

## Adaptação evolutiva de leveduras para produção de etanol lignocelulósico: Uma revisão



<https://doi.org/10.56238/interdiinnovationscresce-083>

### Rafaela Paula Carvalho Pontes

Mestre. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/9296152414609091>

E-mail: [rafaela.pontes@ufvjm.edu.br](mailto:rafaela.pontes@ufvjm.edu.br)

### Filipe Soares de Freitas

Mestre. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/7690931686949665>

E-mail: [filipe.soares@ufvjm.edu.br](mailto:filipe.soares@ufvjm.edu.br)

### Fellipe Rocha Pereira

Graduando. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/8407476969930750>

E-mail: [fellipe.rocha@ufvjm.edu.br](mailto:fellipe.rocha@ufvjm.edu.br)

### Raphael Ferreira Rocha

Graduando. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/6496229465926952>

E-mail: [raphael.ferreira@ufvjm.edu.br](mailto:raphael.ferreira@ufvjm.edu.br)

### Natália Oliveira Pereira

Graduando. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/4226944144865542>

E-mail: [oliveira.natalia@ufvjm.edu.br](mailto:oliveira.natalia@ufvjm.edu.br)

### Lílian de Araújo Pantoja

Doutora. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/3520952923881672>

E-mail: [l.pantoja@ufvjm.edu.br](mailto:l.pantoja@ufvjm.edu.br)

### Alexandre Soares dos Santos

Doutor. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

LATTES: <http://lattes.cnpq.br/5728597199020574>

E-mail: [tolexandre.soares@ufvjm.edu.br](mailto:tolexandre.soares@ufvjm.edu.br)

### RESUMO

A adaptação evolutiva é um método por meio do qual um organismo é submetido a uma pressão seletiva, física ou química, de forma contínua ou intermitente, com o intuito de promover mutações ou adaptações persistentes que levem à seleção de indivíduos mais aptos para um propósito biotecnológico pré-estabelecido. Nesta revisão, a pesquisa bibliográfica foi circunscrita a fontes que trataram do uso da adaptação evolutiva de micro-organismos fermentadores de pentoses com a finalidade de estabelecer resiliência ou tolerância aos compostos inibidores ou citotóxicos produzidos durante o processamento ou pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas. Na pesquisa foram considerados artigos publicados nos últimos 10 anos disponíveis nas bases de dados da Science Direct, Google Acadêmico e PubMed. As informações coletadas permitiram concluir que a adaptação evolutiva de leveduras tem sido utilizada como um procedimento técnico recorrente, pela sua eficácia na melhoria do processo de fermentação alcoólica de pentoses oriundas de hidrolisados lignocelulósicos. Tal processo melhora as características genotípicas dos micro-organismos frente às condições adversas desses hidrolisados, proporcionando maior tolerância às substâncias citotóxicas e aos inibidores fermentativos com consequente melhora no rendimento de etanol e na produtividade volumétrica.

**Palavras-chave:** Fermentação de pentoses, Etanol 2G, Engenharia evolutiva, Acclimação.



## 1 INTRODUÇÃO

A adaptação evolutiva ou engenharia evolutiva consiste em submeter um micro-organismo a determinadas pressões seletivas que induzam modificações genotípicas e resultem em indivíduos ou populações capazes de gerar respostas desejáveis, mesmo na presença de fatores estressantes (MENEGON; GROSS; JACOBUS, 2022). Moremi, Rensburg e Grange (2020) e Ndubuisi *et al.* (2023) mencionam que essa técnica pode ser empregada para aumentar a eficiência e a produtividade da fermentação alcoólica adaptando o micro-organismo a diferentes condições de cultivo. Ao longo dos anos, os pesquisadores vêm estudando a adaptação como uma estratégia capaz de minimizar os efeitos citotóxicos e melhorar o rendimento e a produtividade do processo de produção de etanol lignocelulósico.

O etanol lignocelulósico ou etanol de segunda geração (2G) é produzido a partir dos componentes monoméricos (hexoses e pentoses) dos polissacarídeos estruturais presentes na parede celular das biomassas vegetais. A lignocelulose, principal unidade estrutural das paredes vegetais, é formada principalmente por celulose, hemicelulose e lignina e seu aproveitamento para fins biotecnológicos necessita de pré-tratamento que decomponha a hemicelulose, remova a lignina e reduza a recalcitrância da celulose à sacarificação enzimática (SELVAKUMAR *et al.*, 2022). Os pré-tratamentos químicos e físico-químicos são reconhecidos por disponibilizar pentoses e hexoses que compõem a hemicelulose, mas costumam produzir inibidores da fermentação alcoólica e substâncias citotóxicas para o agente fermentativo, sendo necessário estudos para a destoxificação do hidrolisado ou o uso de linhagens microbianas resilientes às condições do hidrolisado. (ZHAO; SHAO; CHUNDAWAT, 2020).

Neste trabalho de revisão foram colecionados e organizados resultados de pesquisas científicas cujo propósito tenha sido a adaptação evolutiva de leveduras naturalmente ocorrentes e capazes de fermentar pentoses com a finalidade de produção de etanol 2G. Para tanto, foi feita uma prospecção na literatura científica por meio de busca nos bancos de dados das plataformas *Science direct*, Google acadêmico e *Pubmed*, considerando publicações que abordaram o tema na última década.

## 2 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO: FATORES QUE INFLUENCIAM NA CONDUÇÃO DO BIOPROCESSO

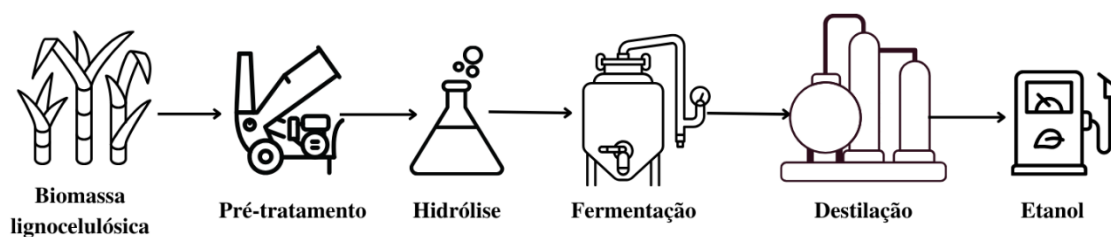
Os biocombustíveis têm sido explorados como alternativa aos combustíveis de origem fóssil e, o bioetanol de primeira geração (1G) tem sido o biocombustível mais relevante para o abastecimento de veículos com motores de ciclo otto, originalmente abastecidos somente com gasolina (JAYAKUMAR *et al.*, 2023). Contudo, a produção de etanol 1G guarda conflitos com a oferta de alimentos quando compete por insumos voltados para a produção de alimentos, por terras aráveis e água (CHENG; WHANG, 2022). Neste contexto, o bioetanol de segunda geração (2G) apresenta-se



como uma interessante alternativa, por ser produzido a partir de biomassas lignocelulósicas, muitas vezes consideradas resíduos agrícolas ou agroindustriais e ainda apresentar baixo custo e não competir com o mercado de alimentos (RAMESH; SELVAN; BABU, 2022; CHENEBAULT; PERCHERON, 2023).

