



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de São José do Rio Preto

Diego Alves Monteiro

Produção de ácidos orgânicos por cepas de leveduras assimiladoras de xilose

São José do Rio Preto  
2015

Diego Alves Monteiro

Produção de ácidos orgânicos por cepas leveduras assimiladoras de xilose

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleni Gomes

São José do Rio Preto  
2015

Alves Monteiro, Diego.

Produção de ácidos orgânicos por cepas leveduras assimiladoras de xilose / Diego Alves Monteiro. – São José do Rio Preto, 2015

58 f. : il., tabs.

Orientador: Eleni Gomes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia Industrial. 2. Levedos – Aplicações Industriais. 3. Xilose. 4. Fermentação. 5. Ácidos orgânicos. 6. Biomassa – Microbiologia. I. Monteiro, Diego Alves. II. Gomes, Eleni. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 663.12

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Diego Alves Monteiro

Produção de ácidos orgânicos por cepas leveduras assimiladoras de xilose

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleni Gomes  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso  
USP – Piracicaba

Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Ferrarezi Duarte  
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
28 de maio de 2015

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe, responsável por todas as coisas boas que acontece na minha vida.

A Natalia, pelo carinho, incentivo e paciência de permanecer ao meu lado me garantindo uma vida mais agradável

Ao Júlio, que me ensinou trabalhar em Laboratórios e me incentivou a seguir carreira acadêmica

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Eleni, por me depositar confiança, dar oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pelo seu investimento em minha formação.

Ao Prof. Roberto da Silva e Prof. Maurício Boscolo, por permitir frequentar seus laboratórios para iniciar minhas atividades no IBILCE.

A todos meus amigos do laboratório, que a maioria das vezes é motivo de eu ir ao Lab.

Aos meus amigos do IBILCE, por contribuir com o bom funcionamento do Lab.

A Fapesp pela concessão de auxílio financeiro para o laboratório.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia.

Ao IBILCE.

## RESUMO

A hidrólise de polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica libera grande quantidade de pentoses, cuja fermentação a etanol poderia ser um complemento ao etanol obtido pela fermentação da glicose oriunda da sacarificação da celulose (etanol 2G). Entretanto, apesar dos esforços em pesquisa, esta ainda é uma tecnologia a ser desenvolvida. Por outro lado, o uso das pentoses como substrato para obtenção de outros bioprodutos com maior valor agregado que o etanol é uma via alternativa economicamente sustentável. O presente projeto propôs o estudo de cepas de leveduras assimiladoras xilose focando os metabólitos gerados a partir do uso desse açúcar como única fonte de carbono. Para esse estudo, foram selecionadas as leveduras *Pichia kluyveri* G1.1; *Hanseniaspora* sp. G4.1; *Hanseniaspora* sp. G7.1; *Candida oleophila* G10.1; *Metschnikowia koreensis* G18 com base nos potenciais de assimilação de xilose por elas apresentados em trabalho prévio. Os dados mostraram que as cepas *Hanseniaspora* sp. G4.1, *Hanseniaspora* sp. G7.1 e *C. oleophila* G10.1 consumiram 100% da xilose do meio em 120 h. *M. koreensis* G18 consumiu aproximadamente 70% em 96 h e a cepa *P. kluyveri* G1.1, foi a que apresentou menor taxa de consumo de xilose (50% em 120 h). A avaliação qualitativa dos ácidos orgânicos secretados pelas cepas nesses cultivos revelou a presença dos ácidos oxálico, cítrico, maleico, tartárico, málico, pirúvico, láctico, fumárico, acético, propiônico, isobutírico e butírico nos meios de cultura das leveduras. Em cultivos utilizando meios com diferentes valores de pH iniciais e concentrações de xilose, constatou-se a influência desses fatores sobre a produção de ácidos orgânicos por *M. koreensis* G18, porém, não foram significantes para as demais leveduras.

Palavras-chave: Leveduras, xilose, ácidos orgânicos.

## ABSTRACT

The hydrolysis of polysaccharides from lignocellulosic biomass releases high quantity of pentoses, whose fermentation to ethanol could be a complement that obtained by fermentation of glucose derived from cellulose saccharification (2G ethanol). However, despite efforts in research, this is still a technology in development. Moreover, the use of pentoses as a substrate for obtaining value-added bioproducts is an alternative to ethanol and an economically viable route. This project proposes the study of xylose assimilating yeast focused on metabolites generated from the use of xylose as carbon source. *Pichia kluyveri* G1.1; *Hanceniaspora* sp. G4.1; *Hanceniaspora* sp. G7.1; *Candida oleophila* G10.1; *Metschnikowia koreensis* G18 were selected for this study based on their potential of assimilation of xylose studied in previous work. The data showed that *Hanceniaspora* sp. G4.1, *Hanceniaspora* sp. G7.1 and *C. oleophila* G10.1 consumed 100% of xylose from the culture medium in 120 h. *M. koreensis* G18 consumed approximately 70% in 96 h and *P. kluyveri* G1.1 was the strain that presented the lowest xylose consumption rate ( 50% in 120 h). Qualitative evaluation of the organic acids secreted by strains in these cultures revealed the presence of oxalic, citric, maleic, tartaric, malic, pyruvic, lactic, fumaric, acetic, propionic, isobutyric, and butyric acid. In cultivation using culture media with different initial pH values and concentrations of xylose it was observed that these factors influence the production of organic acids by *M. koreensis* G18, however, were not significant for other yeasts.

Keywords: Yeast, xylose, organic acid.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Utilização de xilose e glicose por leveduras (retirado de Hahn-Hägerdal et al., 1994). 16
- Figura 2. Cultivo das cepas (a) *P. kluyveri* G1.1, (b) *Hanseniaspora* sp. G4.1, (c) *Hanseniaspora* sp. G7.1, (d) *C. oleophila* G10.1 e (e) *M. koreensis* G18 em meio com 2 % de xilose por 120 h. Concentração de xilose (-■-), biomassa (-●-) e pH (-▲-) do meio..... 32
- Figura 3. Intensidade das bandas cromatográficas respectivas aos ácidos orgânicos produzidas pela cepa *P. kluyveri* G1.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo. .... 37
- Figura 4. Intensidade das bandas cromatográficas respectivas aos ácidos orgânicos produzidas pela cepa *Hanseniaspora* sp. G4.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo. .... 37
- Figura 5. Intensidade das bandas cromatográficas respectivas aos ácidos orgânicos produzidas pela cepa *Hanseniaspora* sp. G7.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo. .... 38
- Figura 6. Intensidade das bandas cromatográficas respectivas aos ácidos orgânicos produzidas pela cepa *C. oleophila* G10.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo..... 38
- Figura 7. Intensidade das bandas cromatográficas respectivas aos ácidos orgânicos produzidas pela cepa *M. koreensis* G18 ao longo de 120 horas (h) de cultivo..... 39
- Figura 8. Intensidade das bandas cromatográficas desconhecidas produzidas pela cepa *P. kluyveri* G1.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo. .... 44
- Figura 9. Intensidade das bandas cromatográficas desconhecidas produzidas pela cepa *Hanseniaspora* sp. G4.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo. .... 44
- Figura 10. Intensidade das bandas cromatográficas desconhecidas produzidas pela cepa *Hanseniaspora* sp. G7.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo. .... 45
- Figura 11. Intensidade das bandas cromatográficas desconhecidas produzidas pela cepa *C. oleophila* G10.1 durante ao longo de 120 horas (h) de cultivo. .... 45
- Figura 12. Intensidade das bandas cromatográficas desconhecidas produzidas pela cepa *M. koreensis* G18 ao longo de 120 horas (h) de cultivo. .... 46

Figura 13. Concentração de xilose em 0, 24 e 120 horas (h) de cultivo em pH 4,5, 5,5 e 6,5 em diferentes concentrações de xilose no cultivo da cepa *M. koreensis* G18. a= consumo de xilose; b=biomassa, c= pH final..... 49

Figura 14. Concentração de ácidos orgânicos no meio de cultivo de *M. koreensis* G18, em 120 h de cultivo, pH 4,5, 5,5 e 6,5 e em diferentes concentrações de xilose. .... 50

Figura 15. Intensidade das bandas cromatográficas desconhecidas produzidas pela cepa *M. koreensis* G18 no início e final do cultivo em diferentes pHs e concentrações iniciais de xilose. a= 28 mg.mL<sup>-1</sup> pH 4,5; b= 28 mg.mL<sup>-1</sup> pH 5,5; c= 28 mg.mL<sup>-1</sup> pH6,5; d= 35 mg.mL<sup>-1</sup> pH 4,5; 35 mg.mL<sup>-1</sup>; e= 35 mg.mL<sup>-1</sup> pH 5,5; f= 35 mg.mL<sup>-1</sup> pH 6,5..... 52

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Bandas cromatográficas obtidas nas análises cromatográficas dos meios de cultivo das leveduras e do controle abiótico. As bandas foram idetificadas e diferenciadas pelos respectivos tempos de retenção na coluna. .... 34
- Tabela 2. Bandas cromatográficas, referentes aos ácidos orgânicos, obtidas pelas análises dos meios de cultivo das leveduras. .... 36
- Tabela 3. Concentração de ácido cítrico obtido nos cultivos das cepas *P. kluyveri* G1.1, *Hanseniaspora* sp G4.1, *Hanseniaspora* sp G7.1, *C. oleophila* G10.1 e *M. koreensis* G18..... 39
- Tabela 4. Concentração de ácido láctico obtido nos cultivos das cepas *P. kluyveri* G1.1, *Hanseniaspora* sp G4.1, *Hanseniaspora* sp G7.1, *C. oleophila* G10.1 e *M. koreensis* G18 ..... 40
- Tabela 5. Concentração de ácido tartárico obtido nos cultivos das cepas *P. kluyveri* G1.1, *Hanseniaspora* sp G4.1, *Hanseniaspora* sp G7.1, *C. oleophila* G10.1 e *M. koreensis* G18..... 42

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1.	Fisiologia da fermentação de pentoses por leveduras.....	13
2.2.	Produção biológica de ácidos orgânicos.....	17
3.	OBJETIVOS.....	25
3.1.	Gerais.....	25
3.2.	Específicos.....	25
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1.	Micro-organismos.....	26
4.2.	Padronização do inóculo para cultivo das cepas.....	27
4.3.	Cultivo para produção dos ácidos orgânicos.....	28
4.4.	Efeitos do pH inicial e concentrações de xilose do meio de cultura sobre a produção de ácidos orgânicos pelas leveduras.....	28
4.5.	Métodos analíticos.....	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1.	Consumo de xilose, crescimento celular e variação no pH do meio de cultura.....	30
5.2.	Análises qualitativas e quantitativas dos ácidos orgânicos presentes nos meios de cultivo das leveduras.....	33
5.3.	Efeitos da variação do pH e concentração de xilose iniciais dos meios de cultivo sobre o consumo de xilose, crescimento celular, variações dos pH dos meios de culturas e produção de metabolitos pela cepa <i>M. koreensis</i> G18.....	47
6.	CONCLUSÕES.....	54
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

## 1. INTRODUÇÃO

Formas alternativas de produção de combustíveis estão sendo estudadas, entre as quais a utilização da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol. Essa biomassa corresponde a materiais residuais oriundos das atividades de exploração agroindustrial e florestal que incluem principalmente, palhas de arroz e trigo, sabugo de milho, casca de aveia, bagaço e palha de cana-de-açúcar.

Os materiais lignocelulósicos são compostos por três grandes grupos de polímeros: celulose, lignina e hemicelulose. A celulose é um homopolímero formado por resíduos de glicoses unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. As hemiceluloses são heteropolímeros altamente ramificados, constituídos de hexoses (galactose, glicose e manose) e pentoses (xilose e arabinose), sendo a xilose o principal produto da hidrólise da hemicelulose. A lignina é um polímero amorfo formado por unidades de fenilpropanol ligadas por ligações éter biologicamente estáveis e constitui maior fração de não-carboidratos da lignocelulose (LEE et al., 2007).

A hidrólise da celulose e hemicelulose gera uma mistura de pentoses e hexoses e para que o processo de produção de etanol seja viável é necessário que o micro-organismo seja capaz de fermentar ambos os açúcares presentes no hidrolisado. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tradicionalmente utilizada nos processos de produção de etanol, não é capaz de fermentar eficientemente a xilose a etanol.

Várias espécies de leveduras tem sido relatadas como sendo capazes de assimilar a xilose, por vias oxidativas ou fermentativas, sendo os gêneros mais frequentes *Brettanomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen*, *Pichia*, e *Schizosaccharomyces*. Algumas dessas cepas produzem etanol enquanto outras produzem alta taxa de biomassa. Entretanto, algumas dessas leveduras

apesar de consumir até 80% da xilose presente no meio, produzem pouca biomassa e não produzem etanol. Considerando que a fisiologia das leveduras assimiladoras de pentose ainda não é bem conhecida, a questão científica levantada é sobre quais seriam os produtos formados a partir do consumo da xilose.

