorghum (SSB) and different mixtures of these substrates (M1 to M6) as described in Table 1. Optical density of the cultures was measured at the beginning (light grey columns) and after 24 h (striped columns) and 48 h (dark grey columns). * Significant difference at $\alpha < 0.01$.

The fermentation profiles using these different blends showed that all hexoses were consumed by the yeast cells, except for glucose and fructose in M4 (Figure 6D) and M5 blends (Figure 6E). These sugars accumulated in the substrate probably due to the paralysis of the carbon flux by the central metabolism due to the imbalance of nitrogen, as indicated by the aerobic growth experiments (Figure 5). Ethanol was produced in all conditions almost proportional to the initial sugar concentration (Figure 6; Table 3). However, the calculated final ethanol production was lower when the sugar content was very high.

The effect is particularly relevant when intending to ferment at high gravity with higher input of molasses. Xylose concentration was only relevant in M1 to M3 blend, where it surpassed 2.5 g/L, but it was not used by the yeast cells in fermentation (Figure 6A–C). The hypothesis in this case was the absence of oxygen in the fermentation condition. All xylose was consumed when the flasks were gently agitated at 70 rpm. in an orbital shaker resulting in xylitol production. Therefore, improvements were necessary to adequate the production of ethanol and xylitol in the concept of a biorefinery that uses any of these substrates.

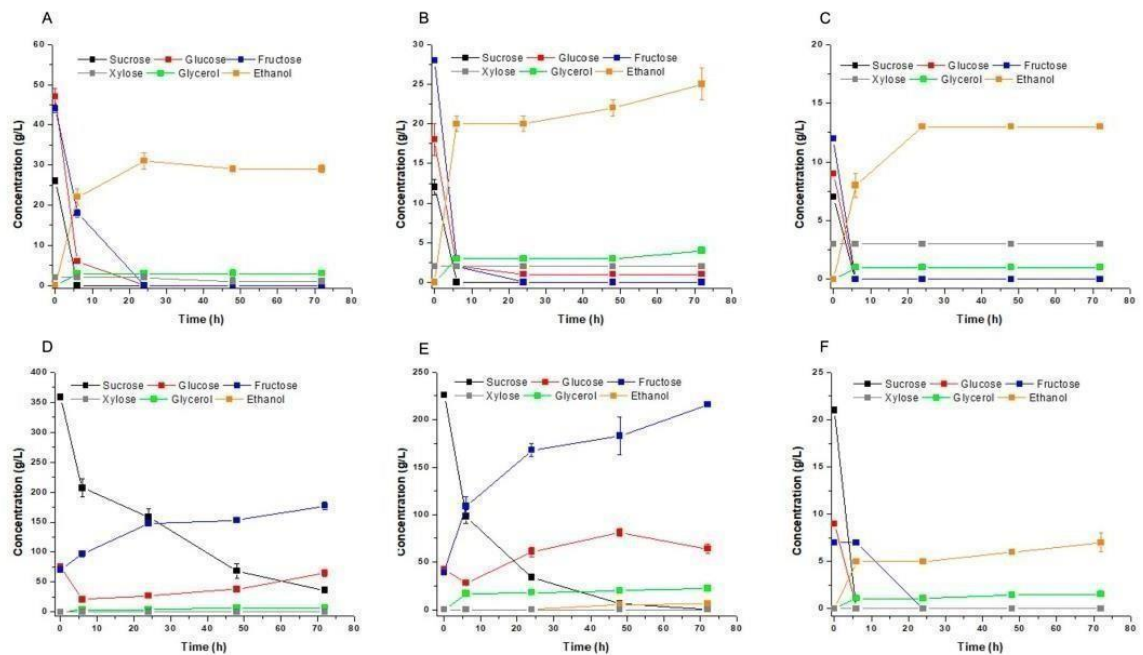


Figure 6. Fermentation profile of *Meyerozyma caribbica* URM 8365 in different mixtures of substrates M1 (A), M2 (B), M3 (C), M4 (D), M5 (E) and M6 (F) prepared as described in Table 1.

Table 3. Fermentation parameters of *Meyerozyma caribbica* URM 8365 in mineral medium containing a mixture of glucose and xylose in the absence or presence of acetic acid.