As biomassas lignocelulósicas são compostas por cerca de 15% a 30% de lignina, 20% a 35% de hemicelulose e 30% a 50% de celulose (BASAK *et al.*, 2023) que formam uma matriz tridimensional, complexa e rígida da parede celular dos vegetais (BHARADWAJ *et al.*, 2023). A hemicelulose e a celulose são polissacarídeos que podem ser hidrolisados em açúcares monoméricos, se tornando, então, passíveis de fermentação para obtenção de etanol (ALMEIDA; NASCIMENTO, 2021). A conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol passa por diferentes etapas : o pré-tratamento, que envolve a alteração da estrutura da matriz celulose-hemicelulose-lignina, garantindo a separação dessas fibras em frações independentes, a fim de torná-las acessíveis ao ataque químico ou enzimático que decomporá os polissacarídeos (SINGH *et al.*, 2022); a sacarificação ou hidrólise das ligações glicosídicas, que tem como finalidade despolimerizar os componentes holocelulósicos (celulose e hemicelulose), liberando os monossacarídeos, pentoses e hexoses (MACHINENI, 2019); a fermentação, processo microbiológico que garante a conversão de todos os açúcares monoméricos em etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>); e a destilação, processo de separação do etanol do restante do mosto fermentado. Na Figura 1 são mostradas as etapas do processo de produção de etanol 2G.

Figura 1. Esquema geral das etapas do processo de produção de etanol lignocelulósico ou de 2<sup>o</sup> geração.



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2023

O rendimento da conversão da biomassa em açúcares livres depende da escolha das condições operacionais empregadas nas etapas de pré-tratamento e hidrólise (SHRIVASTAVA; SHARMA, 2023). Essas etapas, embora necessárias para a consolidação do etanol de segunda geração, podem gerar uma variedade de compostos químicos com efeitos indesejáveis, tais como, derivados de furano, ácidos alifáticos e compostos fenólicos, os quais podem promover a morte celular ou inibição do metabolismo microbiano (ZHAO; SHAO; CHUNDAWAT, 2020). A presença desses inibidores interfere na consolidação do bioetanol lignocelulósico, uma vez que, os valores de rendimento e de produtividade, requisitos indispensáveis, são afetados negativamente. Neste cenário, as características metabólicas do



micro-organismo são fundamentais para o bom desempenho da produção do etanol, sendo importante buscar por espécies e linhagens que superem a presença dos compostos inibidores formados durante o processo de pré-tratamento.

A espécie *Saccharomyces cerevisiae*, levedura conhecida pela robustez e considerada referência em processos industriais de produção de etanol de primeira geração por converter hexoses à etanol de forma eficiente, não fermenta as pentoses disponibilizadas após o processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica. Saxena *et al.*, 2023 relatam o fato de que essa levedura não é capaz de se multiplicar ou crescer quando a única fonte de carbono é a xilose, pois apesar do seu genoma possuir uma via de metabolismo para esse açúcar, há um baixo nível de expressão dos genes responsáveis pela enzimas da via. Portanto, um dos desafios para consolidação do processo do etanol 2G é a adoção de um organismo que seja capaz de fermentar, de forma eficiente, tanto a glicose quanto a xilose, provenientes do processo de sacarificação da celulose e hemicelulose, respectivamente, à etanol.

A produção de bioetanol, para ser bem-sucedida, deve contar, ainda, com agentes fermentativos resilientes ao estresse osmótico, temperaturas elevadas e à presença de altas concentrações do produto formado, o etanol (ELIODÓRIO *et al.*, 2019).

Os açúcares, apesar de importantes fontes de energia para as células de levedura, podem se tornar tóxicos quando em altas concentrações no mosto (ITTO-NAKAMA *et al.*, 2023). O aumento na osmolaridade do meio fermentativo afeta o crescimento e a viabilidade celular (SAINI *et al.*, 2018). A exposição a altas concentrações de açúcares resulta na rápida perda de água intracelular por osmose, seguido de encolhimento da célula (AUESUKAREE, 2017). Com o intuito de neutralizar tais efeitos, as células de levedura aumentam a produção de glicerol, aumentando assim a osmolaridade interna (HOPPERT; KÖLLING; EINFALT, 2022).

No processo fermentativo, durante a conversão dos açúcares em etanol ocorrem reações exotérmicas e troca de calor dos micro-organismos com o meio fermentativo, elevando a temperatura nas dornas de fermentação (RIVERA *et al.*, 2017). Caso não haja um controle da temperatura, as leveduras podem sofrer estresse térmico, afetando o crescimento, a viabilidade e o metabolismo celular, pois pode desestabilizar proteínas, enzimas, membrana plasmática e estruturas do citoesqueleto, levando à disfunção proteica, desequilíbrio metabólico e colapso celular (AUESUKAREE, 2017). Ribeiro *et al.* (2019) ao realizarem fermentações com *Pichia membranifaciens* LJ4 em diferentes temperaturas (32°C, 37°C e 40°C) verificaram que, dentre os tratamentos testados, a temperatura de 40°C mostrou aumento no índice de morte celular das células de levedura, bem como decréscimo na concentração total de etanol.

O acúmulo de etanol durante o processo fermentativo pode resultar em toxicidade para o micro-organismo (SNOEK; VERSTREPEN; VOORDESCKERS, 2016). Concentrações elevadas de etanol comprometem várias funções celulares, levando à redução do crescimento e perda da viabilidade



celular, acabando por promover uma fermentação lenta (BLEOANCA *et al.*, 2013), dificultando, ainda, o transporte de glicose (SALMON, 1989). O estresse causado pelo álcool também atinge a fluidez e permeabilidade da membrana celular, visto que o etanol e os lipídios da membrana são moléculas anfipáticas que interagem diretamente, resultando em alterações fisiológicas da membrana (MANSURE *et al.*, 1994; ITTO-NAKAMA *et al.*, 2023). A alta concentração de etanol pode, também, provocar o acúmulo de substâncias Reativas de Oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superóxidos (O<sup>2</sup>) e radical hidroxila (OH<sup>-</sup>), os quais podem causar danos aos carboidratos, lipídios, proteínas e DNA, macromoléculas importantes para o metabolismo celular (YANG *et al.*, 2019).

Em se tratando de inibidores, o furfural (derivado de furano) é gerado a partir da desidratação de pentoses pela ação de ácidos e altas temperaturas (SJULANDER; KIKAS, 2020). A inibição de enzimas como hexoquinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e álcool desidrogenase é um dos efeitos deletérios observados em células microbianas na presença de furfural (WANG *et al.*, 2023). De modo geral, o crescimento específico celular, a viabilidade e a fase de crescimento exponencial são diretamente afetados e, conseqüentemente, há uma diminuição na produção e rendimento volumétrico de etanol (WANG *et al.*, 2016). Segundo Bellido *et al.* (2011), esse composto pode ainda afetar o consumo de substratos, como observado em seu experimento com *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* em hidrolisado de palha de trigo, no qual houve um atraso nas taxas de consumo de açúcar com o aumento da concentração de furfural. Esse composto induz, ainda, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que desnaturam proteínas, danificam o citoesqueleto e causam mutagênese no DNA (LIU *et al.*, 2021), danificam mitocôndrias e membranas dos vacúolos (SJULANDER; KIKAS, 2020; GENCTURK; ULGEN, 2022).