É bem conhecido que várias leveduras assimiladoras de xilose produzem xilitol, porém, apenas alguns trabalhos referem-se a outros compostos como ácidos orgânicos e antioxidantes. Desse modo, propôs-se nesse estudo avaliar o crescimento das cepas de leveduras assimiladoras de xilose em presença desse açúcar como única fonte de carbono, investigando-se o meio de cultura na tentativa de detectar e identificar ácidos orgânicos. Esses compostos apresentam grande importância biotecnológica, com grande aplicação na indústria farmacêutica, de alimentos e de síntese química o que lhes confere um alto valor agregado.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Fisiologia da fermentação de pentoses por leveduras**

Nas últimas décadas, vários estudos sobre isolamento e seleção de leveduras relataram espécimes com capacidade de fermentar xilose. Entre essas, as mais frequentemente relatadas pertencem aos gêneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen*, *Pichia* e *Schizosaccharomyces* (GONG et al., 1983; McMILLAN, 1993; CHANDRAKANT; BISARIA, 1998), embora outros gêneros como *Aureobasidium*, *Citeromyces*, *Clavispora*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Issatchenkia*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*,

*Saccharomycopsis*, *Sporopachydermia*, *Torulaspota* e *Wingea* também tenham sido reportados produzindo etanol, desde quantidades traços até rendimentos de 0,3 g etanol/g xilose, dependendo das condições experimentais (GONG et al., 1981; TOIVOLA et al., 1984; NIGAM et al., 1985; RAO; BHADRA; SHIVAJI, 2008; FUGITA, 2010).

Além dos estudos com cepas naturalmente fermentadoras de xilose, pesquisas para obtenção de linhagens de *S.cerevisiae* geneticamente modificadas para fermentar pentoses, também estão sendo realizadas, chegando-se a rendimentos entre 0,3-0,4 g etanol/g xiloses (GOVINDASWAMY; VANE, 2007; TIAN et al., 2008; VAN VLEET; JEFFRIES, 2009).

As espécies de destaque na literatura quanto à produtividade de etanol a partir de xilose são *C. shehatae*, *P.stipitis* e *P. tannophilus*, no entanto, diversos estudos com cepas de *K. marxianus* e *C. tropicalis* também mostraram bons resultados quanto a produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos (SUK-JIN et al., 2010).

Da mesma forma que técnicas de engenharia genética estão sendo aplicadas a *S. cerevisiae*, as leveduras fermentadoras de pentoses também têm sido submetidas a alterações genéticas. Jeffries (1984) induziu mutação por radiação em *P. tannophilus* e, sob condições aeróbias, as linhagens mutantes produziram etanol duas vezes mais rápido e com rendimento 32% maior do que a linhagem selvagem. Em condições anaeróbias, essas linhagens produziram etanol a partir de xilose 50% mais rápido do que a linhagem selvagem, mas com mesmo rendimento. Watanabe e colaboradores (2011) submeteram *P. stipitis* à radiação UV e obtiveram um mutante que produziu 4,3% de etanol a partir de xilose, em meio com concentração de 11,4% desse açúcar, contra apenas 3,1% do selvagem. Além disso, obtiveram linhagens mutantes com tolerância a 7% de etanol, sob condições aeróbias.

A assimilação de xilose e sua conversão a etanol por leveduras tipicamente xilose-fermentadoras seguem vias diferentes daquela de *S. cerevisiae*, a qual é discutida a seguir.

O transporte de D-xilose através da membrana de leveduras ocorre por sistemas de baixa e alta afinidade. Entre esses sistemas estão a difusão facilitada e o mecanismo simportador ligado a co-transporte de próton e esses sistemas são dependentes do estado nutricional da levedura. Por exemplo, *Rhodotorula elutinis* tem pelo menos um sistema de transporte de baixa e um de alta afinidade para D-xilose. Esse último é reprimido quando a levedura cresce em xilose e desreprimido em *starvation*. Ambos os sistemas são totalmente reprimidos por glicose, sugerindo serem os mesmos que transportam esse açúcar (KILIAN; UDEM, 1988).

Em *P. stipitis*, os transportes tanto de xilose como de glicose ocorrem principalmente por sistema simportador com próton. Em *C. shehatae* o transporte de D-glicose, D-xilose e D-manose ocorrem principalmente por difusão facilitada, sendo para D-glicose com alta afinidade/baixa capacidade e para D-xilose ou D-manose, de baixa afinidade/alta capacidade. Portanto, a glicose exerce efeito competitivo inibitório sobre a absorção dos outros dois açúcares. Sob *starvation*, um sistema simportador ligado a co-transporte de próton com alta afinidade é induzido para glicose ( $K_m$  - 0.12mM) e D-xilose ( $K_m$  - 1.0mM) (DOES; BISSON, 1989).

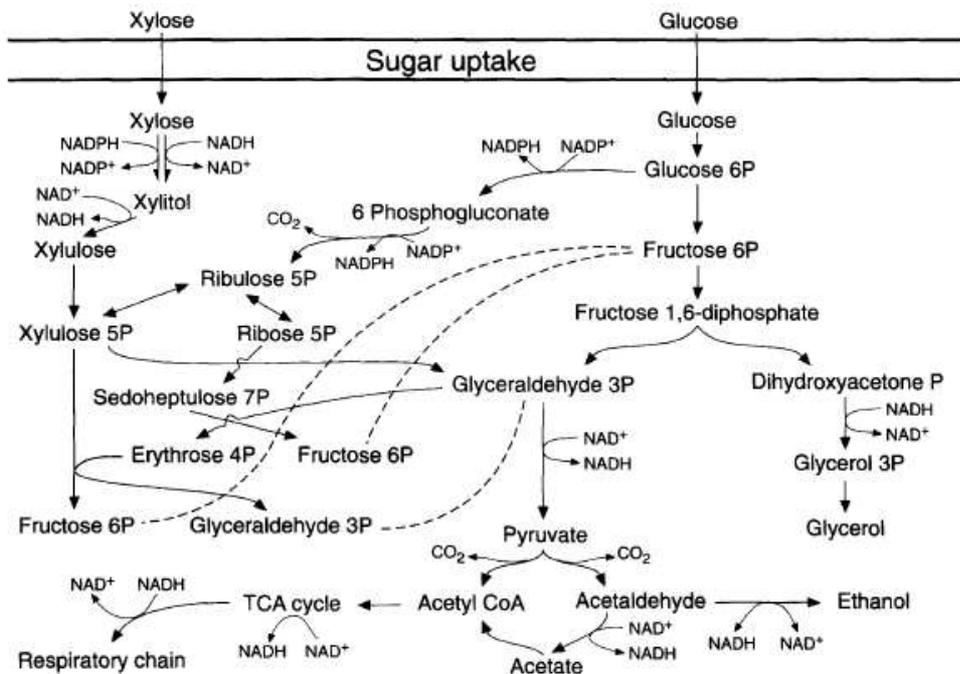
Após o transporte, as leveduras convertem xilose a xilulose por meio duas reações de oxiredução, seguindo-se a fosforilação a xilulose-5-fosfato. A primeira reação é catalisada pela enzima xilose-redutase NAD(P)H-dependente (aldose-redutase EC 1.1.1.21) que converte xilose a xilitol. Este último é oxidado a xilulose pela enzima xilitol-desidrogenase  $NAD^+$ -dependente (XDH; EC 1.1.1.9) que é subsequentemente fosforilado pela xiloquinase (EC 2.7.1.17).

O xilitol formado na primeira etapa pode, dependendo do balanço redox da célula (equilíbrio entre NADPH e  $NAD^+$ ) ser secretado para o meio externo, resultando em baixo

rendimento em etanol (BRUINNENBERG et al., 1984). Desse modo, o potencial redox da célula pode determinar o sucesso do processo fermentativo de xilose, devendo, por isso, ser considerado na busca novas cepas para esses processos de fermentação.

O requerimento de oxigênio durante a fermentação da xilose é frequentemente relacionado ao aparente desequilíbrio redox. Em condições anaeróbicas, devido a diferença de cofator das duas enzimas, ou seja, uma requer NADPH e outra NAD, ocorre um acúmulo de NADP<sup>+</sup> e NADH. O NADP<sup>+</sup> pode ser reduzido via frutose-6-fosfato, porém esse sistema, em algumas leveduras, não reoxida NADH em ausência de oxigênio, levando a secreção de xilitol. Como essas leveduras não têm atividade transidrogenase (NADH, NADP<sup>+</sup>, NAD<sup>+</sup> e NADPH) o equilíbrio não pode se obtido por essa rota (Figura 1).

**Figura 1.** Utilização de xilose e glicose por leveduras (retirado de Hahn-Hägerdal et al., 1994).



Entretanto, *P. stipitis*, *C. shehatae* e *P.tannophilus* tem atividade de xilose redutase (EC 1.1.1.307) com dupla especificidade pelo co-fator o que alivia o balanço redox e permite produção de etanol em anaerobiose, sem a secreção de xilitol. Em função de cada grupo de leveduras ter um perfil de resposta em função do equilíbrio redox e presença de oxigênio, a avaliação desse parâmetro deve ser feita para cada espécime estudado. A xilulose-5-fosfato formada é metabolizada pela via das pentoses fosfato. Essa via, aparece na grande maioria dos eucariotos e tem a função de suprir as necessidades de NADPH, ribose-P e eritrose 4-P para as vias de síntese normais das células. Em geral, cerca de 0,9 a 10 % da glicose é metabolizada por essa via (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994).

Em leveduras fermentadoras de xilose, a totalidade do açúcar é metabolizada pela via das pentoses fosfato com conversão de xilulose-5-fosfato a frutose que é direcionada por intersecção da via glicolítica a piruvato. A partir do piruvato, rotas oxidativas ou fermentativas pode se seguir. Na via fermentativa, o piruvato é descarboxilado e convertido a etanol com re-oxidação do NADH (LEE; WEBB, 1990).

## **2.2. Produção biológica de ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos podem ser obtidos de diversas fontes naturais e tem importante aplicação na indústria de alimentos e cosmética como acidulantes e preservativos, na indústria de síntese química ou diretamente como aditivos e medicamentos. Muitos dos ácidos de importância alimentícia e médica são intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico sendo, na maioria, acumulados nas células do organismo produtor sob condições específicas, poucos são secretados ao meio (GARCÍA-FRAILE et al., 2013).

O ácido cítrico (2-hidroxi-1,2,3 ácido propanotricarboxílico) é formado como metabólito primário no ciclo do ácido tricarboxílico. Em meio com alta concentração de glicose, ocorre uma alta produção desse ácido a partir de duas reações do piruvato. Duas moléculas de ácido pirúvico são formadas pela via glicolítica a partir de uma molécula de glicose; uma é convertida em acetil-CoA via piruvato desidrogenase (EC 1.2.1.51) enquanto a outra é carboxilada pela piruvato-carboxilase (EC 6.4.1.1) resultando em ácido oxaloacético, que é reduzido a ácido málico. Este, que entra na mitocôndria via transportador malato-citrato e junto com acetil-CoA forma o ácido cítrico por reação catalisada pela enzima mitocondrial citrato sintase (EC 2.3.3.1) (YOSHIDA; YOKOYAMA, 2012).

Várias espécies microbianas são capazes de acumular ácido cítrico durante o metabolismo primário como os fungos *A. niger*, *A. wentii*, *Penicillium luteum* e *Trichoderma viride*. Entre as leveduras, a *C. guilliermondii* e *Saccharomycopsis lipolytica* tem sido descritas como produtoras de ácido cítrico em grande quantidade (KUBO et al., 2000).

O ácido cítrico é usado como agente flavorizante e conservante de bebidas como refrigerantes e equivalentes. Tem sido usado também como quelante de metais em suplementos alimentícios, como produto de limpeza doméstico, para estocagem de sangue e preparações cosméticas, pois atua como inibidor bacteriano e como antioxidante. A produção anual desse ácido está em torno de 1,6 Mi de toneladas/ano e 99% dessa produção é feita por fermentação microbiana, principalmente por *A. niger*. O ácido Isocítrico ((1*R*,2*S*)-1-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxiato, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) é um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico sintetizado a partir do ácido cítrico via um intermediário ácido *cis*-aconítico por ação da enzima aconitase hidratase presente na maioria das frutas e hortaliças (PAPAGIANI, 2007).

A produção de ácido cítrico e isocítrico em grande quantidade foram detectadas em *C. lipolytica*, *C. oleophila*, *C. parapsilosis*, *C. brumptii*, *C. guilliermondii*, *C. zeylanoides*, *C. pulcherrima*, *C. chalmersi*, *P. polymorpha*, *Hansenula pelliculosa* em meio contendo hexadecano, tetradecano, glicose, *n*-parafinas, acetato de cálcio, butirato de cálcio, óleos de soja, de peixe, de canola, etanol e glicerol.

O ácido succínico (ácido butanodióico,  $C_4H_6O_4$ ) é intermediário do ciclo do ácido tricarbóxico, sintetizado a partir da ação da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato-desidrogenase (EC 1.2.4.2) e, em condições de aerobiose, é imediatamente convertido a fumarico pela succinato-desidrogenase (EC 1.3.5.4). Em anaerobiose, o succinato pode ser o produto final. Enquanto por via aeróbica 4 dos 6 carbonos da glicose são convertidos em uma molécula de 4 carbono (ácido succínico), em anaerobiose 2 moléculas são produzidas devido a carboxilação pela fosfoenolpiruvato-carboxilase (EC 4.1.1.31) (GOLDENBERG et al., 2006).

O ácido fumarico (ácido *trans* 2-butenodióico,  $C_4H_4O_4$ ) é um isômero *trans* de ácido dicarbóxico simétrico, insaturado. O isômero *cis* é o ácido maleico. O ácido fumarico não se acumula sob condições normais de crescimento microbiano, requerendo alterações no meio de cultivo e sua síntese ocorre por meio do ciclo oxidativo do ciclo do ácido tricarbóxico na mitocôndria (LEE et al., 2014).