Parameters	Mineral Medium	+Acetic Acid 1.6 g/L	+Acetic Acid 3.7 g/L
Xylose consumed (g/L)	63.58 ± 5.26	50.30 ± 3.05	0.00
Glucose consumed (g/L)	11.10 ± 0.69	11.74 ± 0.96	2.50 ± 0.63
Ethanol produced (g/L)	11.67 ± 1.01	12.41 ± 1.33	0.00
Xylitol produced (g/L)	11.67 ± 1.1	4.85 ± 0.57	0.00
Xylitol yield (g/g)	0.18 ± 0.04	0.1 ± 0.01	0.00

To investigate the effect of the initial sugar concentration on the yeast fermentation capacity, we plotted the final ethanol concentration and final yield against the initial concentration of assimilable sugar taking from all fermentation conditions tested (Figure 7). The fifth-order regression curves indicated that a dissociation of ethanol production and ethanol yield up to 120 g/L of sugar. Taking in account the cost-benefit aspect of ethanol production, the best scenario for *M. caribbica* URM 8365 was the substrate containing 120 g/L of assimilable sugar even an ethanol yield of 0.4 g/g, meaning 78% of batch fermentation efficiency (Figure 7).

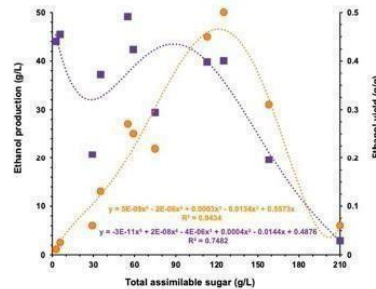


Figure 7. Correlation between the initial sugar concentration and the ethanol production or the ethanol yield by *Meyerozyma caribbica* URM 8365 as calculated from the fifth-order correlation curves.

3.5. Xylitol Production

In addition to ethanol, the assimilation of xylose can also produce xylitol. Similar to what was observed in mineral medium (Table 2), fermentation of xylose-rich hydrolysates did not produce xylitol when the cultures were left static, with severe limitation, or even absence of oxygen. Then, we simulated a condition in which the mineral medium presented xylose:glucose ration similar to found in the bagasse hydrolysates. At this condition, xylitol was only produced when the cultures were gently agitated at 70 rpm (Table 3). However, low xylitol production was observed with a yield of 0.18 g/g. It is noteworthy the fact that ethanol production is much higher than expected for the amount of glucose consumed (Table 3). This indicated that part of the xylose was also converted to ethanol in this sugar mixture, as seen in Table 2. From these values, it was possible to determine the distribution of xylose carbon for the two products. Considering that each xylitol molecule comes from a reduced xylose molecule, then the production of 11.7 g of xylitol used 11.7 g of the total 63.6 g of xylose consumed, leaving 51.9 g of xylose. Considering the calculated yield of 0.43 g/g for the conversion of glucose to ethanol (Table 1; Figure 2), 4.77 g of ethanol were produced from glucose and the remaining 6.9 g of ethanol came from xylose. In the conservative perspective of the calculated yield of 0.18 g/g of the conversion of xylose to ethanol (Table 2), then 38.3 g of the remaining 51.9 g of xylose were converted to ethanol. Finally, the remaining 13.6 g of xylose must have been used for biomass generation. This result shows that the presence of glucose actually stimulates the conversion of xylose to ethanol, impairing the production of xylitol.

Afterwards, fermentation assay in synthetic medium containing xylose and glucose were performed in the presence of the acetic acid (1.6 g/L and 3.7 g/L), according to the concentration found in bagasse hydrolysate. Interestingly, the condition with 1.6 g/L of acetic acid decreased only the parameters related to xylose metabolism, while glucose consumption and total ethanol production were not affected (Table 3). Using the same rationale above, it was possible to calculate that 7.41 g of ethanol came from consumed xylose. This value is even higher than that calculated for the medium without acetic acid. However, xylitol production was reduced by 58%. Since the conversion of xylose to ethanol metabolically involves its initial reduction to xylitol, it makes no sense to consider that acetic acid reduced the ability of the yeast to produce xylitol. Thus, these data showed that this acid at this mild concentration accelerated the complete metabolization of xylose before xylitol left the cell.

