

## **Exploração de nichos fermentativos naturais para o isolamento de novas linhagens de leveduras oleaginosas tolerantes a hidrolisados lignocelulósicos**

Pesquisador Responsável: Wesley Cardoso Generoso

Instituição: Lab. Nacional de Biorrenováveis (LNBR)

Os óleos microbianos, também conhecido como óleo de célula única (*single-cell oil*, SCO), tem emergido como uma alternativa promissora para a produção sustentável de biocombustíveis e outros produtos petroquímicos, alinhando-se aos princípios de economia circular e uso de recursos renováveis [1]. Além disso, diversos microrganismos são capazes de acumular lipídios com composição de ácidos graxos semelhante à de óleos vegetais, ampliando o potencial de aplicação desses óleos nos setores alimentício e de rações [2]. Nesse contexto, leveduras oleaginosas destacam-se como plataformas atrativas para a produção de SCO, devido à sua rápida taxa de crescimento, menor dependência de áreas agrícolas extensivas e independência de variações sazonais [3,4]. Outra vantagem recai ao fato de as leveduras apresentarem elevada robustez frente a condições de estresse típicas de processos industriais, como flutuações de temperatura e oxigenação, e seu escalonamento se beneficiar de décadas de desenvolvimento de tecnologias de fermentação em larga escala.

Atualmente, *Rhodospiridium toruloides* e *Yarrowia lipolytica* são as leveduras oleaginosas mais estudadas para produção de SCO, sendo capazes de acumular mais de 40% de sua massa seca celular na forma de lipídios [5,6]. Embora ambas as espécies já disponham de um conjunto de conhecimento metabólico e ferramentas genéticas, estas apresentam baixo crescimento em hidrolisados lignocelulósicos não-detoxificados, devido à baixa tolerância a compostos inibidores gerados durante o pré-tratamento da biomassa. Contraditoriamente, o uso de hidrolisados lignocelulósicos *whole-slurry* de bagaço de cana-de-açúcar surge como uma alternativa estratégica para contornar algumas das limitações para destravar o desenvolvimento desta tecnologia num contexto nacional [7,8]. O termo *whole-slurry* refere-se ao hidrolisado gerado após o pré-tratamento da biomassa e hidrólise enzimática direta, contendo além dos açúcares solúveis, polímeros insolúveis e compostos derivados da hemicelulose e da lignina, os

quais atuam como inibidores microbianos [8,9]. Paradoxalmente, a presença desses compostos pode contribuir reduzindo riscos de contaminação durante o cultivo do SCO.

Diante desse cenário, o isolamento de novas linhagens naturalmente adaptadas a estas condições químicas estressantes torna-se uma estratégia altamente promissora. Anteriormente, nosso grupo isolou espécies de leveduras não-convencionais capazes de crescer e acumular lipídios diretamente em hidrolisados lignocelulósicos whole-slurry, explorando silagem de milho do estado de São Paulo (resultados em fase de publicação). Ambientes fermentativos, como frutos em decomposição e produtos de fermentação natural, como silagem e o mel do cacau, constituem nichos microbianos moldados pela elevada acidez orgânica e altos teores de álcoois, favorecendo microrganismos intrinsecamente tolerantes a estresses químicos. Essa combinação incomum sugere que a tolerância a substratos inibitórios e a capacidade de induzir a lipogênese podem emergir como propriedades complexas intrínsecas, moldadas por processos de seleção de longo prazo em habitats microbianos complexos, como nos fermentados naturais, em vez de dependerem de mecanismos específicos de resistência ou do redirecionamento pontual de vias metabólicas isoladas. Assim, a descoberta, compreensão e desenvolvimento de microrganismos não-convencionais e ecologicamente pré-adaptados representam uma estratégia complementar e altamente promissora para a biomanufatura industrial de SCO.

Nesse contexto, o presente projeto tem como objetivo isolar e caracterizar novas cepas dessas espécies de leveduras oleaginosas previamente identificadas, a partir de nichos microbiológicos de diferentes regiões do país. A identificação de novas linhagens permitirá aprofundar a compreensão da elevada tolerância a compostos inibidores como um possível caráter espécie-específico, além de possibilitar a descoberta de metabolismos lipogênicos ainda mais robustos. Adicionalmente, essas novas cepas poderão facilitar o desenvolvimento de ferramentas genéticas simplificadas, considerando que as cepas isoladas são diploides, estabelecendo, assim, novas plataformas biotecnológicas para a produção sustentável de oleoquímicos renováveis e contribuindo para a diversificação e o fortalecimento da bioeconomia no Brasil.