O 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), outro derivado de furano, é produto da desidratação de hexoses, e assim como o furfural, produz efeitos negativos sobre as células, embora seja menos tóxico (SJULANDER; KIKAS, 2020). Os seus efeitos são semelhantes aos do furfural, principalmente ao provocar uma fase de latência (ou fase lag) mais longa durante o crescimento celular (TSAI *et al.*, 2021). As enzimas álcool desidrogenase, piruvato desidrogenase e acetaldeído desidrogenase, são as mais afetadas pelo 5-HMF e, em razão disso, altas concentrações deste composto no meio fermentativo, pode interromper totalmente a multiplicação das células (SEHNEM *et al.*, 2020).

O ácido acético é um ácido fraco, gerado a partir da desacetilação das hemiceluloses e considerado um dos ácidos carboxílicos mais encontrados em hidrolisados lignocelulósicos (RAJENDRAN *et al.*, 2018). Abud, Silva e Junior (2017) em sua pesquisa reportaram que, em processo fermentativo com a levedura *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, o ácido acético foi o principal fator causador do baixo rendimento fermentativo, quando comparado com outros compostos inibidores como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural. Almeida *et al.* (2023) citam que os efeitos tóxicos do ácido

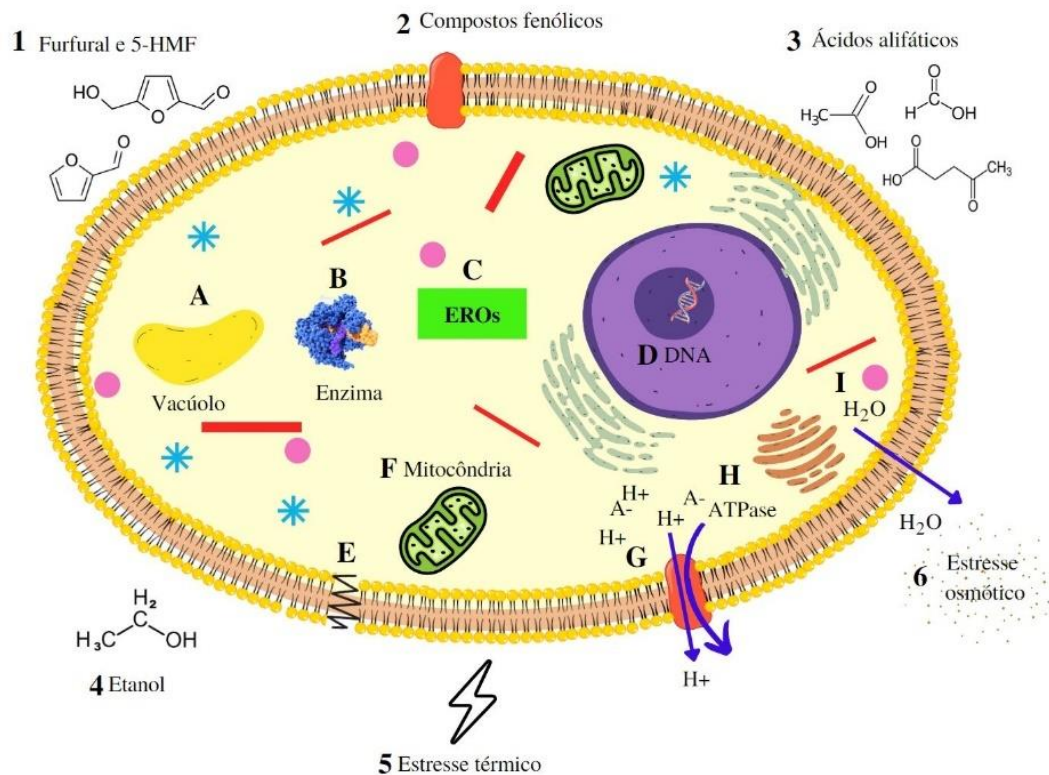


acético dependem do pH do meio fermentativo que, geralmente, é inferior ao pH intracelular, e que esse efeito está relacionado aos ânions que, em forma não dissociada, se propaga pela membrana plasmática das células microbianas, diminuindo o pH citosólico. Hu *et al.* (2022) relatam que a diminuição do pH intracelular induz a produção da enzima adenosina trifosfatase (ATPase) da membrana citoplasmática associada ao bombeamento de prótons necessário para a manutenção do potencial de membrana. Os autores reportam ainda que, tal fenômeno requer utilização de ATP, diminuindo a disponibilidade dessa molécula importante para a produção de etanol a partir da fermentação. Portanto, a presença desse ácido acarreta efeitos negativos para o crescimento celular e produção de etanol. De acordo com Almeida *et al.* (2023), tais efeitos só são observados na presença de altas concentrações do ácido acético.

O micro-organismo, quando cultivado em meios que contenham substâncias citotóxicas e inibidoras do processo fermentativo, deve responder de forma rápida para proteger sua maquinaria celular e reparar os danos causados (SAINI *et al.*, 2018). A resposta das leveduras aos fatores estressantes depende da espécie do micro-organismo, do tipo de estresse e demais condições do meio de cultivo. A maioria das vezes, não é possível elucidar completamente a resposta da levedura frente a esses estresses, necessitando de ferramentas ômicas que permitam analisar as variações genéticas, proteínas e metabólitos (ZHAO; BAI, 2009). A Figura 2 mostra, de forma ilustrativa, os efeitos dos compostos inibidores à célula de levedura.



Figura 1 - Efeitos inibitórios dos derivados de furano, ácidos alifáticos, compostos fenólicos para a estrutura e metabolismo da célula leveduriforme



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2023

Legenda: (1A) Danos à membrana do vacúolo; (1F) Dano às mitocôndrias; (1B; 4B) Afetam enzimas da via glicolítica e da via de conversão do bioetanol; (5B) Desnaturam proteínas e/ou enzimas; (1C; 4C) Aumentam a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs); (1D) Degradação do DNA; (3G) Diminuição do pH intracelular por meio do acúmulo de espécies aniônicas; (3H) Produção da enzima adenosina trifosfatase (ATPase) que utiliza ATP para bombear prótons para fora da célula, diminuindo a disponibilidade de ATP para o processo fermentativo; (2E; 4E) Degradação da membrana celular; (6I) Perda de água intracelular pelo processo osmótico.