Espécies de *Rhizopus* (*R. nigricans*, *R. oryzae*) produzem altas concentrações desse ácido que é secretado no meio. Nesses fungos, o ácido fumarico é formado a partir por carboxilação do piruvato produzindo ácido oxalacetato que é convertido a ácido L-málico e então a fumarato (enzimas piruvato-carboxilase, EC 6.4.1.1; malato-desidrogenase, EC 1.1.1.37; e fumarase, EC 4.2.1.2). Embora na maioria dos eucariotos a piruvato-carboxilase esteja localizada na mitocôndria, em alguns fungos, como *Rhizopus* e *Aspergillus*, encontra-se no citosol e na

mitocôndria, sendo, no citosol, parte de reação redutiva do ciclo do ácido tricarboxílico, sob condições aeróbicas (QING et al., 2012).

O ácido fumárico tem aplicação como acidulante em alimentos, em tintas de impressora cobertura de superfícies plásticas e é usado para síntese industrial de ácido L-málico por ação da enzima fumarase ou de ácido L-aspartico (aspartame) por ação da enzima aspartase (EC 4.3.1.1) e como intermediários na síntese de poliéster insaturado e resinas. Na indústria farmacêutica, é usado na produção de dimercaptosucinato e fumarato férrico (colírio) ou éster de ácido fumárico (monoetilfumarato e dimetilfumarato) para tratamento de psoríase (doença inflamatória da pele) (GOLDBERG; ROKEM, 2009).

A carboxilação do ácido pirúvico gera oxalacetato que é reduzido a ácido L-málico, reação é fundamental para o acúmulo de ácido L-málico nas células (PINES et al., 1996). Bactérias como *Brevibacterium flavum*, *B. ammoniagenes* com alta atividade de fumarato hidratase foram capazes de converter fumarato a L-malato e a levedura *S. cerevisiae*, transformada com o gene da enzima fumarase (EC 4.2.1.2), também tem sido usada para converter fumarato a L-malato. Fungos filamentosos como *A. flavus*, *A. oryzae* e *A. niger* são capazes de acumular grande quantidade de L-malato. Embora sejam conhecidos, esses processos biológicos ainda não são empregados na indústria para a produção do L-málico via fermentação (VRSALLOVI et al., 2007).

O ácido málico é muito usado na indústria de alimentos para a produção de doces diversos e bebidas, com a função de baixar o pH, exercer ação anti-microbiana e realçar e fixar flavor. Nas indústrias, têxtil, de placas eletrônicas e de tintas, também tem grande aplicação principalmente em função da ação antimicrobiana (GOLDBERG; ROKEM, 2009).

O ácido glicônico (ácido 2,3,4,5,6-pentahidroxi capróico,  $C_6H_{12}O_7$ ) é resultante da oxidação da glicose e faz parte de metabolismo secundário, principalmente de fungos. A função fisiológica desse ácido possivelmente esteja relacionada à competição do micro-organismo no meio, o qual remove a glicose do meio e a acumula como ácido que poderá ser usado quando o açúcar do meio for reduzido. Vários micro-organismos acumulam ácido glicônico como *A. niger*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Gonatotryps*, e *Gliocladium*, e também bactéria oxidativas como *Pseudomonas*, *Gluconobacter* (*Acetobacter*), *Moraxella*, *Micrococcus*, *Enterobacter* e *Zymomonas* (KIRIMURA et al., 2011).

A formação do ácido glicônico ocorre na face externa da membrana citoplasmática por ação da enzima glicose-oxidase (EC 1.1.3.4), presente na parede celular e se dá por meio de dois passos: primeiro a glicose oxidase oxida a D-glicopiranosose a D-glico-1,5-lactona e forma peróxido de hidrogênio que, posteriormente, é degradado a oxigênio e água pela catalase (EC 1.11.1.6). A hidrólise da lactona a ácido glicônico ocorre pela ação da enzima gliconolactanase (EC 3.1.1.17), mas pode ocorrer também espontaneamente em água, embora com velocidade seis vezes menor (BIN et al., 2014).

O ácido 5-ceto-D-glicônico (5-KGA,  $C_6H_{10}O_7$ ) é obtido por conversão da glicose em ácido 2-cetoglicônico (2-KGA) e subsequentemente a 5-KGA, pode ser realizada pela bactéria *G. oxydans*. Três etapas são seguidas nesse processo. Na primeira, a enzima pirroloquinolina quinina (PQQ)-glicose desidrogenase-dependente (EC 1.1.5.2) catalisa a oxidação de glicose a ácido D-glicônico. Na segunda, a enzima PQQ-5-desidrogenase gliconato-dependente converte o D-glicônico a 5-KGA e na terceira etapa, a gliconato-2-desidrogenase flavina-dependente, converte o 5-KGA a 2-KGA (YANG et al., 2006).

O ácido 2-ceto-D-glicônico (2-KGA,  $C_6H_{10}O_7$ ), acumulado por *G.oxydans*, *Acetobacter pasteurianus*, *A. aceti*, *A. cerinus*, *Enterobacter intermedium*, e *Klebsiella aerogenes* é usado industrialmente como intermediário na produção de ácido D-isoascórbico e pode ser produzido em altas concentrações pelo gênero *Pseudomonas* e por *Serratia marcescens*.

O ácido L-ascórbico (3-ceto-L-gulofuranolactona, vitamina C,  $C_6H_8O_6$ ) tem função importante nas células de primatas por estimular as enzimas oxidases envolvidas na síntese de colágeno. Uma vez que a enzima l-gulono-1,4-lactona oxidase (EC 1.1.3.8) não é produzida por esse grupo, a vitamina C tem que ser adquirida pelos alimentos como frutas cítricas e hortaliças. A produção de ácido ascórbico segue a via Reichstein–Grussner que corresponde a um processo de duplo passo: um biológico, no qual o D-sorbitol é convertido a L-sorbose por bactérias como *Gluconobacter suboxydans*, *Acetobacter xylinum*, ou outros gêneros de uso potencial como *Ketogulonicigenium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, e *Corynebacterium* e outro, de alteração química da sorbose a ácido ascórbico. O ácido ascórbico tem ampla aplicação na indústria alimentícia como antioxidante de diversos produtos e bebidas, além de ser muito usado em formulações farmacêuticas e cosméticas (LEUNG; LOEWUS, 1985).

O ácido L-tartárico (ácido L-2R,3R-ácido dihidrobutanodióico,  $C_4H_6O_6$ ). Esse ácido ocorre naturalmente em diversos sucos de frutas, como tamarindo, uvas verdes e em vinhos, porém, o processo de produção industrial via fermentação ainda não é conhecido embora as bactérias *Corynebacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Alcaligenes levotartaricus*, *Acinetobacter tartaricus* e *P.agrobacterium*) apresentem alta atividade de ácido *cis*-epoxisuccinico hidrolase (EC 3.3.2.9) estéreo específica para ácido L-tartárico (GOLDBERG; ROKEM, 2009).

O ácido tartárico tem aplicação na indústria de alimentos como emulsificante e acidulante de produtos de panificação e confeitos, conservantes em geléias, pickles e refrigerantes. Pode ser

usado como veículo em medicamentos, visto não ser metabolizado no organismo humano. (GOLDBERG; ROKEM, 2009).

O ácido itacônico (ácido metilenosuccinico,  $C_5H_6O_4$ ) é formado por fermentação de açúcares por fungos como *Aspergillus itaconicu* e *A. terreus*. A via de síntese a partir de glicose pode ocorrer por via glicolítica ou por via anaplerótica com a inserção de  $CO_2$  no ácido oxalacético. O ácido itacônico é formado no citosol por ação da enzima aconitato-descarboxilase (EC 4.1.1.6) a partir do ácido *cis*-aconítico ou via piruvato com formação de ácido citramálico, citraconico, itartárico e finalmente itacônico. Diferente dos demais ácidos orgânicos, o itacônico não tem aplicação em alimentos, mas tem grande importância na indústria de polímeros e seus derivados e podem ser usados na formulação de medicamentos, cosméticos, lubrificantes e herbicidas (KIRIMURA et al., 2011).

O ácido kójico (5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona,  $C_6H_6O_4$ ) é um metabólico fúngico, presente em poucas espécies como *A. oryzae* e é um potente inibidor do crescimento de bactérias, fungos e vírus, além de inibir a ação catecolase da enzima tirosinase (EC 1.10.3.1) que é essencial para a biossíntese de melanina. Apresenta também ação antioxidante prevenindo escurecimento de frutas e sucos, ação protetora de cor, preservação da cor de frutos do mar, e aplicação na indústria cosmética (MARUI et al., 2011).

O ácido acrílico (ácido 2-propenóico,  $C_3H_4O_2$ ), é um ácido insaturado com carboxila no C3 e é produzido em 3,4 milhões de ton/ano. O éster e sais do ácido acrílico, conhecido como acrilatos reagem entre si ou com outros monômeros (amidas acrilonitrila, vinil, estireno e butadieno) formando homopolímeros, como o ácido poliacrílico ou co-polímeros (LEVITAL et al., 2009). A fermentação a partir de açúcares produz intermediários como a alanina, ácido metilcítrico, metilmalonil-CoA, ácido láctico, e ácido 3-hidroxiopropiônico que forma o ácido

lático, que é convertido a ácido acrílico por desidratação química. A conversão biológica ocorre em *Clostridium propionicum*, mas não existe processo industrial. Outra possibilidade biológica é por meio da enzima nitrilase (EC 3.5.5.1), produzida por *Rhodococcus rhodochrous*, *Alcaligenes faecalis*, e *Klebsiella ozaenae* para converter acetonitrila em ácido acrílico (XU et al., 2006).

O ácido adípico (ácido butano-1,4-dicarboxílico,  $C_6H_{10}O_4$ ) é um produto de oxidação de lipídeos por peroxidação e é usado na produção de plásticos, lubrificantes e poliésteres. Tem aplicação na indústria de alimentos como geleificante, acidulante, flavorizante e tamponante, e na preparação de pesticidas, corantes e fármacos (intermediários das cefalosporinas). A via biológica de produção é a oxidação de ciclohexanol ou ciclohexanona a ácido adípico por espécies de *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, e *Xanthobacter*, *Pseudomonas* sp. (POLEN et al., 2012).

O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico,  $C_7H_6O_5$ ) é utilizado na indústria de tintas, corantes, de alimentos (antioxidantes e conservante) e farmacêutica (produção de alcalóides alucinogênicos, como a mescalina e trimetopima). Fungos como *R. oryzae* e *Aspergillus foetidus*, produziram ácido gálico a partir de taninos em fermentação em estado sólido (GOLDBERG; ROKEM, 2009).

Considerando a diversidade química dos ácidos orgânicos conforme descrito e a importância destes nos mais variados setores da biotecnologia, assim como, a busca de alternativas para uso economicamente viável da xilose proveniente da sacarificação de materiais lignocelulósicos, propôs-se o presente trabalho de investigação dos metabólitos ácidos gerados pelo crescimento de leveduras assimiladoras de xilose em meio contendo esse açúcar como fonte de carbono.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Gerais**

O presente estudo teve por objetivo avaliar as cepas de leveduras capazes de crescer em xilose com relação ao potencial de produção e secreção de ácidos orgânicos.

#### **3.2. Específicos**

- Avaliar o crescimento das leveduras em meio contendo xilose pela medida de biomassa;
- avaliar a presença de ácidos orgânicos no meio de crescimento;
- avaliar a influencia do pH inicial e concentração inicial de xilose no cultivo e obtenção de ácidos orgânicos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Micro-organismos

As cepas de leveduras utilizadas foram provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (IB/UNESP – Rio Claro) e da coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (IBILCE/UNESP – São José do Rio Preto), as quais foram estudadas em trabalho prévio e selecionadas como assimiladoras de pentoses (MARTINS, 2011). As cepas selecionadas foram *Pichia kluyveri* G1.1; *Hanseniaspora* sp. G4.1; *Hanseniaspora* sp. G7.1; *Candida oleophila* G10.1; *Metschnikwia koreensis* G18.

As células de leveduras foram estocadas aderidas a pérolas de vidro em glicerol a 15%, em freezer a -80 °C. As pérolas de vidro foram lavadas com água destilada, em seguida foram adicionadas de duas a três gotas de ácido nítrico (para remoção da matéria orgânica) e novamente lavadas com água destilada. Num tubo de rosca estéril foram adicionados cerca de 400 µL de solução estéril de glicerol a 15% e em seguida, adicionado de duas a três alças da cultura de levedura. As contas de vidro foram adicionadas a essa mistura e mantidas *overnight*, no freezer a -20 °C e, então transferido ao freezer a -80 °C.

#### 4.2. Padronização do inóculo para cultivo das cepas

Para cada cepa foi feito cultivo por 24 horas, em 25 mL de meio YEPD (2% peptona, 1% extrato de levedura e 2% de glicose), em frascos Erlenmeyer de 125 mL, a 30 °C e agitação de 150 rpm, diversas diluições do cultivo foram realizadas e as absorvâncias determinadas a 600 nm. Paralelamente, as mesmas suspensões foram centrifugadas a 10000  $\times g$ , por 15 min., sendo o sobrenadante descartado, as células suspensas em água destilada e centrifugadas novamente. O precipitado de células foi, então, levado à estufa a 60 °C, em microtubos plásticos de massa conhecida, até peso constante. A partir desses dados, foi construída uma curva de calibração, plotando-se em gráfico, os valores de absorvância representando a densidade celular e de massa seca correspondentes, obtendo-se uma equação de regressão linear. Esta equação foi utilizada para estimar a massa celular a ser utilizada como inóculo.