In addition, the highest acetic acid concentration completely inhibited the xylose metabolism, with slight glucose consume (Table 3). Indeed, the presence of acetic acid in the hydrolysates may be also of major concern, since its presence in concentrations above 1.5 g/L impaired xylose consumption from synthetic medium, sugarcane, and sorghum bagasse hydrolysates. Thus, fermentations were performed with sugarcane hydrolysates (5 xylose: 1 glucose) that were detoxified with the aid of active coal. This treatment reduced the content of acetic acid in the hydrolysates from 2.5 g/L to 0.6 g/L. Ethanol yield from glucose remained around 0.44 g/g and was not affected by the detoxifying treatment. In

addition, xylitol was detected at 6 g/L in the detoxified substrate ($Y = 0.3$ g/g), which hugely contrasted with its absence in fermentation of untreated hydrolysates.

4. Discussion

In the present work, we studied a strain of *M. caribbica* isolated from a vinasse-irrigated soil used for sugarcane cultivation in Northeast Brazil. This yeast has been isolated from soils, cereals, nectar and industrial processes around the world. The isolation of this yeast from these spots reveals the adaptation of this species in the environment of sugarcane plantation and processing. The phylogenetic analysis performed based on 26S rDNA sequencing discriminated *M. caribbica* within the heterogeneous *Meyerozyma guilliermondii* complex (Figure 1), in special from its closed-related species *M. guilliermondii* [40,41].

The selected strain *M. caribbica* URM 8365 used glucose or xylose for aerobic growth, but only glucose for ethanol fermentation when oxygen was very limited or absent (Table 2). Neither xylose was consumed nor xylitol was produced by *M. caribbica* under conditions of severe oxygen limitation. On the other hand, Tadioto et al. [22] reported that up to 32% of xylose was converted to xylitol when cultures were sufficiently aerated. Indeed, xylose assimilation seems to be not an easy task for yeast cells. *Pichia stipitis* cells consumed around 66% of xylose after 72 h of fermentation [42] and *M. caribbica* consumed all xylose only after 120 h of cultivation [43], despite the experiments used in rich medium. On the other hand, Veras et al. [44] reported high ethanol yields with full xylose consumption by *Scheffersomyces stipitis* and *Spathaspora passalidarum* in mineral medium under oxygen-limited conditions.

The results from mixed media in the present work showed that xylose is consumed during fermentation and part of this sugar is converted to ethanol when glucose is present in the medium. That is, the impediment of xylose fermentation seems to be due to the cellular unavailability of cofactors reduced in the absence of oxygen. Lane et al. [45] improved the co-assimilation of glucose and xylose by slowing down the activity of hexokinase and glucokinase enzymes. Later, Trichez et al. [46] showed that evolved strains of *S. stipitis* and *S. passalidarum* harbouring a mutant allele of the glucose transporter *HXT2.4* gene had improved co-assimilation of glucose and xylose. From the energetic point of view, the glucose consumed in the present work corresponded to 5.6 mM, which could theoretically produce up to 11.2 mM of NADPH from the PPP. Stoichiometrically, one mol of xylose requires one mol of NADPH to be reduced to one mol of xylitol. Since xylitol was detected at 76.3 mM final concentration, it indicated that the required NADPH originated not only from the PPP, but also from some other metabolic oxidative reactions capable of providing the extra 65.1 mM of reducing power. This high requirement of reduced cofactor indicated that NADH, both glycolytic and from TCA, might also be requested for the xylose metabolism.

Besides the energetic requirement, there are other concerns regarding xylose assimilation in the central carbon metabolism, such as the reported inhibition by acetic acid [47]. Indeed, acetic acid was the major inhibitor of xylose fermentation for *M. caribbica* when using hemicellulose hydrolysates (Figure 4). This organic acid can induce intracellular acidification that increases the demand for ATP and impairs the metabolic flux through the central metabolism [48]. The xylitol production by *P. stipitis* NCIM 3497 was also inhibited in the presence of 3.7 g/L of acetic acid [42]. Tadioto et al. [22] also reported the impairment of xylose consumption and xylitol production by *M. caribbica* from stalk-straw corn hydrolysates that contained acetic acid above 3 g/L. In the present work, xylitol production was impaired at lower concentration of 2.5 g/L of acetic acid in the bagasse hydrolysates. In addition, we observed the production of xylitol to a yield of 0.3 g/g in not-supplemented hydrolysates after 75% removal of acetic acid with active coal. Nagarajan et al. [43] also detoxified the hydrolysate with activated coal reducing from 9 g/L to 3 g/L the content of acetic acid in the substrate and increasing xylitol yield from 0.49 g/g to 0.54 g/g together with the increment of the yeast biomass formation. However, like many other reports in the literature, the authors supplemented the detoxified hydrolysate with salts and yeast extract, reaching higher yields and titers. Substrate supplementation always impose higher