Zhao e Bai (2009) relataram que a capacidade microbiana para tolerar vários fatores estressantes é um dos critérios mais importantes para selecionar cepas capazes de realizar uma fermentação alcoólica mais eficiente. Cabe destacar que ao longo dos anos, pesquisadores vêm estudando estratégias que possam minimizar esses efeitos inibitórios, a fim de melhorar o rendimento em etanol (ROQUE *et al.*, 2019). Nesse contexto, Menegon, Gross e Jacobus (2022) mencionaram que a adaptação evolutiva é uma técnica interessante para melhorar a eficiência fermentativa de etanol, por leveduras, quando na presença de compostos inibidores, altas temperaturas e ou altas concentrações de açúcar e etanol.

### 3 ADAPTAÇÃO EVOLUTIVA

A seleção natural, mecanismo de evolução proposto por Darwin em 1859, é um processo em que os organismos mais aptos à sobreviver em determinadas condições ambientais são selecionados, pois se reproduzem e transmitem suas características aos descendentes. A adaptação evolutiva de



micro-organismos, também chamada de evolução laboratorial, segue o princípio da seleção natural, contudo em um ambiente gerado em laboratório e sob condições controladas (PAL; VIJ, 2022).

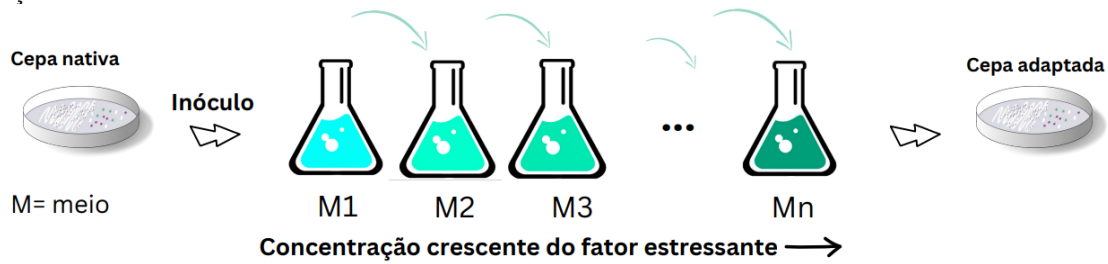
A adaptação evolutiva consiste em expor, por um longo período de tempo, determinado micro-organismo a um ambiente estressante, como por exemplo às condições de indisponibilidade de nutrientes, presença de compostos citotóxicos, estresse térmico, osmótico e/ou oxidativo (ZHU *et al.*, 2018). Essas condições de estresse geram uma resposta rápida dos micro-organismos que evoluem para proteger sua maquinaria celular e reparar os danos causados (SAINI *et al.*, 2018). A partir desse processo, certas características genótípicas dos micro-organismos podem ser melhoradas, sem que seja preciso utilizar protocolos de biologia sintética para a modificação do genoma da levedura (PAL; VIJ, 2022).

As estratégias de adaptação consistem, no geral, em cultivar o micro-organismo de interesse em meio fermentativo adicionado com substâncias citotóxicas e/ou submetido a fatores estressantes (temperatura, pH, salinidade, pressão osmótica). Tais estratégias são numerosas e variadas e, tendo-se como base, o aumento gradativo do fator estressante durante o processo fermentativo. Considerando as várias estratégias, Mavrommati, Papanikolaou e Aggelis (2022) descreveram algumas técnicas que podem ser empregadas, como por exemplo processos em batelada utilizando meio líquido contido em frascos que são submetidos à agitação e depois de um determinado intervalo de tempo, as células são retiradas e inoculadas em um novo frasco que pode conter uma concentração maior ou igual de uma substância tóxica, como representado na Figura 3. Nesta estratégia, os passos são, então, repetidos diversas vezes, de acordo com o número desejável de gerações. Wang, Sun e Yuan (2018) mencionaram que este mesmo procedimento pode ser realizado utilizando meio sólido, contido em placa de Petri ou tubo de cultura, contendo o fator estressante, no qual o micro-organismo será inoculado. A seguir a cultura crescida será transferida para novo meio contendo o fator estressante em concentração ou intensidade igual ou maior, o que irá promover uma pressão seletiva. Dragosits e Mattanovich (2013), mencionaram que esses procedimentos experimentais, independentemente de serem em meio líquido ou sólido, são simples e de baixo custo, podendo ter condições de temperatura e homogeneidade controladas, contudo podem apresentar alguns obstáculos, como: densidade populacional variável, escassez de nutrientes e, variações no pH e oxigênio dissolvido. A variação desses fatores pode não ser de grande importância para muitas configurações experimentais e objetivos de trabalho, confirmando então a eficácia do método.





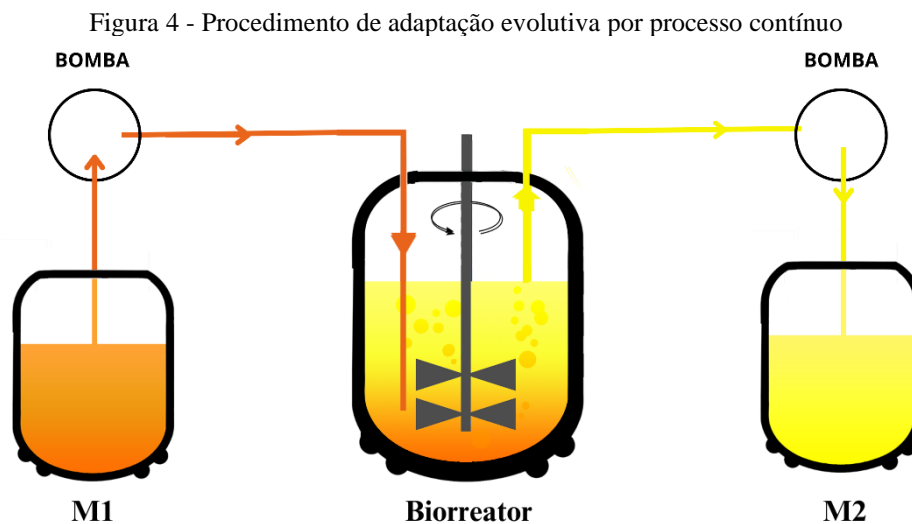
Figura 3 - Procedimento de adaptação evolutiva, por meio de transferências sucessivas em meio líquido contendo concentração ou intensidade crescente do fator estressante



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2023

Legenda: M (meio fermentativo); M1, M2, M3...Mn (meio fermentativo contendo concentração crescente do fator estressante, tais como compostos inibidores, etanol, açúcares, temperatura, pH, entre outros).

Existem algumas estratégias de adaptação que necessitam de maior controle, podendo, então, como uma das alternativas, utilizar a técnica de culturas contínuas em biorreatores, que possibilita a manipulação de fatores como pH e temperatura (MAVROMMATI; PAPANIKOLAOU; AGGELIS, 2022). Durante o processo contínuo, há um aumento gradual do fator estressante, sendo obtidas, ao final do processo, células adaptadas, como representado na Figura 4. Todavia, o processo de adaptação apresenta entraves, como por exemplo, descobrir os mecanismos e as alterações genéticas que levaram as células a um fenótipo evoluído e, para tanto, o sequenciamento genômico das cepas evoluídas ou uma análise mais aprofundada, costumam ser processos complementares necessários (MOHEDANO; KONZOCK; CHEN, 2022).