A determinação do número de células foi feita em microscópio óptico em Câmara de Neubauer. O cálculo para obtenção do número de células por mL foi realizado pela equação:

$$\mathbf{n^{\circ} \text{ de células} = n^{\circ} \text{ médio de células em 5 quadrados} \times 25 \times 10^4 \times F}$$

onde F = fator de diluição

A determinação da viabilidade celular foi periodicamente acompanhada por meio do método de coloração com eritrosina. Amostras de 3  $\mu\text{L}$  foram transferidas para 3  $\mu\text{L}$  da solução padrão eritrosina e homogeneizadas. Após 10 minutos, tempo necessário para que as células absorvam o corante, procede-se à contagem em câmara de Neubauer. As células viáveis apresentaram-se incolores, enquanto as não viáveis, vermelhas.

A solução de eritrosina foi preparada diluindo-se 1 g de eritrosina em 100 mL de água destilada. Em seguida, 1 mL desta solução foi diluída em 50 mL de solução tampão (0,2 mol.L<sup>-1</sup>

de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e mantida a  $7^\circ\text{C}$ . A viabilidade celular foi calculada através da equação:

$$\text{Viabilidade (\%)} = (\text{n}^\circ \text{ de células vivas} / \text{n}^\circ \text{ de células vivas} + \text{n}^\circ \text{ de células não viáveis}) \times 100$$

### **4.3. Cultivo para produção dos ácidos orgânicos**

Para produção de ácidos orgânicos, as leveduras foram pré-cultivadas em 25 mL de meio 0,6% de YNB (Yeast Nitrogen Base) com 2% de xilose, em frascos Erlenmeyer de 50 mL, a  $30^\circ\text{C}$  e agitação de 150 rpm, por 24 horas. Após este período, as alíquotas foram centrifugadas a  $10000 \times g$  por 15 min., o sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi inoculado (em uma concentração celular final de  $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ ) em 35 mL de meio 0,6% de YNB com 2% de xilose e pH 4,5 - 5, em frasco Erlenmeyer de 50 mL. Esses frascos foram incubados a  $30^\circ\text{C}$  e agitados 150 rpm, durante 120 horas. A cada 24 h., uma alíquota foi retirada para análise de ácidos orgânicos.

### **4.4. Efeitos do pH inicial e concentrações de xilose do meio de cultura sobre a produção de ácidos orgânicos pelas leveduras**

Os cultivos foram realizados em 25 mL de meio 0,6% de YNB em concentrações de xilose a 28 e  $35 \text{ mg.mL}^{-1}$  e com pH ajustado a 4,5, 5,5 e 6,5, para cada concentração de xilose. A incubação foi feita conforme descreve o item 4.3.

#### 4.5. Métodos analíticos

A determinação dos teores de açúcares redutores foi feita pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), como proposto por Miller (1959) utilizando-se curvas padrão de xilose.

Para as análises cromatográficas para identificação e quantificação dos ácidos orgânicos, as culturas das leveduras, após diferentes períodos de incubação, foram centrifugadas a  $10000 \times g$  por 5 min a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante filtrado em membrana de  $22\text{ }\mu\text{m}$  e  $20\text{ }\mu\text{L}$  aplicados no cromatógrafo (GARCÍA-FRAILE et al., 2012). Utilizou-se o cromatógrafo Perkin Elmer modelo Flexar, com bomba binária, amostrador automático, forno de coluna e um detector UV/VIS. A coluna utilizada foi a Bio-Rad Aminex HPX-87H ( $300 \times 7,1\text{ mm}$ ) mantida a temperatura de  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A eluição foi isocrática, com fluxo de  $0,8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de ácido sulfúrico ( $0,0065\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e com detector ajustado em  $210\text{ nm}$  de comprimento de onda (ZEPPA et al., 2001).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As leveduras utilizadas nesse estudo foram isoladas e submetidas a testes de assimilação de xilose, crescimento e produção de etanol em trabalho prévio, cujos resultados embasaram o presente trabalho (MARTINS, 2011). Esses dados mostraram que, embora algumas das leveduras consumiram toda a xilose do meio, apresentaram baixo crescimento celular e não produziram etanol, logo, se cogitou que essas cepas poderiam estar direcionando o açúcar assimilado para produção de algum tipo de metabólito acumulado nas células ou secretados ao meio

Assim, nesse presente estudo, a investigação desses metabólitos foi feita por meio de cultivos em meios líquidos e análises cromatográficas, além de acompanhamento de parâmetros indiretos como consumo da xilose, crescimento populacional e variações do pH dos meios de cultura, cujos resultados são apresentados a seguir.

### 5.1. Consumo de xilose, crescimento celular e variação no pH do meio de cultura

As leveduras foram incubadas em meio YNB acrescido de xilose como única fonte de carbono. As taxa de assimilação da xilose pelas leveduras testadas são apresentadas na Figura 2. As cepas *Hanseniaspora* sp. G4.1, *Hanseniaspora* sp. G7.1 e *C. oleophila* G10.1 consumiram 100% da xilose em 120 horas. *M. koreensis* G18 consumiu 70% em 96 h, sendo que esse resultado não se alterou até 120 h. A cepa *P. kluyveri* G1.1 foi a que apresentou menor taxa de consumo de xilose, cerca de 50% , em 120 horas.

Embora as cepas *Hanseniaspora* sp. G7.1, *Hanseniaspora* sp. G4.1 e *C. oleophila* G10.1 tenham consumido quantidades equivalentes de xilose, as produções de biomassa por essas cepas foram diferentes com 6,5, 5,5 e 4,5 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. As cepas *Hanseniaspora* sp. G7.1

e *Hanseniaspora* sp. G4.1 assimilaram aproximadamente o dobro de açúcar que as outras e cresceram mais durante todo cultivo (Figura 2,).

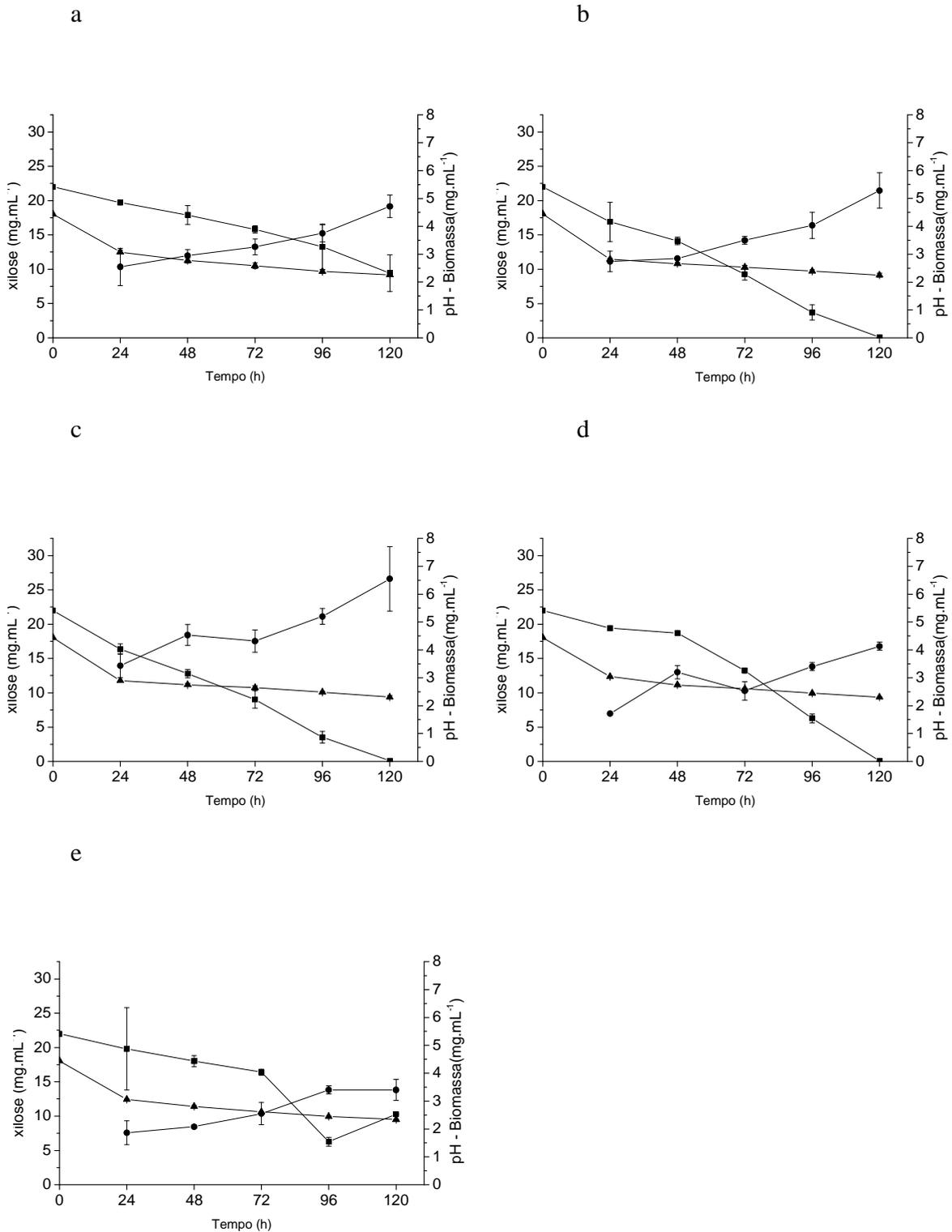
Em todos os cultivos houve redução do pH do meio de 4,5 para 2,5 (Figura 2) sugerindo a secreção de substâncias ácidas. Segundo Bell e colaboradores (1991), García-Fraile e colaboradores (2012) e Abad e Turon (2012) a redução do pH do meio de cultivo de leveduras foi consistente com a secreção de ácidos orgânicos.

Para todas as leveduras a redução do pH ocorreu logo nas primeiras 24 horas, com leve acidificação entre 24 e 120 horas. Para a comprovação de que essa redução no pH foi decorrente da atividade microbiana, foi utilizado um controle abiótico, ou seja, meio de cultura sem inóculo incubado nas mesmas condições que aqueles com micro-organismos, no qual não se detectou variação no pH.

Comparando se as curvas de crescimento celular e pH do meio, observa-se que, embora tenha havido diferenças entre o crescimento das cepas, os níveis de redução do pH foram os mesmos. Do mesmo modo, a comparação entre o consumo de xilose e pH durante as primeiras 24 horas, mostra que não houve relação entre as quantidades de xilose consumida e redução do pH.

Por outro lado, os picos de acidificação dos meios ocorreram após 24 horas de cultivo, coincidindo com a maior taxa de crescimento microbiano, sugere a secreção de substâncias ácidas na fase de aceleração do crescimento das leveduras.

**Figura 2.** Cultivo das cepas (a) *P. kluyveri* G1.1, (b) *Hanseniaspora* sp. G4.1, (c) *Hanseniaspora* sp. G7.1, (d) *C. oleophila* G10.1 e (e) *M. koreensis* G18 em meio com 2 % de xilose por 120 h. Concentração de xilose (-■-), biomassa (-●-) e pH (-▲-) do meio



## **5.2. Análises qualitativas e quantitativas dos ácidos orgânicos presentes nos meios de cultivo das leveduras**

Para avaliar os perfis de metabólitos ácidos gerados e secretados pelas leveduras, os meios de cultivo, após períodos de incubação entre 24 e 120 h, foram amostrados e utilizados para as análises cromatográficas dos ácidos orgânicos. Partindo-se da hipótese de que esses metabólitos seriam ácidos orgânicos, utilizou-se técnicas direcionadas a detecção dessas substâncias. Foram utilizados padrões analíticos como ácidos oxálico, cítrico, maleico, tartárico, málico, pirúvico, láctico, fumárico, fórmico, acético, adípico, propiônico, isobutírico e butírico. O controle abiótico também foi analisado.

Por ser o meio de cultivo fermentado uma matriz complexa, muitas bandas cromatográficas, com tempos de retenção diferentes aos dos ácidos foram obtidas sendo classificadas alfabeticamente em função do seu tempo de retenção. Aquelas respectivas aos ácidos orgânicos foram identificadas (Tabela 1). O *screening* realizado nos cultivos permitiu classificar e identificar alguns ácidos orgânicos produzidos a partir da assimilação da xilose (Tabela 2).

**Tabela 1.** Bandas cromatográficas obtidas nas análises cromatográficas dos meios de cultivo das leveduras e do controle abiótico. As bandas foram identificadas e diferenciadas pelos respectivos tempos de retenção na coluna.

Bandas cromatográficas	Leveduras					Controle abiótico
	<i>P. kluyveri</i> G1.1	<i>Hanceniaspora</i> sp. G4.1	<i>Hanceniaspora</i> sp. G7.1	<i>C. oleophila</i> G10.1	<i>M. koreensis</i> G18	
A(4,14)	X					X
B(4,33)	X	X	X	X	X	X
C(4,53)	X	X	X	X	X	
Oxálico(4,70)		X	X			X
D(5,16)	X	X	X	X	X	
E(5,31)					X	
Cítrico(5,62)	X	X	X	X	X	
Maleico(5,85)	X	X		X		
Tartárico(6,02)	X		X	X	X	
Málico(6,73)			X	X		
Pirúvico(6,83)					X	X
F(7,18)	X	X	X	X	X	X
G(7,67)	X	X		X		X
H(7,82)				X		
I(8,24)	X	X	X	X	X	
J(8,42)						X
Lático(8,89)	X	X	X	X	X	
K(9,22)	X		X	X		
Fumárico(9,53)	X				X	X
L(9,93)	X		X	X	X	
Acético(10,55)	X	X	X	X		

(X): presença de bandas crom.