production costs, which are for many times impeditive for the production of commodities like ethanol and low- to middle-add value products like xylitol. Here, although showing lower yield, we used conditions that would be closer to the industrial process. Therefore, in the case of the biorefinery concept, part of the bagasse could be treated more mildly to produce a hydrolysate with the appropriate proportion of xylose and glucose for the optimal xylitol production, without the presence of acetic acid in the inhibitory concentration.

In conclusion, the results obtained in the present work showed the potential of *M. caribbica* URM 8365 strain for 1stG and 2ndG ethanol and xylitol production using industrial substrates: ethanol achieving more than 75% of fermentation efficiency for molasses, sugarcane juice and sugarcane and sorghum bagasse hydrolysates. The highest concentration of ethanol of 50 g/L was obtained in the M3 medium, which is composed of 25% molasses and 75% of biomass hydrolysate. In this condition, devoid of nutritional supplementation, there seems to present the best proportion and concentration of fermentable carbohydrates. Moreover, unlike the fermentation tanks that will receive a stream of juice, molasses or cellulose hydrolysate, the tanks for stream of hemicellulose hydrolysate must ensure a minimum of aeration for conversion of xylose into ethanol and xylitol. More studies are necessary to optimize the production process in order to integrate ethanol and xylitol in the same industrial plant.

Author Contributions: Conceptualization, M.A.d.M.J., E.D.D. and R.B.d.S.; investigation, methodology and formal analysis, B.R.A.A., R.A.A.d.F., V.E.P.G., R.K.S., C.E. and S.P.d.S.; resources, M.A.d.M.J., E.D.D. and R.B.d.S.; writing—review and editing, B.R.A.A., R.K.S., M.A.d.M.J., E.D.D. and R.B.d.S.; project administration and funding acquisition, M.A.d.M.J., E.D.D. and R.B.d.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported in part by grants and fellowships from the Brazilian agencies Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ, Universal Palma, grant number 421779/2018-7) and Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE—Project “Biotech-Semiárido” APQ-1379-9.25/21 and Project “Evaluation of yeasts with potential for the fermentation of sugarcane bagasse, sweet sorghum and forage palm, as an alternative for the agricultural expansion of the sugar and alcohol sector in Pernambuco” APQ-0438-2.12/18). This work is part of the National Observatory of Water and Carbon Dynamics in the Caatinga Biome—NOWCDCB, supported by the FACEPE (grants: APQ-0498-3.07/17 INCT 2014 and APQ-0500-5.01/22); CNPq (grants: INCT 465764/2014-2, 406202/2022-2, and 440444/2022-5); and CAPES (grant: 88887.136369/2017-00).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable. All data is contained within the article.

Acknowledgments: The authors acknowledge CAPES, FACEPE and CNPq for financial support and student’s scholarships.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Yaashikaa, P.R.; Kumar, P.S.; Saravanan, A.; Karishma, S.; Rangasamy, G. A biotechnological roadmap for decarbonization systems combined into bioenergy production: Prelude of environmental life-cycle assessment. *Chemosphere* **2023**, *329*, 138670. [CrossRef]
2. Singh, N.; Singhania, R.R.; Nigam, P.S.; Dong, C.D.; Patel, A.K.; Puri, M. Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives. *Bioresour. Technol.* **2022**, *344*, 126415. [CrossRef]
3. Freitas, J.V.; Bilatto, S.; Squinca, P.; Pinto, A.S.; Brondi, M.G.; Bonaci, T.J.; Farinas, C.S. Sugarcane biorefineries: Potential opportunities towards shifting from wastes to products. *Ind. Crops Prod.* **2021**, *172*, 114057.
4. Shapiro, A.J.; O’Dea, R.M.; Li, S.C.; Ajah, J.C.; Bass, G.F.; Epps, T.H. Engineering Innovations, Challenges, and Opportunities for Lignocellulosic Biorefineries: Leveraging Biobased Polymer Production. *Ann. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2023**, *14*, 109–140. [CrossRef]