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2023.

Legenda: M1 (meio fermentativo com um aumento gradual de concentração do fator estressante, tais como compostos inibidores, etanol, açúcares, temperatura, pH, entre outros); Biorreator (equipamento contendo o micro-organismo, onde ocorrerá a fermentação); M2 (meio fermentado).

A modificação seletiva de características genóticas dos micro-organismos e a eficiência do processo fermentativo estão diretamente correlacionada, visto que o agente fermentativo adaptado pode aumentar sua taxa de crescimento específico, sua tolerância aos inibidores e ao etanol e, ainda,



criar estabilidade frente altas temperaturas e variações de pH (TURANLI-YILDIZ *et al.*, 2017; SAINI *et al.*, 2018).

Neste contexto, a utilização de micro-organismos adaptados minimiza, portanto, os efeitos deletérios da fermentação, como aqueles ocasionados pela presença dos compostos inibidores provenientes da etapa de pré-tratamento do hidrolisado lignocelulósico (NOURI *et al.*, 2020).

Morales *et al.* (2017), estudaram a linhagem de levedura *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907, a qual passou por um processo de adaptação realizado como segue: (i) uma suspensão microbiana foi exposta à luz UV por 480 segundos, (ii) seguida, de inóculo em meio sólido contendo 1 g L<sup>-1</sup> de ácido acético por 72 h, (iii) posteriormente a colônia foi transferida para um meio líquido contendo 1 g L<sup>-1</sup> de ácido acético por 7 h e, então, (iv) inoculadas em biorreator com diferentes taxas de diluições, onde as concentrações de ácido acético foram gradualmente aumentadas. A seguir, as células já adaptadas foram inoculadas em meio fermentativo contendo hidrolisado de *Eucalyptus globulus*. Esses autores mencionam que as células nativas de *S. passalidarum* NRRL Y-27907 apresentaram menor rendimento (0,22 g<sub>etanol</sub> g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup>) e produtividade volumétrica (0,09 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) quando comparadas aos valores obtidos nos processos conduzidos com células adaptadas (0,36 g<sub>etanol</sub> g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup> e 0,55 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), cujo aumento foi de 63,6% e 511,1% respectivamente. Vale ressaltar que, 1 g de carboidrato pode ser convertido, teoricamente, em no máximo 0,511 g de etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) e 0,489 g de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O valor de rendimento de etanol pode se aproximar do valor teórico, mas não maior que este.

Trichez *et al.* (2023) também trabalharam com o processo de adaptação evolutiva da levedura *Spathaspora passalidarum*, todavia com o objetivo de melhorar sua capacidade de co-fermentação de glicose e xilose. O ensaio foi conduzido, inicialmente, com uma etapa de mutagênese por radiação UV e, posteriormente com um experimento empregando como critérios de seleção o consumo dos açúcares xilose na presença de 2-desoxi-D-glicose (2-DOG), análogo não metabolizável da glicose. Considerando os resultados, os autores observaram que a cepa mutante demonstrou uma melhoria em sua capacidade de assimilar de forma simultânea, glicose e xilose em meios de culturas contendo ambos os açúcares. No experimento conduzido com a cepa controle de *Spathaspora passalidarum*, a glicose (20,44 g L<sup>-1</sup>) foi completamente esgotada e 7,55 g L<sup>-1</sup> de xilose foi consumida, resultando na produção de 6,80 g L<sup>-1</sup> de etanol em um período de 24 horas de cultivo. Por outro lado, as células da linhagem Spc3, a versão adaptada da *S. passalidarum*, consumiu 5,59 g L<sup>-1</sup> de xilose, mesmo na presença de 2,82 g L<sup>-1</sup> de glicose residual, e produziu 5,57 g L<sup>-1</sup> de etanol, sendo possível observar uma ligeira melhoria no processo de co-fermentação de glicose e xilose, em comparação com a cepa controle. Os mesmos autores também trabalharam com a adaptação evolutiva da levedura *Scheffersomyces stipitis*, em condições experimentais iguais. Um efeito mais notável no co-consumo de glicose e xilose foi observado nas células evoluídas derivadas de *S. stipitis*. As células de controle



começaram a assimilar a xilose somente após o quase completo consumo da glicose. Por outro lado, tanto as cepas adaptadas A5-1 como A5-8 foram capazes de co-assimilar glicose e xilose simultaneamente, mas com um comprometimento na taxa de consumo de açúcar. A cepa de *S. stipiti* do tipo selvagem consumiu 1,01 g L<sup>-1</sup> de xilose e 15,95 g L<sup>-1</sup> de glicose, em uma proporção de 0,06 g de xilose por g de glicose, dentro de apenas 6 horas de cultivo. Nessa mesma situação, as cepas evoluídas mostraram consumo em proporções mais elevadas de xilose/glicose. A linhagem adaptada A5-1 consumiu 1,08 g L<sup>-1</sup> de xilose e 5,43 g L<sup>-1</sup> de glicose, com uma proporção de consumo de açúcar de 0,20 g de xilose por g de glicose, enquanto A5-8 consumiu 1,74 g L<sup>-1</sup> de xilose e 4,45 g L<sup>-1</sup> de glicose, resultando em um consumo na proporção de 0,39 g de xilose por g de glicose. Contudo, é importante notar que, apesar das maiores proporções de consumo de xilose/glicose, as células evoluídas (Spc3, A5-1 e A5-8) exibiram uma taxa reduzida de consumo de glicose em comparação com as cepas parentais.

Sharma *et al.* (2016) explorou a linhagem de *Kluyveromyces marxianus* NIRE-K1 para produção de bioetanol lignocelulósico a partir de xilose por meio de uma abordagem de adaptação evolutiva. O método utilizado foi realizado em batelada com meio sintético YEP (10 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 20 g L<sup>-1</sup> peptona, 20 g L<sup>-1</sup> glicose/xilose, 15 g L<sup>-1</sup> phytigel, pH 5,5) e transferências sequenciais. A adaptação continuou por 60 bateladas até que a cultura adaptada fosse capaz de utilizar mais de 80% (p/v) de xilose. Os autores reportaram que a absorção volumétrica da xilose foi 3,45 vezes maior para *K. marxianus* NIRE-K1 adaptada (0,38±0,03 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) quando comparada com a cepa nativa (0,11±0,02 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e o rendimento em etanol de 0,11±0,02 g<sub>etanol</sub> g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup> usando *K. marxianus* NIRE-K1 adaptada, resultado esse 57,1% maior que o rendimento obtido para a cepa nativa (0,07±0,01 g<sub>etanol</sub> g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup>). A produtividade volumétrica de etanol também sofreu uma melhora, visto que o valor encontrado para a cepa nativa foi de 0,008±0,002 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e para a cepa adaptada o valor encontrado foi de 0,040±0,003 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, resultado 400% superior.