**Tabela 1.** Continuação

<b>M(11,4)</b>	X						
<b>N(11,9)</b>	X						
<b>Propiônico(12,40)</b>	X		X		X		X
<b>O(13,12)</b>					X		
<b>Isobutírico(13,92)</b>	X		X				
<b>P(14,83)</b>			X		X		X
<b>Butírico(14,96)</b>							
<b>Q(15,82)</b>			X		X		X
<b>R(17,72)</b>							X
<b>S(18,93)</b>							X
<b>T(19,8)</b>			X		X		X
<b>Σ Compostos desconhecidos</b>	11		9		8		13
<b>Σ Ác. orgânicos</b>	8		6		7		7

(X): presença de bandas crom.

**Tabela 2.** Bandas cromatográficas, referentes aos ácidos orgânicos, obtidas pelas análises dos meios de cultivo das leveduras.

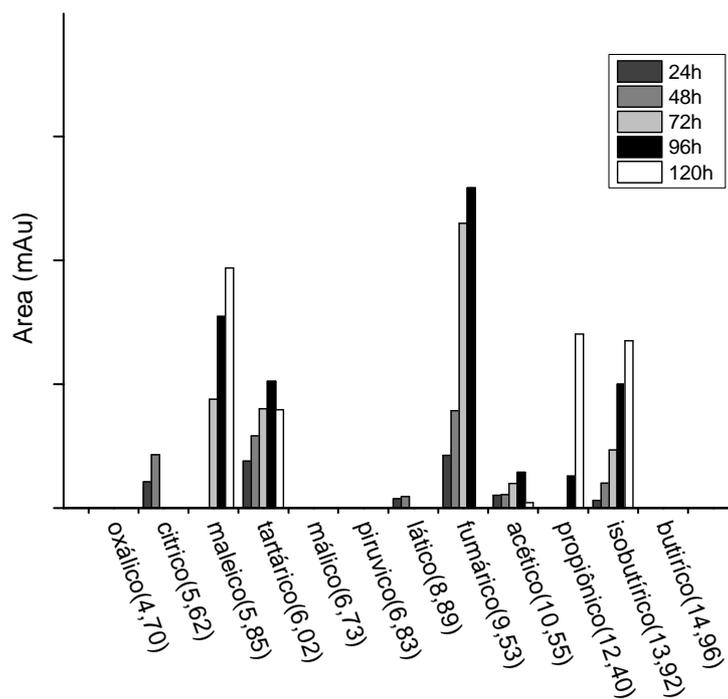
Bandas Crom.	Leveduras				
	<i>P. kluyveri</i> G1.1	<i>Hanseniaspora</i> sp. G4.1	<i>Hanseniaspora</i> sp. G7.1	<i>C. oleophila</i> G10.1	<i>M. koreensis</i> G18
Oxálico(4,70)		X	X		
Cítrico(5,62)	X	X	X	X	X
Maleico(5,85)	X	X		X	
Tartárico(6,02)	X		X	X	X
Málico(6,73)			X	X	
Pirúvico(6,83)					X
Lático(8,89)	X	X	X	X	X
Fumárico(9,53)	X				X
Acético(10,55)	X	X	X	X	
Propiônico(12,40)	X		X	X	X
Isobutírico(13,92)	X	X			
Butírico(14,96)					
<b>total de bandas de ác. orgânicos</b>	8	6	7	7	6

(X): presença de bandas crom.

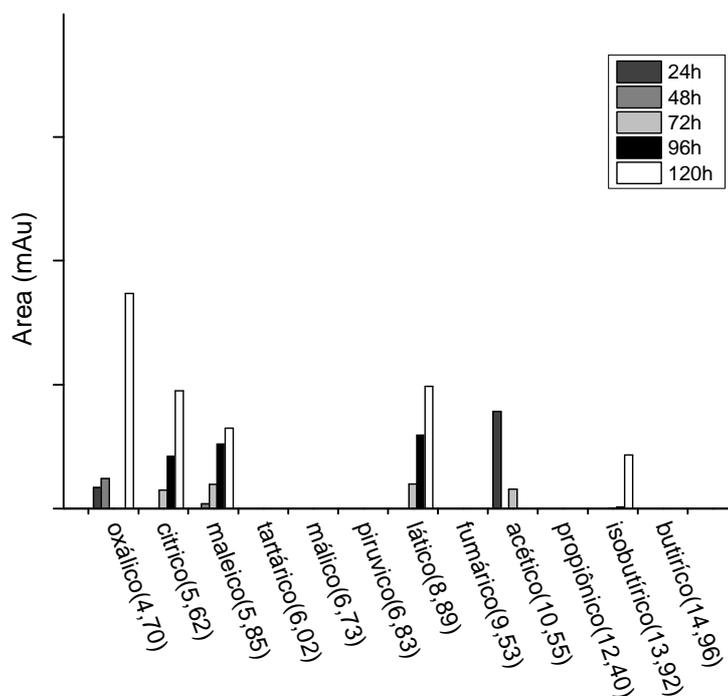
Foi possível constatar que todas as leveduras produziram algum tipo de ácido orgânico em meio com de xilose como única fonte de carbono. A levedura *P. kluyveri* G1.1 a foi que apresentou maior variedade de ácidos, com oito bandas detectadas. Dos meios de cultivo de *Hanseniaspora* sp. G7.1 e *C. oleophila* G10.1 obteve-se 7 bandas e no de *M. koreensis* G18 e *Hanseniaspora* sp. G4.1, 6 bandas foram detectadas.

Correlacionando a intensidade dos sinais dos ácidos orgânicos (Figuras 3 - 7) obtidos nos cultivos com o crescimento celular (Figura 2), observou-se que quanto menor o crescimento populacional das leveduras maiores são as concentrações dos metabólitos.

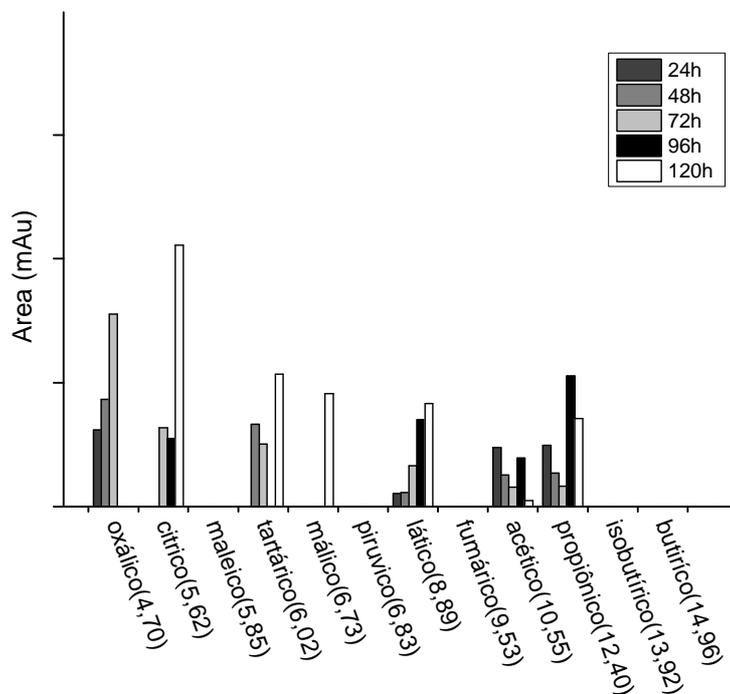
**Figura 3.** Intensidade das bandas cromatográficas respectivas aos ácidos orgânicos produzidas pela cepa *P. kluyveri* G1.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo.



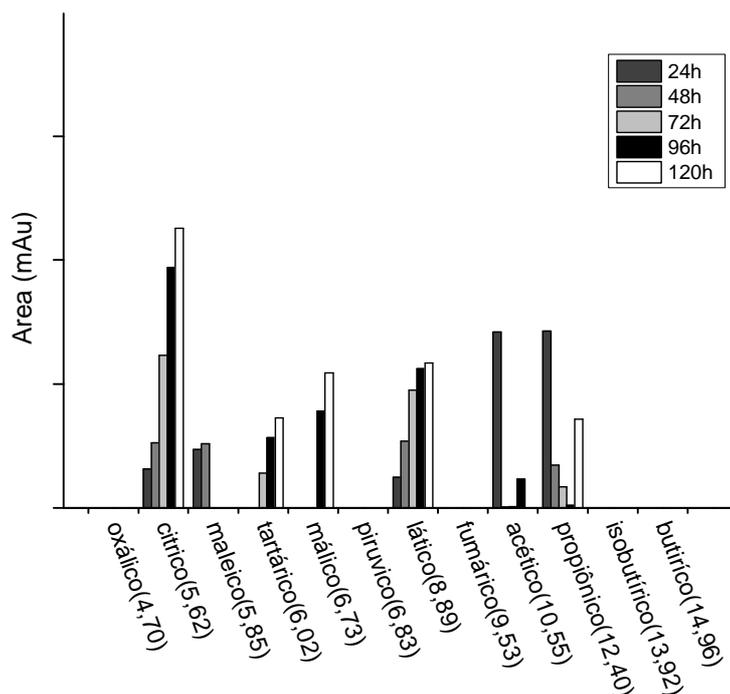
**Figura 4.** Intensidade das bandas cromatográficas respectivas aos ácidos orgânicos produzidas pela cepa *Hanseniaspora* sp. G4.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo.



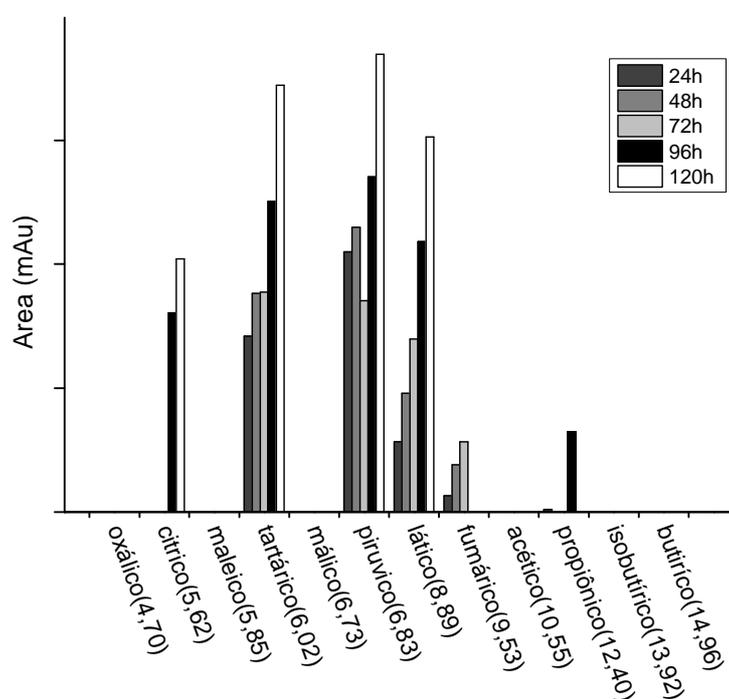
**Figura 5.** Intensidade das bandas cromatográficas respectivas aos ácidos orgânicos produzidas pela cepa *Hanseniaspora* sp. G7.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo.



**Figura 6.** Intensidade das bandas cromatográficas respectivas aos ácidos orgânicos produzidas pela cepa *C. oleophila* G10.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo.



**Figura 7.** Intensidade das bandas cromatográficas respectivas aos ácidos orgânicos produzidas pela cepa *M. koreensis* G18 ao longo de 120 horas (h) de cultivo.



As Figuras de 3 - 7 mostram que todas as cepas produziram ácido cítrico, porém, em momentos diferentes do cultivo. *P. kluyveri* G1.1 produziu ácido cítrico até 42 horas, *C. oleophila* G10.1 produziu este ácido durante todo cultivo, *Hanseniaspora* sp G4.1 e G7.1 após 72 horas (Figuras 4 e 5) e a cepa *M. koreensis* G18, a partir de 96 horas (Figura 7) e na Tabela 3 estão informadas as concentrações de ácido cítrico obtidas pelas cepas testadas.

**Tabela 3.** Concentração de ácido cítrico obtido nos cultivos das cepas *P. kluyveri* G1.1, *Hanseniaspora* sp G4.1, *Hanseniaspora* sp G7.1, *C. oleophila* G10.1 e *M. koreensis* G18

Leveduras	Ác. Cítrico (mg.L <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)
<i>P. kluyveri</i> G1.1	13,0	0,06
<i>Hanseniaspora</i> sp G4.1	25,5	0,13
<i>Hanseniaspora</i> sp G7.1	54,0	0,27
<i>C. oleophila</i> G10.1	57,5	0,29
<i>M. koreensis</i> G18	52,0	0,26

Das cinco cepas positivas para produção de ácido cítrico, três (*C. oleophila* G10.1, *M. koreensis* G18 e *Hanseniaspora* sp G7.1) produziram mais de 50 mg L<sup>-1</sup> do ácido. O gênero *Candida* tem sido reportado como produtor de ácido cítrico, inclusive a partir fontes de carboidratos diferentes de glicose como *n*-parafina (MADDOX et al., 1985; GREWAL; KALRA, 1995; CROLLA; KENNEDY, 2001; ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013; LIU et al., 2015.). Vários desses trabalhos reportam concentrações em níveis de grama por litro, bem acima do obtido nesse trabalho.

Outro ácido orgânico encontrado nos cultivos de todas as cepas foi o láctico, este foi produzido desde as primeiras 24 horas de cultivo até 120 horas por *C. oleophila* G10.1, *Hanseniaspora* sp G7.1 e *M. koreensis* G18. A cepa *P. kluyveri* G1.1, produziu ácido láctico por até 48 h. de fermentação e *Hanseniaspora* sp G4.1, entre 72 e 120 horas (Figuras 3 - 7).