5. Yadav, A.; Sharma, V.; Tsai, M.L.; Chen, C.W.; Sun, P.P.; Nargotra, P.; Wang, J.X.; Dong, C.D. Development of lignocellulosic biorefineries for the sustainable production of biofuels: Towards circular bioeconomy. *Bioresour. Technol.* **2023**, *381*, 129145. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Solarte-Toro, J.C.; Cardona Alzate, C.A. Sustainability of Biorefineries: Challenges and Perspectives. *Energies* **2023**, *16*, 3786. [\[CrossRef\]](#)
7. Rossetto, R.; Ramos, N.P.; de Matos Pires, R.C.; Xavier, M.A.; Cantarella, H.; Landell, M.G.A. Sustainability in sugarcane supply chain in Brazil: Issues and way forward. *Sugar Tech* **2022**, *24*, 941–966. [\[CrossRef\]](#)
8. Parsaee, M.; Kiani, M.K.D.; Karimi, K. A review of biogas production from sugarcane vinasse. *Biomass Bioenergy* **2019**, *122*, 117–125. [\[CrossRef\]](#)
9. Antunes, F.A.; Thomé, L.C.; Santos, J.C.; Ingle, A.P.; Costa, C.B.; Dos Anjos, V.; Da Silva, S.S. Multi-scale study of the integrated use of the carbohydrate fractions of sugarcane bagasse for ethanol and xylitol production. *Renew. Energy* **2021**, *163*, 1343–1355. [\[CrossRef\]](#)
10. Escobar, E.L.N.; Suota, M.J.; Ramos, L.P.; Corazza, M.L. Combination of green solvents for efficient sugarcane bagasse fractionation. *Biomass Bioenergy* **2022**, *161*, 106482. [\[CrossRef\]](#)
11. Dutra, E.D.; Neto, A.G.B.; de Souza, R.B.; de Moraes, M.A., Jr.; Tabosa, J.N.; Menezes, R.S.C. Ethanol production from the stem juice of different sweet sorghum cultivars in the state of Pernambuco, Northeast of Brazil. *Sugar Tech* **2013**, *15*, 316–321. [\[CrossRef\]](#)
12. Reshmy, R.; Paulose, T.A.P.; Philip, E.; Thomas, D.; Madhavan, A.; Sirohi, R.; Sindhu, R. Updates on high value products from cellulosic biorefinery. *Fuel* **2022**, *308*, 122056. [\[CrossRef\]](#)
13. Dutra, E.D.; Alencar, B.R.A.; Galdino, J.J.; Tabosa, J.N.; Menezes, R.S.C.; de Araújo Filho, R.N.; Costa Primo, D.; Piscoya, V.C.; Antunes, J.E.L. First and Second Generation of Ethanol Production for Five Sweet Sorghum Cultivars during Soft Dough Grain. *J. Exp. Agric. Int.* **2018**, *25*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
14. Reis, A.L.S.; Damilano, E.D.; Menezes, R.S.C.; de Moraes Jr, M.A. Second-generation ethanol from sugarcane and sweet sorghum bagasses using the yeast *Dekkera bruxellensis*. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *92*, 255–262. [\[CrossRef\]](#)
15. Vaz, F.L.; da Rocha Lins, J.; Alencar, B.R.A.; de Abreu, I.B.S.; Vidal, E.E.; Ribeiro, E.; Dutra, E.D. Chemical pretreatment of sugarcane bagasse with liquid fraction recycling. *Renew. Energy* **2021**, *174*, 666–673. [\[CrossRef\]](#)
16. Santos, T.N.; Dutra, E.D.; do Prado, A.G.; Leite, F.C.B.; de Souza, R.D.F.R.; dos Santos, D.C.; Menezes, R.S.C. Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas. *Biomass Bioenergy* **2016**, *85*, 215–222. [\[CrossRef\]](#)
17. Alencar, B.R.A.; Dutra, E.D.; Sampaio, E.V.D.S.B.; Menezes, R.S.C.; Moraes Jr, M.A. Enzymatic hydrolysis of cactus pear varieties with high solids loading for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* **2018**, *250*, 273–280. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Cadete, R.M.; Melo, M.A.; Dussán, K.J.; Rodrigues, R.C.; Silva, S.S.; Zilli, J.E.; Vital, M.J.; Gomes, F.C.; Lachance, M.A.; Rosa, C.A. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e43135. [\[CrossRef\]](#)