Os autores Du *et al.* (2022) estudaram a adaptação evolutiva com a levedura *Kluyveromyces marxianus* 1727, mesma espécie estudada anteriormente, no entanto, na presença de múltiplos inibidores e, para tanto, as células foram incubadas em meio sintético adicionado de múltiplos inibidores com concentrações de 0,2 g L<sup>-1</sup> de ácido fórmico, 0,5 g L<sup>-1</sup> de ácido acético, 0,3 g L<sup>-1</sup> de furfural e 0,2 g L<sup>-1</sup> de 5-HMF. Quando a densidade óptica da suspensão atingiu 2,0 D.O, as células foram coletadas e transferidas para uma concentração mais alta de inibidores. As etapas foram repetidas até que a concentração final de inibidores fosse de 0,8 g L<sup>-1</sup> de ácido fórmico, 1,2 g L<sup>-1</sup> de ácido acético, 0,8 g L<sup>-1</sup> de furfural e 0,6 g L<sup>-1</sup> de 5-HMF. Ao fermentar o hidrolisado de palha de milho, inoculado com a levedura *K. marxianus* 1727 adaptada, os autores Du *et al.* (2022) relataram observar um rendimento de 0,46 g<sub>etanol</sub> g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup>, o qual foi 12,2% superior, quando comparado com a cepa mãe (0,41 g<sub>etanol</sub> g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup>).



Hemansi *et al.* (2022) também realizaram um processo de adaptação com a linhagem *Kluyveromyces marxianus* JKH5, o qual foi conduzida pela transferência da levedura em meio sintético contendo um aumento gradual de inibidores (ácido acético/furfural/vanilina/coquetel de inibidores). As células em fase logarítmica foram coletadas para um posterior inóculo realizados por transferências de forma consecutiva por 60 bateladas. Os autores observaram que, quando cultivada em meio sintético com concentração inicial  $50 \text{ g L}^{-1}$  de glicose e na presença de coquetel de inibidores (ácido acético  $3 \text{ g L}^{-1}$ , furfural  $1 \text{ g L}^{-1}$  e vanilina  $1 \text{ g L}^{-1}$ ), a linhagem adaptada apresentou melhor rendimento ( $0,40 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{substrato}}^{-1}$ ) e produtividade volumétrica ( $1,11 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), quando comparada com a cepa não adaptada ( $0,16 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{substrato}}^{-1}$  e  $0,45 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), que apresentou aumento de 150,0% e 146,7%, respectivamente. Ainda estudando a mesma espécie, mas de linhagem diferente, *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735, Silveira *et al* (2020) realizaram um estudo de 85 dias realizando o processo de adaptação, no qual o microrganismo foi inoculado no meio SD ( $6,7 \text{ g L}^{-1}$  de base nitrogenada de levedura - YNB - sem aminoácidos e  $20 \text{ g L}^{-1}$  de lactose) adicionado de etanol 4% (v/v) (SDE). Os dados coletados, evidenciaram uma melhoria no rendimento de etanol ( $Y_{p/s}$ ) que se apresentou em um valor de  $0,32 \text{ g g}^{-1}$  na cepa parental (P1) e  $0,36 \text{ g g}^{-1}$  na cepa adaptada (ETS1). Ademais, a produtividade volumétrica também aumentou, de  $0,56$  a  $0,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Segundo Nouri, Azin e Mousavi (2017), um processo de adaptação foi realizado com a levedura *Barnettozyma californica* HNMA-5, empregando o procedimento de adaptação que consistiu em utilizar meios com concentrações crescentes de 25%, 50%, 75% e 100% (v/v) de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Ao observar um crescimento vigoroso da cultura, foram realizadas transferências para um meio com maior concentração de hidrolisado. Os autores observaram um aumento no rendimento de etanol, que foi de  $0,166 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{substrato}}^{-1}$  com a cepa não adaptada para  $0,216 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{substrato}}^{-1}$  com a cepa adaptada (melhoria de 30,1%), bem como na produtividade volumétrica, que aumentou de  $0,138 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  para  $0,158 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (melhoria de 14,5%).

No trabalho de Fan *et al.* (2013), uma cepa de levedura de *Pichia guilliermondii*, previamente selecionada e adaptada a hidrolisados de resíduos de sabugo de milho foi utilizada visando melhor desempenho na produção de etanol lignocelulósico. Os autores relataram que a adaptação evolutiva foi conduzida em hidrolisados de resíduo de sabugo de milho sem adição complementar de nutrientes. As cepas foram transferidas em proporção crescente (25-100%, em incrementos de 25%) de hidrolisado, onde as colônias com maior crescimento em meio sólido contendo 25% hidrolisado (v/v) foram selecionadas e transferidas para um meio sólido com maior ainda, concentração de hidrolisado. Os resultados demonstraram que a levedura *P. guilliermondii* adaptada apresentou melhor desempenho para produção de etanol em meio hidrolisado não destoxificado sem adição de nutrientes. A cepa adaptada, produziu, em 120 h,  $34,7 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$  de etanol, com produtividade volumétrica de  $0,29 \pm 0,00 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , que corresponde a 84,6% e 81,3% maior que a de sua cepa não adaptada, respectivamente



(18,8 g L<sup>-1</sup> e 0,16 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Além disso, a cepa adaptada consumiu toda a glicose presente no hidrolisados de resíduos de sabugo de milho (cerca de 74,9 g L<sup>-1</sup>) em 120 h, com taxa de consumo de 0,62±0,01 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, 87,9%, maior que a da cepa parental.

Pontes (2022) realizou o estudo do processo de adaptação evolutiva da linhagem de levedura *Candida orthopsilosis* UFVJM-4G, empregando a técnica de transferências sucessivas em meios contendo concentrações crescentes de hidrolisado de semente de girassol (0%, 25%, 50%, 75%, 100%). Posteriormente, as cepas provenientes das diferentes concentrações foram isoladas e inoculadas em hidrolisado de semente de girassol puro, para definição dos parâmetros fermentativos. A autora observou que o processo de adaptação desta linhagem foi eficiente, uma vez que houve aumento no rendimento e na produtividade volumétrica da levedura adaptada (0,50 g<sub>etanol</sub> g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup> e 0,42 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) quando comparada com a levedura não adaptada (0,34 g<sub>etanol</sub> g<sub>substrato</sub><sup>-1</sup> e 0,32 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Além disso, relatou que houve melhoria no crescimento dessa levedura, cuja taxa específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) passou de 0,07 h<sup>-1</sup> para 0,28 h<sup>-1</sup>.

Na Tabela 2 encontra-se um resumo dos resultados abordados nesta revisão. A partir da análise dos resultados relatados na literatura foi possível inferir que a técnica de adaptação evolutiva influenciou de forma positiva os parâmetros fermentativos. O menor aumento percentual observado com o uso desta técnica foi de 12% de rendimento de etanol para a espécie *Kluyveromyces marxianus* 1727 e o maior de 1,530 % para a espécie *Scheffersomyces stipitis* Y-7124.