No meio de cultivo da cepa *M. koreensis* G18 a intensidade referente a banda de ácido láctico aumentou com o tempo de fermentação atingindo o máximo em 120 horas, classificando essa cepa como a maior produtora de ácido láctico (Figura 7). A Tabela 4 mostra as concentrações de ácido láctico obtidas pelas cepas testadas.

**Tabela 4.** Concentração de ácido láctico obtido nos cultivos das cepas *P. kluyveri* G1.1, *Hanseniaspora* sp G4.1, *Hanseniaspora* sp G7.1, *C. oleophila* G10.1 e *M. koreensis* G18

Leveduras	Ác. Láctico (mg.L <sup>-1</sup> )	Rendimento (%)
<i>P. kluyveri</i> G1.1	12,0	0,06
<i>Hanseniaspora</i> sp G4.1	43,0	0,21
<i>Hanseniaspora</i> sp G7.1	37,5	0,18
<i>C. oleophila</i> G10.1	49,5	0,24
<i>M. koreensis</i> G18	114,0	0,57

A produção desse ácido por leveduras é reportado na literatura principalmente pela utilização de leveduras modificadas geneticamente (WANG et al., 2015). Ilmén e colaboradores (2007) obtiveram cepa de *Pichia stipitis* com habilidade de produzir ácido láctico a partir de xilose por meio de expressão heteróloga de uma L-lactato desidrogenase de *Lactobacillus helveticus*. Osawa e colaboradores (2009) produziu eficientemente ácido láctico utilizando *Candida boidinii* alterada por desregulação do gene PDC1 que codifica a piruvato descarboxilase.

Nas análises cromatográficas do controle abiótico obteve-se uma banda que pode ser referente ao ácido pirúvico que provavelmente seja um contaminante do meio de cultura. Essa banda, porém esteve presente e em maiores intensidades, em todas as amostras de meio de cultivo de *M. koreensis* G18, ao longo de 120h. O ácido pirúvico é um importante composto no metabolismo de açúcar e sua oxidação é a primeira etapa de um caminho metabólico que leva ao ciclo do ácido cítrico no qual vários ácidos orgânicos são gerados (Figura 7).

O ácido acético, que não foi encontrado apenas no meio de cultivo de *M. koreensis* G18, apareceu nas primeiras 24 horas nos meios de cultivo das cepas *P. kluyveri* G1.1, *Hanseniaspora* sp. G4.1, *Hanseniaspora* sp. G7.1 e *C. oleophila* G10.1, com decaimento da intensidade da banda nas amostras subsequentes (Figuras 3 - 7). Isso pode ter ocorrido devido a esse ácido orgânico ser volátil e as condições de cultivo (temperatura, agitação e retirada de alíquotas) ter favorecido sua volatilização.

Na via da pentose fosfato a xilulose-5-fosfato deve ser convertida a gliceraldeído-3-fosfato que por sua vez é convertido a piruvato que é descarboxilado a acetil para entrada no ciclo do ácido tricarbóxico ou convertido a etanol. Uma vez que essas leveduras não produziram álcool a partir de xilose e mostraram baixo crescimento celular, pode-se propor que parte desse piruvato esteja sendo convertido a ácido acético e secretado ao meio.

O ácido málico foi produzido pelas cepas *Hanseniaspora* sp. G7.1 e *C. oleophila* G10.1, no final do cultivo, entre 96 e 120 horas (Figuras 5 e 6). O ácido málico esta presente no ciclo do ácido tricarboxílico, que ocorre na matriz mitocondrial, mas, segundo PINES et al. (1996) e VRSALOVI et al. (2007) seu acumulo em células de leveduras não se dá por essa via e sim por uma rota citosólica na qual o piruvato passa por um processo redutivo, que é favorecido pela menor concentração de O<sub>2</sub> e maior concentração de CO<sub>2</sub> dissolvidos (SCHWARTZ; RADLER, 1988) ), García-Fraile e colaboradores (2012) também relataram produção de ácido málico por uma cepa de *C. oleophila* utilizando como fonte de carbono glicerol.

*P. kluyveri* G1.1 , *Hanseniaspora* sp. G4.1 e *C. oleophila* G10.1 produziram ácido maleico, sendo a maior intensidade obtida no meio de cultivo da primeira (Figuras 3, 4 e 6).

Pode-se observar na Tabela 5 que, com exceção a *Hanseniaspora* sp. G4.1, todas leveduras produziram o ácido tartárico, sendo as maiores concentrações obtidas no meio de cultivo de *M. koreensis* G18.

**Tabela 5.** Concentração de ácido tartárico obtido nos cultivos das cepas *P. kluyveri* G1.1, *Hanseniaspora* sp G4.1, *Hanseniaspora* sp G7.1, *C. oleophila* G10.1 e *M. koreensis* G18

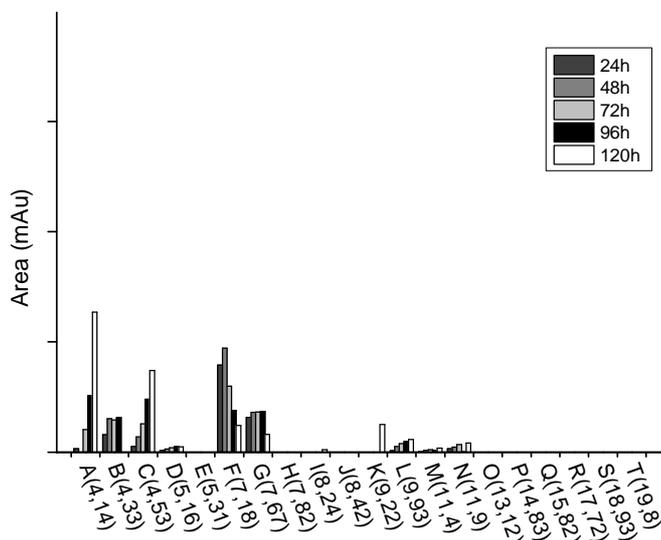
<b>Leveduras</b>	<b>Ác. Tartárico (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<i>P. kluyveri</i> G1.1	18,0	0,09
<i>Hanseniaspora</i> sp G4.1	-	-
<i>Hanseniaspora</i> sp G7.1	19,0	0,1
<i>C. oleophila</i> G10.1	13,5	0,07
<i>M. koreensis</i> G18	58,0	0,29

Somente as cepas *Hanseniaspora* sp. G4.1, *Hanseniaspora* sp. G7.1 produziram ácido oxálico com cerca de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (Figuras 4 e 5).

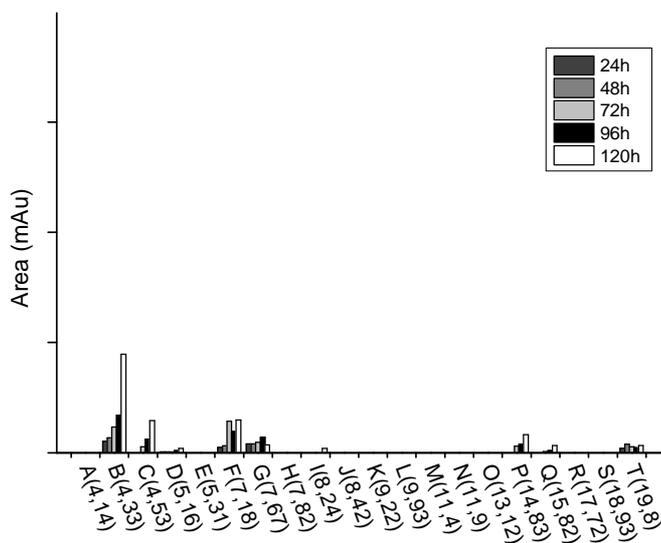
Outros ácidos orgânicos foram produzidos pela maioria das leveduras e identificados como fumárico, isobutírico e propiônico. O ácido fumárico apareceu no meio de cultivo de *P. kluyveri* G1.1 *M. koreensis* G18 (Figuras 3 e 7), o ácido isobutírico foi produzido pelas cepas *P. kluyveri* G1.1 e *Hanseniaspora* sp. G4.1, durante as 120 horas de cultivo e iniciado em 96 horas, respectivamente (Figuras 3 e 4). O ácido propiônico só não foi produzido pela cepa *Hanseniaspora* sp. G4.1 (Figura 3).

Embora tenha observado outras bandas nas análises dos meios de cultivo das leveduras, elas não foram identificadas como ácidos orgânicos, pois não apresentaram tempo de retenção próximo aos dos padrões disponíveis nesse experimento. Essas banda totalizaram 20 e 7 destas estavam nos meios de cultivo das cepas (controle abiótico) (Tabela 1). Destaca-se a banda B(4,33), presente no controle e nos cultivos, cuja intensidade foi a maior obtida (Figuras 8 - 12). O sinal mais intenso dessa banda foi encontrado no meio de cultivo *M. koreensis* G18 e o menor no meio de cultivo de *P. kluyveri* G1.1.

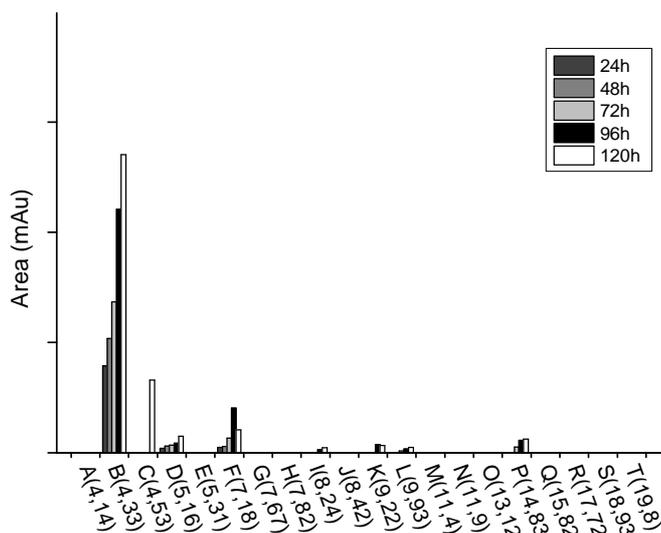
**Figura 8.** Intensidade das bandas cromatográficas desconhecidas produzidas pela cepa *P. kluyveri* G1.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo.



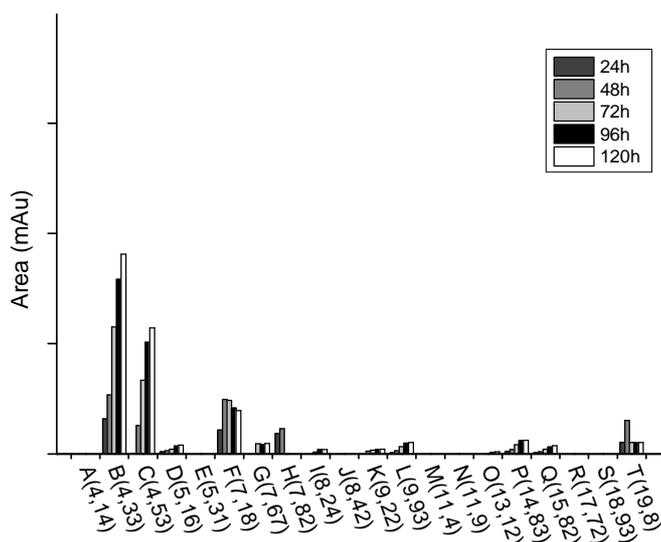
**Figura 9.** Intensidade das bandas cromatográficas desconhecidas produzidas pela cepa *Hanseniaspora* sp. G4.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo.



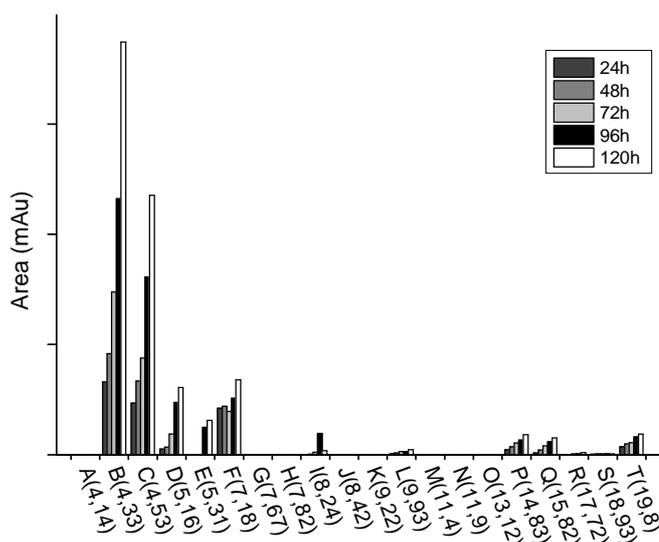
**Figura 10.** Intensidade das bandas cromatográficas desconhecidas produzidas pela cepa *Hanseniaspora* sp. G7.1 ao longo de 120 horas (h) de cultivo.



**Figura 11.** Intensidade das bandas cromatográficas desconhecidas produzidas pela cepa *C. oleophila* G10.1 durante ao longo de 120 horas (h) de cultivo.



**Figura 12.** Intensidade das bandas cromatográficas desconhecidas produzidas pela cepa *M. koreensis* G18 ao longo de 120 horas (h) de cultivo.



Algumas bandas foram específicas para meios de algumas cepas, como as A(4,14) e M(11,4) e N(11,9) relativos a *P. kluyveri* G1.1, E(5,31), R(17,72) e S(18,03) a *M. koreensis* G18 e H(7,82) e O(13,12) a *C. oleophila* G10.1.