Atividades específicas incluídas na abordagem experimental serão:

- A) Obtenção de frutos em decomposição e produtos advindo de fermentação natural;
- B) Desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação de leveduras oleaginosas;
- C) Enriquecimento microbiano em meios de cultivo não-detoxificados e seleção de espécies oleaginosas putativas por citometria de fluxo;
- D) Avaliação genotípica, dos marcadores moleculares específicos desenvolvidos, e fenotípica dos isolados quanto crescimento e produção de ácidos graxos.

Atividade	Bimestre 1	Bimestre 2	Bimestre 3	Bimestre 4	Bimestre 5	Bimestre 6
A	X	X				
B	X	X	X			
C			X	X	X	
D					X	X

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] W.J. Fu, Z. Chi, Z.C. Ma, H.X. Zhou, G.L. Liu, C.F. Lee, Z.M. Chi, Hydrocarbons, the advanced biofuels produced by different organisms, the evidence that alkanes in petroleum can be renewable, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015). <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6840-6>.
- [2] J. Orsavova, L. Misurcova, J. Vavra Ambrozova, R. Vicha, J. Mlcek, Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015). <https://doi.org/10.3390/ijms160612871>.
- [3] R. Ledesma-Amaro, J.M. Nicaud, *Yarrowia lipolytica* as a biotechnological chassis to produce usual and unusual fatty acids, *Prog. Lipid Res.* 61 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.12.001>.
- [4] Y.K. Park, R. Ledesma-Amaro, What makes *Yarrowia lipolytica* well suited for industry?, *Trends Biotechnol.* 41 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.07.006>.
- [5] S. Magdouli, S.K. Brar, J.F. Blais, Morphology and rheological behaviour of *Yarrowia lipolytica*: Impact of dissolved oxygen level on cell growth and lipid composition, *Process Biochemistry* 65 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.10.021>.
- [6] Q. Fei, M. O'Brien, R. Nelson, X. Chen, A. Lowell, N. Dowe, Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source, *Biotechnol. Biofuels* 9 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0542-x>.

- [7] A.N. Marchesan, I.L. de M. Sampaio, M.F. Chagas, W.C. Generoso, T.A.D. Hernandez, E.R. Morais, T.L. Junqueira, Alternative feedstocks for sustainable aviation fuels: Assessment of sugarcane-derived microbial oil, *Bioresour. Technol.* 416 (2025) 131772. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131772>.
- [8] E.A. de Lima, F. Mandelli, D. Kolling, J. Matsusato Souza, C.A. de Oliveira Filho, M. Ribeiro da Silva, I. Lobo de Mesquita Sampaio, T. Lopes Junqueira, M. Ferreira Chagas, J.C. Teodoro, E.R. de Morais, M.T. Murakami, Development of an economically competitive *Trichoderma*-based platform for enzyme production: Bioprocess optimization, pilot plant scale-up, techno-economic analysis and life cycle assessment, *Bioresour. Technol.* 364 (2022) 128019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128019>.
- [9] C.A. Santos, M.A.B. Morais, F. Mandelli, E.A. Lima, R.Y. Miyamoto, P.M.R. Higasi, E.A. Araujo, D.A.A. Paixão, J.M. Junior, M.L. Motta, R.S.A. Streit, L.G. Morão, C.B.C. Silva, L.D. Wolf, C.R.F. Terrasan, N.R. Bulka, J.A. Diogo, F.J. Fuzita, F.M. Colombari, C.R. Santos, P.T. Rodrigues, D.B. Silva, S. Grisel, J.S. Bernardes, N. Terrapon, V. Lombard, A.J.C. Filho, B. Henrissat, B. Bissaro, J.-G. Berrin, G.F. Persinoti, M.T. Murakami, A metagenomic 'dark matter' enzyme catalyses oxidative cellulose conversion, *Nature* 639 (2025) 1076–1083. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08553-z>.