Tabela 2 – Compilação de dados da literatura de processos fermentativos empregando leveduras fermentadoras de pentose submetidas à técnica de adaptação evolutiva para produção de etanol

| Leveduras                                    |          | Y <sub>P/S</sub><br>(g <sub>etanol</sub><br>g <sub>substrato</sub> <sup>-1</sup> ) | Q <sub>P</sub><br>(g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | Meios<br>fermentativos                     | Referências                   |
|--|----------|--|--|--|-------------------------------|
| <i>Spathaspora passalidarum</i> NRRL Y-27907 | Nativa   | 0,22   | 0,09   | Hidrolisado de <i>Eucalyptus globulus</i>  | Morales <i>et al.</i> (2017)  |
|  | Adaptada | 0,36   | 0,55   |  |                               |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> NIRE-K1       | Nativa   | 0,07   | 0,008  | Meio sintético YEPX                        | Sharma <i>et al.</i> (2016)   |
|  | Adaptada | 0,11   | 0,040  |  |                               |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> 1727          | Nativa   | 0,41   | -  | Hidrolisado de palha de milho              | Du <i>et al.</i> (2022)       |
|  | Adaptada | 0,46   | -  |  |                               |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> JKH5          | Nativa   | 0,16   | 0,45   | Meio sintético com inibidores              | Hemansi <i>et al.</i> (2022)  |
|  | Adaptada | 0,40   | 1,11   |  |                               |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7735      | Nativa   | 0,32   | 0,56   | Meio sintético SD                          | Silveira <i>et al.</i> (2020) |
|  | Adaptada | 0,36   | 0,66   |  |                               |
| <i>Barnettozyma californica</i> HNMA-5       | Nativa   | 0,166  | 0,138  | Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar    | Nouri <i>et al.</i> (2017)    |
|  | Adaptada | 0,216  | 0,158  |  |                               |
| <i>Pichia guilliermondii</i>                 | Nativa   | -  | 0,16   | Hidrolisado de resíduos de sabugo de milho | Fan <i>et al.</i> (2013)      |
|  | Adaptada | -  | 0,29   |  |                               |
| <i>Candida orthopsilosis</i> UFVJM-4G        | Nativa   | 0,34   | 0,32   | Hidrolisado de semente de girassol         | Pontes (2022)                 |
|  | Adaptada | 0,50   | 0,42   |  |                               |

Fonte: AUTORIA PRÓPRIA, 2023



#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso da produção de etanol lignocelulósico depende, do uso de micro-organismos capazes de fermentar hexoses e pentoses com desempenho similar às leveduras industriais convencionais quer estejam ou não na presença de ambiente fermentativo hostil, como costuma ser o hidrolisado lignocelulósico.

Diversas alternativas vêm sendo estudadas para reduzir as pressões a que as leveduras são submetidas durante a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos. Entretanto, a adaptação evolutiva se propõe a tornar mais resilientes e eficientes as leveduras não convencionais, reconhecidas por sua capacidade de fermentar pentoses, ao ambiente fermentativo próprio dos hidrolisados lignocelulósicos.

Da revisão realizada sobre o tema, foi possível observar que a metodologia de adaptação evolutiva, considerada a alternativa de intervenção por engenharia genética, é uma ferramenta de execução mais simples e menos onerosa, com aplicação ampla e que abarca a maioria das questões relacionadas às intercorrências do processo fermentativo com resposta direta sobre o aumento do rendimento fermentativo e da produtividade volumétrica.



## REFERÊNCIAS

- ABUD, A. K. D. S.; SILVA, A. D. S. D.; JUNIOR, A. M. D. O. Effect of inhibitors on ethanol production by *Pichia stipitis* in a complex culture media. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 39, n. 2, p. 223–229, 2017.
- ALMEIDA, S. C.; NASCIMENTO, D. D. DO R. Review: yeasts used in the production of second generation ethanol. *Bioenergy in review: dialogues*, v. 11, n. 1, p. 99–119, 2021.
- ALMEIDA, *et al.* New *Papiliotrema laurentii* UFV-1 strains with improved acetic acid tolerance selected by adaptive laboratory evolution, 164(19), 1-12. 2023.
- AUESUKAREE, C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 124, n. 2, p. 133–142, 2017.
- BASAK, B. *et al.* Advances in physicochemical pretreatment strategies for lignocellulose biomass and their effectiveness in bioconversion for biofuel production. *Bioresource Technology*, v. 369, p. 128413, 2023.
- BELLIDO, C. *et al.* Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 23, p. 10868–10874, dez. 2011
- BHARADWAJ, A. V. S. L. *et al.* Review of chemical pretreatment of lignocellulosic biomass using low-liquid and low-chemical catalysts for effective bioconversion. *Bioresource Technology*, v. 368, p. 128339, 2023.
- BLEOANCA, I. *et al.* Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 116, n. 6, p. 697–705, 2013.
- CHENEBAULT, C.; PERCHERON, B. Development of a simple and versatile process for commercial and municipal lignocellulosic waste conversion into fermentable sugars. *Bioresource Technology*, v. 386, p. 129497, out. 2023.
- CHENG, H.-H.; WHANG, L.-M. Resource recovery from lignocellulosic wastes via biological technologies: Advancements and prospects. *Bioresource Technology*, v. 343, p. 126097, 2022.
- DARWIN, C. *The Origin of Species*. Hemus – Livraria Editora Ltda, São Paulo, SP, Brazil. 1859.
- DRAGOSITS, M.; MATTANOVICH, D. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Factories*, v. 12, n. 1, p. 64, 2013.
- DU, C. *et al.* Co-utilization of multiple lignocellulose-derived sugars and inhibitors by the robust mutant *Kluyveromyces marxianus* through adaptive laboratory evolution. *Fuel*, v. 315, 1 maio 2022.
- ELIODÓRIO, K. P. *et al.* Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. *Advances in Applied Microbiology*, v. 109, p. 61–119, 2019.
- FAN, C. *et al.* Efficient ethanol production from corncob residues by repeated fermentation of an adapted yeast. *Bioresource Technology*, v. 136, p. 309–315, 2013.



GENCTURK, E.; ULGEN, K. O. Understanding HMF inhibition on yeast growth coupled with ethanol production for the improvement of bio-based industrial processes. *Process Biochemistry*, v. 121, p. 425–438, out. 2022.

HEMANSI *et al.* Development of multiple inhibitor tolerant yeast via adaptive laboratory evolution for sustainable bioethanol production. *Bioresource Technology*, v. 344, 1 jan. 2022.

HOPPERT, L.; KÖLLING, R.; EINFALT, D. Synergistic effects of inhibitors and osmotic stress during high gravity bioethanol production from steam-exploded lignocellulosic feedstocks. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 43, p. 102414, ago. 2022.

HU Z., *et al.* Liberation of acetic acid from lignocellulose during sterilization and its inhibitory effect on *Lentinula edodes*. *Scientia Horticulturae*. 306:111452. 2022.

ITTO-NAKAMA, K. *et al.* Prediction of ethanol fermentation under stressed conditions using yeast morphological data. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2023.

JAYAKUMAR, M. *et al.* Bioethanol production from agricultural residues as lignocellulosic biomass feedstock's waste valorization approach: A comprehensive review. *Science of The Total Environment*, v. 879, p. 163158, jun. 2023.