Comparando-se a intensidade das bandas obtidas pela análise do meio de cultivo da *M. koreensis* G18 (Figura 12) com aquelas obtidas no meio de cultivo das demais cepas nota-se que a cepa esta apresentou os sinais mais intensos para a grande maioria das bandas, indicando como interessante o estudo mais aprofundado dessa levedura. Têm sido reportados dados sobre a levedura *M. koreensis* que mostram seu potencial biotecnológico, como na aplicação de biotransformação de cetonas ao seu álcool correspondente, mas nenhum estudo sobre assimilação de pentoses e identificação de metabolitos (HONG et al., 2001; SASAHARA; IZUMORI, 2005; SINGH et al., 2011; SINGH et al., 2012; MEENA et al., 2014).

### **5.3. Efeitos da variação do pH e concentração de xilose iniciais dos meios de cultivo sobre o consumo de xilose, crescimento celular, variações dos pH dos meios de culturas e produção de metabolitos pela cepa *M. koreensis* G18.**

Nessa parte do trabalho, foi escolhida a cepa *M. koreensis* para os ensaios, em função de seu perfil de produção dos ácidos orgânicos e nível de crescimento em meios com xilose. Esta é uma espécie de ascomiceto isolada da plantas *Ipomoea* sp. e *Lillium* sp. e também encontrada em ambientes aquáticos frequentemente como parasitas de invertebrados. Na caracterização dessa espécie, a utilização de diferentes fontes de carbono foi examinada constatando-se sua capacidade de assimilação de D-xilose (HONG et al., 2001).

A levedura foi cultivada em meios com pH iniciais de 4,5, 5,5 e 6,5, em concentrações de xilose de 28 e 35 mg.mL<sup>-1</sup>. Um consumo muito similar de xilose foi observado entre 24 até 120 horas em 28 e 35 mg.mL<sup>-1</sup> de xilose e nos três pHs iniciais diferentes (Figura 13a). Esses dados indicam que as condições testadas de concentrações de xilose e valores de pH iniciais do meios não influenciaram a assimilação do açúcar embora deva ser considerado que em termos de quantidades totais de açúcar, a levedura assimilou mais quando a concentração foi maior.

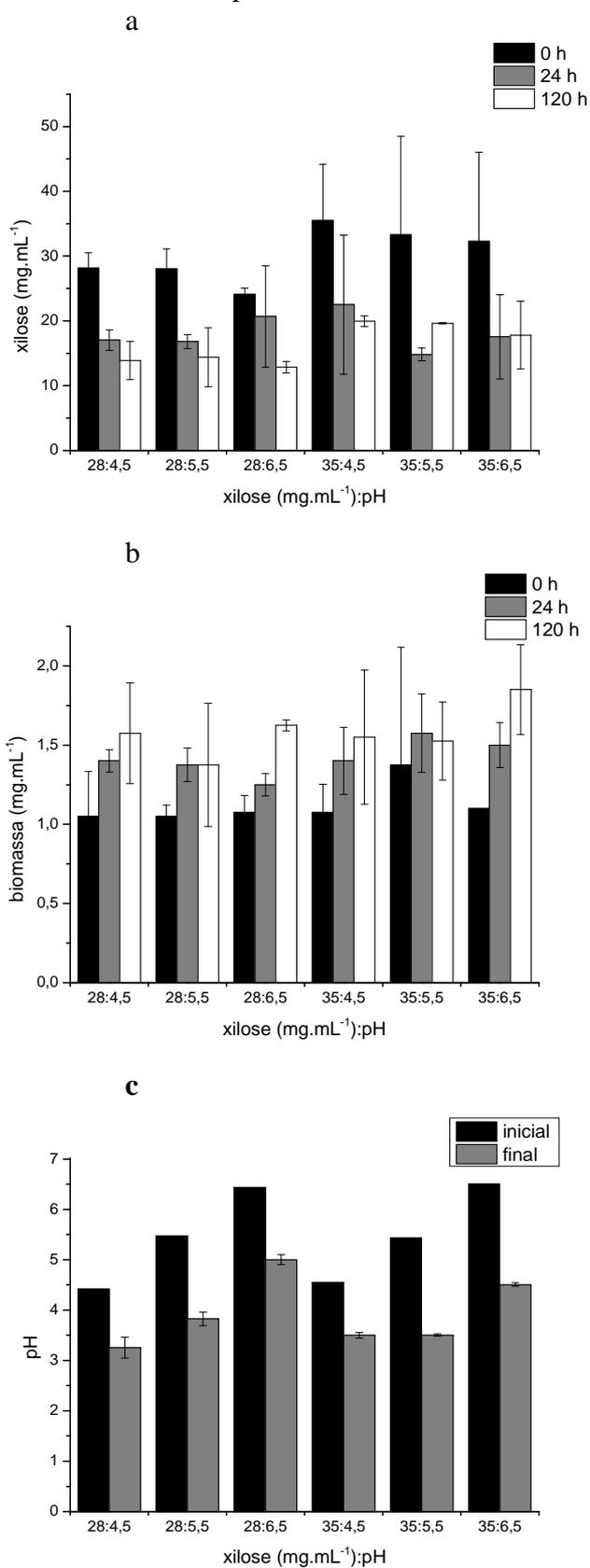
Embora tenha sido consumido mais açúcar em concentrações de 35 mg.mL<sup>-1</sup> o crescimento microbiano foi muito similar em ambas as concentrações de açúcar (Figura 13b). Do mesmo modo, o pH do meio não exerceu influencia sobre a produção de biomassa (Figura 13b). Note-se, no entanto, que o crescimento populacional foi muito baixo, considerando o inóculo inicial (1 mg.mL<sup>-1</sup>).

As maiores reduções de pH do meio aconteceram quando a concentração de xilose foi 35 mg.mL<sup>-1</sup> em pH 5,5 e 6,5 com redução aproximada de duas unidades de pH. Nos cultivos até 28 mg.mL<sup>-1</sup> de xilose, as diminuições nos valores de pH também foram

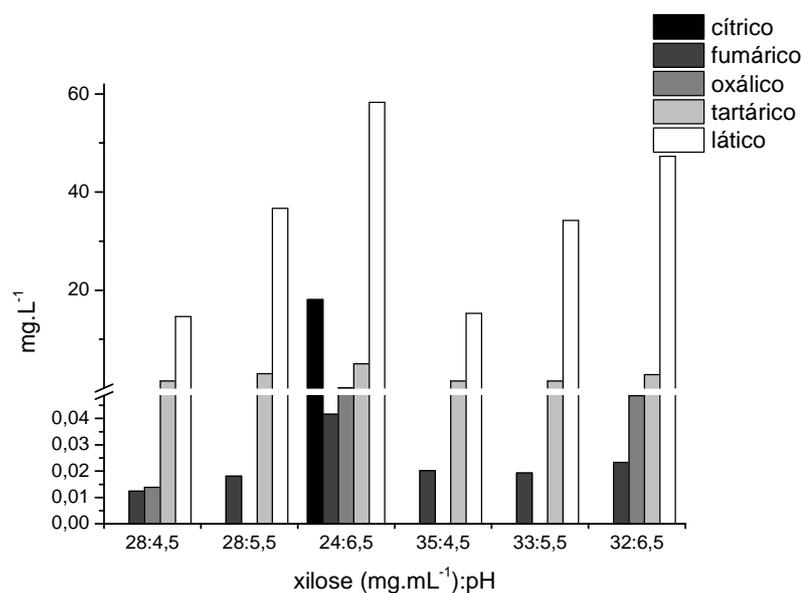
maiores nos pH iniciais de 5,5 e 6,5. Esses dados confirmam que parte da xilose assimilada foi convertida em substâncias ácidas. Também pode-se inferir que a liberação dessas substâncias está limitada a um valor de pH de meio de 3,5 (Figura 13c).

Entretanto, os dados da figura 14, que mostram as concentrações dos principais ácidos orgânicos quantificados e identificados, revelam que esses compostos, embora apresentem correlação positiva com diminuição do valor de pH do meio, não devem ser os únicos a interferirem na acidificação do meio. Provavelmente, aqueles não identificados estejam contribuindo fortemente para esse resultado.

**Figura 13.** Concentração de xilose em 0, 24 e 120 horas (h) de cultivo em pH 4,5, 5,5 e 6,5 em diferentes concentrações de xilose no cultivo da cepa *M. koreensis* G18. a= consumo de xilose; b=biomassa, c= pH final.



**Figura 14.** Concentração de ácidos orgânicos no meio de cultivo de *M. koreensis* G18, em 120 h de cultivo, pH 4,5, 5,5 e 6,5 e em diferentes concentrações de xilose.



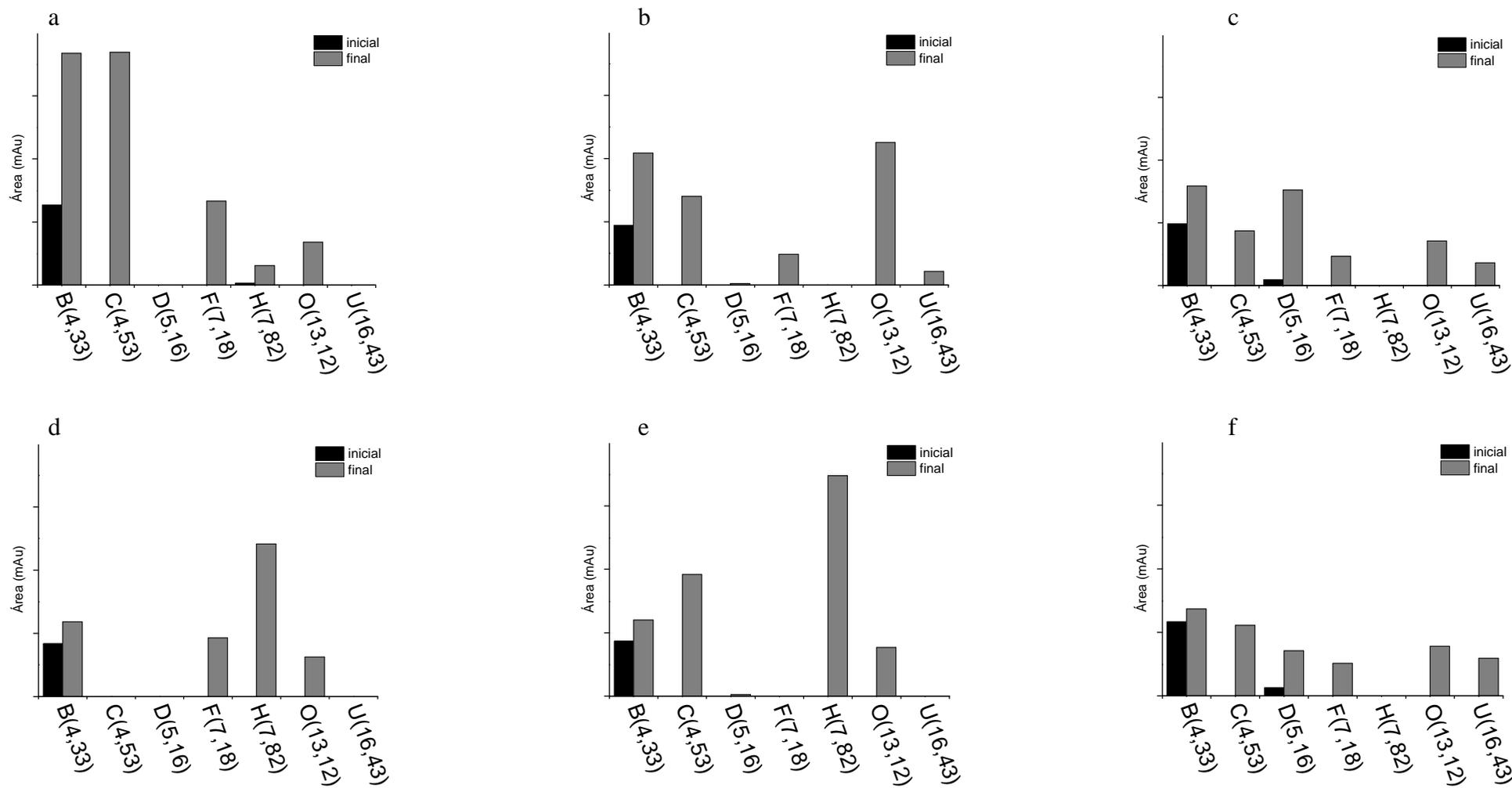
Os dados obtidos nos ensaios nos permitem inferir que meios de cultivo com pH inicial próximo a neutralidade (5,5-6,5) induziram a maior liberação de ácidos orgânicos.

Nos testes em diferentes concentrações iniciais de xilose e pH inicial foi possível quantificar 5 ácidos orgânicos, cítrico, fumárico, oxálico, tartárico e láctico (Figura 14). As concentrações variaram em função do pH mas mantiveram o mesmo perfil em função da concentração de açúcar, exceto o ácido cítrico que apareceu apenas em uma das amostras (28 mg mL<sup>-1</sup>, pH 6,5)

Nesses experimentos o pH não foi um parâmetro indicador preciso para a produção dos ácidos orgânicos visto que nas condições de cultivo que levaram a maior produção de ácidos orgânicos não foram obtidos as maiores reduções de pH.