19. De Souza, R.F.R.; Dutra, E.D.; Leite, F.C.B.; Cadete, R.M.; Rosa, C.A.; Stambuk, B.U.; Sramford, T.L.M.; de Moraes, M.A., Jr. Production of ethanol fuel from enzyme-treated sugarcane bagasse hydrolysate using d-xylose-fermenting wild yeast isolated from Brazilian biomes. *3 Biotech* **2018**, *8*, 312. [\[CrossRef\]](#)
20. Rech, F.R.; Fontana, R.C.; Rosa, C.A.; Camassola, M.; Ayub, M.A.Z.; Dillon, A.J.P. Fermentation of hexoses and pentoses from sugarcane bagasse hydrolysates into ethanol by *Spathaspora hagerdaliae*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2019**, *42*, 83–92. [\[CrossRef\]](#)
21. Campos, V.J.; Ribeiro, L.E.; Albuini, F.M.; de Castro, A.G.; Fontes, P.P.; da Silva, W.B.; Rosa, C.A.; Fietto, L.G. Physiological comparisons among *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae*, and *Scheffersomyces stipitis* reveal the bottlenecks for their use in the production of second-generation ethanol. *Braz. J. Microbiol.* **2022**, *53*, 977–990. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Tadioto, V.; Milani, L.M.; Barrilli, É.T.; Baptista, C.W.; Bohn, L.; Dresch, A.; Harakava, R.; Fogolari, O.; Mibielli, G.M.; Bender, J.P.; et al. Analysis of glucose and xylose metabolism in new indigenous *Meyerozyma caribbica* strains isolated from corn residues. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *38*, 35. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Brandt, M.E.; Lockhart, S.R. Recent Taxonomic Developments with Candida and Other Opportunistic Yeasts. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **2012**, *6*, 170–177. [\[CrossRef\]](#)
24. Limtong, S.; Kaewwichian, R.; Yongmanitchai, W.; Kawasaki, H. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 1785–1796. [\[CrossRef\]](#)
25. Basilio, A.C.; de Araújo, P.R.; de Moraes, J.O.F.; da Silva Filho, E.A.; de Moraes, M.A., Jr.; Simões, D.A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Curr. Microbiol.* **2008**, *56*, 322–326. [\[CrossRef\]](#)
26. Vila Nova, M.X.; Schuler, A.R.P.; Brasileiro, B.T.R.V.; Moraes Jr, M.A. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 460–466. [\[CrossRef\]](#)
27. Martinez, S.J.; Bressani, A.P.P.; Simão, J.B.P.; Pylro, V.S.; Dias, D.R.; Schwan, R.F. Dominant microbial communities and biochemical profile of pulped natural fermented coffees growing in different altitudes. *Food Res. Int.* **2022**, *159*, 111605. [\[CrossRef\]](#)
28. Tiwari, S.; Jadhav, R.; Avchar, R.; Lanjekar, V.; Datar, M.; Baghela, A. Nectar Yeast Community of Tropical Flowering Plants and Assessment of Their Osmotolerance and Xylitol-Producing Potential. *Curr. Microbiol.* **2021**, *79*, 28. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Matos, Í.T.S.R.; de Souza, V.A.; D'Angelo, G.D.R.; Astolfi Filho, S.; do Carmo, E.J.; Vital, M.J.S. Yeasts with Fermentative Potential Associated with Fruits of Camu-Camu (*Myrciaria dubia*, Kunth) from North of Brazilian Amazon. *Sci. World J.* **2021**, *2021*, 9929059. [\[CrossRef\]](#)

30. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772–780. [\[CrossRef\]](#)
31. Ronquist, F.; Huelsenbeck, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **2003**, *19*, 1572–1574. [\[CrossRef\]](#)
32. Miller, M.A.; Schwartz, T.; Pickett, B.E.; He, S.; Klem, E.B.; Scheuermann, R.H.; Passarotti, M.; Kaufman, S.; O’Leary, M.A. A RESTful API for Access to Phylogenetic Tools via the CIPRES Science Gateway. *Evol. Bioinform. Online* **2015**, *11*, 43–48. [\[CrossRef\]](#)
33. Nylander, J.A.A.; Ronquist, F.; Huelsenbeck, J.P.; Nieves-Aldrey, J.L. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Syst. Biol.* **2004**, *53*, 47–67. [\[CrossRef\]](#)
34. Stamatakis, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 1312–1313. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Cheng, K.; Zhang, J.; Ling, H.; Ping, W.; Huang, W.; Ge, J.; Xu, J. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corn cobs to xylitol by *Candida tropicalis*. *Biochem. Eng. J.* **2009**, *43*, 203–207. [\[CrossRef\]](#)
36. Teles, G.H.; da Silva, J.M.; Mendonça, A.A.; de Moraes, M.A., Jr.; de Barros Pita, W. First aspects on acetate metabolism in the yeast *Dekkera bruxellensis*: A few keys for improving ethanol fermentation. *Yeast* **2018**, *35*, 577–584. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Pereira, L.F.; Bassi, A.P.; Avansini, S.H.; Neto, A.G.; Brasileiro, B.T.; Ceccato-Antonini, S.R.; de Moraes, M.A., Jr. 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* **2012**, *101*, 529–539. [\[CrossRef\]](#)
38. Pereira, L.F.; Lucatti, E.; Basso, L.C.; de Moraes, M.A., Jr. The fermentation of sugarcane molasses by *Dekkera bruxellensis* and the mobilization of reserve carbohydrates. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2014**, *105*, 481–489. [\[CrossRef\]](#)
39. Ahuja, V.; Bhatt, A.K.; Mehta, S.; Sharma, V.; Rathour, R.K.; Sheetal. Xylitol production by *Pseudomonas gessardii* VXlt-16 from sugarcane bagasse hydrolysate and cost analysis. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2022**, *45*, 1019–1031. [\[CrossRef\]](#)
40. Vaughan-Martini, A.; Kurtzman, C.P.; Meyer, S.A.; O’Neill, E.B. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascospore state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. *FEMS Yeast Res.* **2005**, *5*, 463–469. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Romi, W.; Keisam, S.; Ahmed, G.; Jeyaram, K. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC Microbiol.* **2014**, *14*, 52. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Bhavana, B.K.; Mudliar, S.N.; Bokade, V.V.; Debnath, S. Effect of furfural, acetic acid and 5-hydroxymethylfurfural on yeast growth and xylitol fermentation using *Pichia stipitis* NCIM 3497. *Biomass Convers. Biorefinery* **2022**. [\[CrossRef\]](#)
43. Nagarajan, A.; Thulasinathan, B.; Arivalagan, P.; Alagarsamy, A.; Muthuramalingam, J.B.; Thangarasu, S.D.; Thangavel, K. Particle size influence on the composition of sugars in corn cob hemicellulose hydrolysate for xylose fermentation by *Meyerozyma caribbica*. *Bioresour. Technol.* **2021**, *340*, 125677. [\[CrossRef\]](#)
44. Veras, H.C.T.; Parachin, N.S.; Almeida, J.R.M. Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. *Microb. Cell Factories* **2017**, *16*, 153. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Lane, S.; Xu, H.; Oh, E.J.; Kim, H.; Lesmana, A.; Jeong, D.; Zhang, G.; Tsai, C.S.; Jin, Y.S.; Kim, S.R. Glucose repression can be alleviated by reducing glucose phosphorylation rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2613. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Trichez, D.; Steindorff, A.S.; Soares, C.E.V.F.; Formighieri, E.F.; Almeida, J.R.M. Physiological and comparative genomic analysis of new isolated yeasts *Spathaspora* sp. JA1 and *Meyerozyma caribbica* JA9 reveal insights into xylitol production. *FEMS Yeast Res.* **2019**, *19*, foz034. [\[CrossRef\]](#)
47. Parawira, W.; Tekere, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: Review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2011**, *31*, 20–31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Ullah, A.; Chandrasekaran, G.; Brul, S.; Smits, G.J. Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 142. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