LIU, Z. *et al.* Effects of inhibitory compounds derived from lignocellulosic biomass on the growth of the wild-type and evolved oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Industrial Crops and Products*, v. 170, p. 113799, out. 2021.

MACHINENI, L. Lignocellulosic biofuel production : review of alternatives. *Biomass Conversion and Biorefinery*, p. 1–13, 2019.

MANSURE, J. J. C. *et al.* Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1191, n. 2, p. 309–316, 1994.

MAVROMMATI, M.; PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Improving ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* through adaptive laboratory evolution using high ethanol concentrations as a selective pressure. *Process Biochemistry*, 2022.

MENEGON, Y. A.; GROSS, J.; JACOBUS, A. P. How adaptive laboratory evolution can boost yeast tolerance to lignocellulosic hydrolyses. *Current Genetics*, v. 68, n. 3-4, p. 319–342, 1 abr. 2022.

MOHEDANO, M. T.; KONZOCK, O.; CHEN, Y. Strategies to increase tolerance and robustness of industrial microorganisms. *Synthetic and Systems Biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 533–540, 2022.

MORALES, P. *et al.* Development of an acetic acid tolerant *Spathaspora passalidarum* strain through evolutionary engineering with resistance to inhibitors compounds of autohydrolysate of *Eucalyptus globulus*. *Industrial Crops and Products*, v. 106, p. 5–11, 2017.

MOREMI, M. E.; RENSBURG, E. L. J. V.; GRANGE, D. C. La. 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, p. 1–13, 2020.

NDUBUISI, I. A. *et al.* Non-conventional yeast strains: Unexploited resources for effective commercialization of second generation bioethanol. *Biotechnology Advances*, v. 2, n. 2, p. 108100, jan. 2023.





NOURI, H.; AZIN, M.; MOUSAVI, S. L. Enhanced ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate with high content of inhibitors by an adapted *Barnettozyma californica*. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, v. 37, n. 3, p. 1169–1175, 26 set. 2017.

NOURI, H. *et al.* Detoxification vs. adaptation to inhibitory substances in the production of bioethanol from sugarcane bagasse hydrolysate: A case study. *Biomass and Bioenergy*, v. 139, p. 105629, 2020.

PAL, U.; VIJ, S. Adaptive evolution of *Kluyveromyces marxianus* MTCC1389 for high ethanol tolerance. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 45, p. 102533, 2022.

PONTES, R. P. C. Adaptation of pentose fermenting yeast strains in sunflower cake hydrolysate for bioethanol production. Diamantina. Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys, 2022.

RAJENDRAN, K. *et al.* Updates on the pretreatment of lignocellulosic feedstocks for bioenergy production—a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 8, n. 2, p. 471–483, 2018.

RAMESH, P.; ARUL MOZHI SELVAN, V.; BABU, D. Selection of sustainable lignocellulose biomass for second-generation bioethanol production for automobile vehicles using lifecycle indicators through fuzzy hybrid PyMCDM approach. *Fuel*, v. 322, p. 124240, 2022.

RIBEIRO, N. *et al.* Optimization of fermentation conditions of *pichia membranifaciens* for the production of second generation ethanol. *Química Nova*, v. 42 no. 7, 2019.

RIVERA, E. C. *et al.* Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modeling and validation under very-high-gravity fermentation conditions. *Biochemical Engineering Journal*, v. 119, p. 42–51, 2017.

ROQUE, L. R. *et al.* Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. *Fuel*, v. 242, n. January, p. 775–787, 2019.

SAINI, P. *et al.* Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation. *Process Biochemistry*, v. 72, p. 1–12, 2018.

SALMON, J. M. Effect of Sugar Transport Inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on Sluggish and Stuck Enological Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, n. 4, p. 953–958, 1989.

SAXENA, A. *et al.* Current status of metabolic engineering of microorganisms for bioethanol production by effective utilization of pentose sugars of lignocellulosic biomass. *Microbiological Research*, v. 276, p. 127478, nov. 2023.

SELVAKUMAR, P. *et al.* Optimization of binary acids pretreatment of corncob biomass for enhanced recovery of cellulose to produce bioethanol. *Fuel*, v. 321, p. 124060, 2022.

SEHNEM, N.T., *et al.* Second-generation ethanol production by *Wickerhamomyces anomalus* strain adapted to furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), and high osmotic pressure. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (92). 2020.

SHARMA, N. K. *et al.* Enhancement in xylose utilization using *Kluyveromyces marxianus* NIRE-K1 through evolutionary adaptation approach. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 39, n. 5, p. 835–843, 2016.



SINGH, S. *et al.* Deconstruction of lignocellulosic biomass for bioethanol production: Recent advances and future prospects. *Fuel*, v. 327, p. 125109, 2022.

SJULANDER, N.; KIKAS, T. Origin, impact and control of lignocellulosic inhibitors in bioethanol production—A review. *Energies*, v. 13, n. 4751, 2020.

SNOEK, T.; VERSTREPEN, K. J.; VOORDECKERS, K. How do yeast cells become tolerant to high ethanol concentrations? *Current Genetics*, v. 62, n. 3, p. 475–480, 2016.

SHRIVASTAVA, A.; SHARMA, R. K. Conversion of lignocellulosic biomass: Production of bioethanol and bioelectricity using wheat straw hydrolysate in electrochemical bioreactor. *Heliyon*, v. 9, n. 1, p. e12951, jan. 2023.

TRICHEZ, D. *et al.* Identification of traits to improve co-assimilation of glucose and xylose by adaptive evolution of *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis* yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 107, n. 4, p. 1143–1157, 10 jan. 2023.

TSAI, J.-Y., LU, P.-Y., & YANG, C.-F. Lignocellulosic acid hydrolysis inhibitor impact on 5-hydroxymethylfurfural biotransformation into 2, 5-furandicarboxylic acid using immobilised *Burkholderia* cells. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1–11. 2021.

TURANLI-YILDIZ, B. *et al.* In vivo evolutionary engineering for ethanol-tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* haploid cells triggers diploidization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 124, n. 3, p. 309–318, 2017.

WANG, S. *et al.* Furfural tolerance and detoxification mechanism in *Candida tropicalis*. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1). 2016.

WANG, S.; SUN, X.; YUAN, Q. Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: A review. *Bioresource Technology*, v. 258, p. 302–309, 2018.

WANG, L. *et al.* Comparative metabolic analysis of the adaptive *Candida tropicalis* to furfural stress response. *Chemical Engineering Science*. 2023.

YANG, H. *et al.* Wheat gluten hydrolysates and their fractions improve multiple stress tolerance and ethanol fermentation performances of yeast during very high-gravity fermentation. *Industrial Crops and Products*, v. 128, p. 282–289, 2019.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology*, v. 144, n. 1, p. 23–30, 2009.

ZHAO, C.; SHAO, Q.; CHUNDAWAT, S. P. S. Recent advances on ammonia-based pretreatments of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 298, p. 122446, 2020.

ZHU, Z. *et al.* Evolutionary engineering of industrial microorganisms-strategies and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 11, p. 4615–4627, 2018.