A Figura 15 apresenta as intensidades das bandas cromatográficas não identificadas nas análises dos meios de cultivos com diferentes pHs e concentrações de xilose iniciais. Assim como os ácidos orgânicos identificados, os perfis de produção dos compostos desconhecidos também foram diferentes entre os cultivos. Os cultivos iniciados com 28 mg.mL<sup>-1</sup> de xilose foram aqueles que apresentaram a maioria das bandas de maiores intensidade. Nos cultivos iniciados com pHs 4,5 e 5,5 foram detectadas as bandas mais intensas. A banda B(4,33) esteve presente em inicialmente todos os cultivos, mas até o final do cultivo sua intensidade aumentou, principalmente nos cultivos iniciados com concentração de xilose em 28 mg.mL<sup>-1</sup> e em pH 4,5. Nessa mesma condição de cultivo obteve-se a banda C(4,53) também com maior intensidade. A banda D(5,16) foi mais evidente nos cultivo iniciado com pH 6,5 e com 28 mg.mL<sup>-1</sup> de xilose. A banda U(16,43) foi obtida de maneira semelhante a D(5,16), mas com intensidade maior em cultivo a 35 mg.mL<sup>-1</sup> de xilose. A banda H(7,82) apresentou foi obtida com maiores intensidades iniciando cultivo com concentração de xilose a 35 mg.mL<sup>-1</sup> e pH 5,5. A Banda O(13,12) foi obtida em maior intensidade iniciando cultivo com concentração de xilose 28 mg.mL<sup>-1</sup> e pH 5,5. E a banda F(7,18) teve maior intensidade no cultivo em pH 4,5 e com 28 mg.mL<sup>-1</sup> de xilose.

**Figura 15.** Intensidade das bandas cromatográficas desconhecidas produzidas pela cepa *M. koreensis* G18 no início e final do cultivo em diferentes pHs e concentrações iniciais de xilose. a= 28 mg.mL<sup>-1</sup> pH 4,5; b= 28 mg.mL<sup>-1</sup> pH 5,5; c= 28 mg.mL<sup>-1</sup> pH6,5; d= 35 mg.mL<sup>-1</sup> pH 4,5; 35 mg.mL<sup>-1</sup>; e= 35 mg.mL<sup>-1</sup> pH 5,5; f= 35 mg.mL<sup>-1</sup> pH 6,5.



A produção de ácidos orgânicos identificados é aumentada nos cultivos com pHs iniciais próximo a neutro, a maioria das bandas desconhecidas tinham maiores intensidade nos cultivos que iniciaram em pH ácidos, portanto pode-se sugerir que essas bandas possam ser correspondentes a compostos diferentes de ácidos orgânicos, como por exemplo, as bandas B(4,33), C(4,53) e F(7,18) ou correspondem a ácidos não identificados.

Relacionando a obtenção dos compostos desconhecidos ao crescimento celular (Figura 15), conclui-se que esses fatores foram inversamente proporcionais, pois quanto maior o crescimento menor é a obtenção desses compostos, e a banda H(7,82) é um exemplo dessa hipótese.

Esse estudo, embora ainda em fase exploratória, revelou que as cepas assimiladoras de xilose secretaram diferentes metabólitos. Embora vários deles tenham correspondido a ácidos orgânicos, outros não identificados também estiveram presentes indicando uma vasta quantidade de produtos secretados. O conhecimento desses produtos pode levar a importantes informações acerca das vias de metabolismo de xilose por essas cepas e revelar complexos gênicos com potencial de serem explorados biotecnologicamente.

## 6. CONCLUSÕES

-As leveduras testadas foram capazes de crescer em meio de cultura assimilando xilose como única fonte de carbono e secretando diversos metabólitos, entre eles, vários ácidos orgânicos.

- Entre os metabólitos identificados as cepas produziram ácido oxálico, cítrico, maleico, tartárico, málico, láctico, fumárico, acético, propiônico e isobutírico.

-O crescimento das cepas e a produção/secreção dos metabólitos foram afetados pelo pH e concentração iniciais de xilose do meio de cultivo. Os ácidos orgânicos foram produzidos em maiores concentrações em meio de cultura com pH inicial próximo ao neutro e em menores concentrações de xilose.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, p. 33-741, 2012.
- ANGUMEENAL, A. R.; D. VENKAPPAYYA. An overview of citric acid production. *LWT - Food Science and Technology*, v. 50, n. 2, p. 367-370, 2013.
- BELL, D. J.; BLAKE, J. D.; PRAZAK, M.; WILSON, P. N. Studies on Yeast Differentiation Using Organic-Acid Metabolites .3. Studies on the Metabolites Produced by Yeasts Grown on a Selection of Single Carbon Substrates. *Journal of the Institute of Brewing* v. 97, n. 4, p. 317-322, 1991.
- BRUINENBERG, P. M.; DEBOT P. H. M.; VANDIJKEN J. P.; SCHEFFERS, W. A. NADH linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 19 p.256–260, 1984.
- CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous Bioconversion of Cellulose and Hemicellulose to Ethanol. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 18, n. 4, p. 295–331, 1998.
- Liu, X., J. Lv, et al. (). "Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b Yeast When Grown on Waste Cooking Oil." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **175**(5): 2347-2356. 2015
- CROLLA, A.; K. J. KENNEDY. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. *Journal of Biotechnology*, v. 89, n. 1, p. 27-40, 2001.
- DOES, A. L.; BISSON, L. F. Characterization of xylose uptake in the yeast *Pichia heeidi* and *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, n. 1, p. 159–164, 1989.
- FROMANGER, R.; GUILLOUET, S. E.; URIBELARREA, J. L.; MOLINA-JOUVE, C.; CAMELEYRE, X. Effect of Controlled Oxygen Limitation on *Candida lnehatae* Physiology for Ethanol Production from Xylose and Glucose. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 37, p. 437–445, 2010.
- FUGITA, T. P. L. Desempenho de Leveduras que Metabolizam Xilose para Produção de Etanol em Hidrolisado Heimicelulósico de Bagaço de Cana. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.
- GARCIA- FRALIE, P.; SILVA, L. R.; SANCHEZ-MARQUES, S.; VELAZQUEZ, E.; RIVAS, R. Plums (*Prunus domestica* L.) are a good source of yeasts producing organic acids of industrial interest from glycerol. *Food Chemistry*, v. 134, p.31–34, 2013.

- GOLDBERG, I; ROKEM, J.S.; PINES, O. Organic acids: Old metabolites, new themes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.81, p.1601 –1611, 2006.
- GOLDBERG, I.; ROKEM, J. S. Organic and Fatty Acid Production, Microbial. *Applied Microbiology*, p. 421-442, 2009.
- GONG, C. S.; CLAYPOOL, T. A.; MCCRACKEN, L. D.; MAUN, C. M.; UENG, P. P.; TSAO, G. T. Conversion of Pentoses by Yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, p. 85-102, 1983.
- GONG, C. S.; CHEN, L. F.; FLINCKINGER, M. C.; CHIANG, L. C.; TSAO, G. T. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 41, n. 2, p. 430-436, 1981.
- GOVINDASWAMY, S.; VANE, L. M. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 677–685, 2007.
- GREWAL, H. S.; K. L. KALRA. Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances* v. 13, n.2, p. 209-234, 1995
- HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microbiology Technologies*, v. 16, p. 933-943, 1994.
- HONG, S. G.; CHUN, J.; OH, H. W.; BAE, K. S. *Metschnikowia koreensis* sp nov., a novel yeast species isolated from flowers in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* v. 51, p. 1927-1931, 2001.
- ILMÉN, M.; KOIVURANTA, K.; RUOHONEN, L.; SUOMINEN, P.; PENTTILÄ, M. Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73 n. 1, p. 117-123, 2007.
- JEFFRIES, T. W. Mutants of *Pachysolen tannophilus* showing enhanced rates of growth and ethanol formation from o-xylose. *Enzyme Microbial Technology*, v. 6, p. 254-258, 1984.
- KILIAN, S. G.; VAN UDEN, N. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 545-548, 1988.
- KIRIMURA, K.; HONDA, Y.; HATTO, T. Gluconic and Itaconic Acids. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, v. 3, p. 143-147, 2011.
- LEE, D.; OWENS, V.; N.; BOE, A.; JERANYAMA, P. Composition of herbaceous biomass feedstocks. *South Dakota State University Publication*, SGINC1-07, Brookings, SD; June 2007.

- LIU, X.; LV, J., XU, J; ZHANG, T.; DENG, Y.; HE, J. Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b Yeast When Grown on Waste Cooking Oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 175, n. 5, p. 2347-2356, 2015.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock.* , 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 1160p. 2010.
- MADDOX, I. S., K. SPENCER, GREENWOOD, J. M., DAWSON, M. W. BROOKS, J. D. Production of citric acid from sugars present in wood hemicellulose using *Aspergillus niger* and *Saccharomycopsis lipolytica*. *Biotechnology Letters* v. 7, n. 11, p. 815-818, 1985
- MARTINS, G. M. *Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose*. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.
- MARUI, J.; YAMANE, N.; OHASHI-KUNIHIRO, S.; ANDO, T.; HIGA, Y.; NISHIMURA, M.; MACHIDA, M. Kojic acid biosynthesis in *Aspergillus oryzae* is regulated by a Zn(II)2Cys6 transcriptional activator and induced by kojic acid at the transcriptional level. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 112, p. 40–43, 2011.
- McMILLAN, J. D. *Xylose Fermentation to Ethanol: A Review*. Springfield: National Technical Information Service, 1993.
- MEENA, V. S. BANOTH, L. BANERJEE, U. C. Demonstration of Redox Potential of *Metschnikowia koreensis* for Stereoinversion of Secondary Alcohols/1,2-Diols. *Biomed Research International*. v. 2014, p. 1-5, 2014.
- MILLER, G. L. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for fermentation of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p. 426-428, 1959.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 1274p. 2011.
- NIGAM, J. N.; IRELAND, R. S.; MARGARITIS, A.; LACHANCE, M.A. Isolation and screening of yeasts that ferment d-xylose directly to ethanol. *Appl Environ Microbiol*. v. 50, p. 1486–1489, 1985.
- OSAWA, F.; FUJII, T.; NISHIDA, T.; TADA, N.; OHNISHI, T.; KOBAYASHI, O.; KOMEDA, T.; YOSHIDA, S. Efficient production of L-lactic acid by Crabtree-negative yeast *Candida boidinii*. *Yeast*, v. 26, n. 9, p. 485-496, 2009.
- PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 244–263, 2007.
- PINES, O.; EVEN-RAM, S.; ELNATHAN, N.; BATTAT, E.; AHARONOV, O.; GIBSON, D.; GOLDBERG, I.; The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in

*Saccharomyces cerevisiae*: The role of fumarase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, n. 4, p. 393-399, 1996.

POLEN, T.; SPELBERG, M.; BOTT, M. Toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables, *Journal of Biotechnology*, 2012. Disponível em: <HYPERLINK "http://www.elsevier.com/locate/jbiotec"www.elsevier.com/locate/jbiotec>, acesso em fevereiro de 2013

QING, X.; SHUANG, L.; HE H.; JIANPING, W. Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 1685-1696, 2012.

RAO, R. S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. *Letters in Applied Microbiology*, v. 47, p. 19-24, 2008.

SASAHARA, H.; IZUMORI, K. Production of L-talitol from L-psicose by *Metschnikowia koreensis* LA1 isolated from soy sauce mash. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 100, n. 3, p. 335-338, 2005

SCHWARTZ, H.; RADLER, F.; Formation of c-malate by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* v. 27, p. 553 560, 1988

SINGH, A.; CHISTI Y.; BANERJEE, U. C. Production of carbonyl reductase by *Metschnikowia koreensis*. *Bioresource Technology*. v. 102, n. 22, p. 10679-10685, 2011.

SINGH, A.; CHISTI Y.; BANERJEE, U. C. Stereoselective biocatalytic hydride transfer to substituted acetophenones by the yeast *Metschnikowia koreensis*. *Process Biochemistry*. v.47, n. 12, p. 2398-2404, 2012.

SUK-JIN, H.; GALAZKA, J. M.; SOO R. K.; JIN-HO, C.; XIAOMIN Y.; JIN-HO, S.; GLASS, N. L.; CATE, J. H. D.; YONG-SU, J. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. *Applied Biological Sciences, PNAS Early Edition*, 2010. disponível em: <HYPERLINK "http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010456108"www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010456108>, acesso em fevereiro de 2013.

TIAN, S.; ZANG, J.; PAN, Y.; LIU, J.; YUAN, Z.; YAN, Y.; YANG, X. Construction of a recombinant yeast strain converting xilose and glucose to ethanol. *Front. Biol. China*, v. 3, n. 2, p. 165-169, 2008.

TOIVOLA, A.; YARROW, D.; VAN DEN BOSCH, E.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERSI, W. A. Alcoholic Fermentation of D-Xylose by Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, n. 6, p. 1221-1223, 1984.

VAN VLEET, J. H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 20, p. 300–306, 2009.

- VRSALOVI, A.; CKI, P.; ZELI, B.; VASI, D. Comparison of the malic acid production by isolated fumarase and fumarase in permeabilized baker's yeast cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p.605–612, 2007.
- WANG, Y., TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 119, n. 1, p. 10-18, 2015.
- WATANABE, T.; WATANABE, I.; YAMAMOTO, M.; ANDO, A.; NAKAMURA, T. A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 1844–1848, 2011.
- XU, X.; LIN J.; CEN, P. Advances in the Research and Development of Acrylic Acid Production from Biomass. *Chinese J. Chem. Eng.*, v. 14, n. 4, p.419-427, 2006.
- YANG S. T.; HUANG, H.; TAY, A.; QIN, W.; GUZMAN, L.; SAN NICOLAS, E. C. Extractive Fermentation for the Production of Carboxylic Acids, Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, cap. 6, p.421-446, 2007.
- YOXIDA, S.; YOKOYAMA, A. Identification and characterization of genes related to the production of organic acids in yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 113, n. 5, p. 556-561, 2012.
- ZEPPA, G.; CONTERNO, L.; GERBI, V. Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v. 49, n. 6, p. 2722-2726, 2001