



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Câmpus de São José do Rio Preto

Diego Alves Monteiro

**Estudo do Transporte e Assimilação de Pentoses, Crescimento das
Células e Detecção da Produção de Ácidos Orgânicos por Leveduras**

São José do Rio Preto

2020

Diego Alves Monteiro

Estudo do Transporte e Assimilação de Pentoses, Crescimento das Células e Detecção da Produção de Ácidos Orgânicos por Leveduras

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eleni Gomes

São José do Rio Preto

2020

M775e Monteiro, Diego Alves
Estudo do Transporte e Assimilação de Pentoses, Crescimento das Células e Detecção da Produção de Ácidos Orgânicos por Leveduras / Diego Alves Monteiro. -- São José do Rio Preto, 2020
105 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Eleni Gomes

1. Ácidos Orgânicos. 2. Leveduras. 3. Pentoses. 4. Transportadores. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Diego Alves Monteiro

Estudo do Transporte e Assimilação de Pentoses, Crescimento das Células e Detecção da Produção de Ácidos Orgânicos por Leveduras

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof.^a Dr.^aEleni Gomes

Comissão Examinadora

Prof.^a Dr.^a Eleni Gomes
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Ibilce/Unesp

Prof. Dr. Jeferson Gross
Instituto de Pesquisa em Bioenergia – IPBEN/Unesp

Prof. Dr. Guillermo Ladino Orjuela
Centro Universitário de Votuporanga – UNIFEV

Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Ibilce/Unesp

Prof.^a Dr.^a Gabriela Salvador de Amo
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – IFSP

São José do Rio Preto
06 de março de 2020

Ao povo brasileiro, fonte dos recursos
investidos nas universidades públicas.

AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grato a minha querida mãe, a amorosa e divertida Fátima, que através de suas lágrimas e suor proporcionou para mim liberdade e saúde sem os quais hoje eu seria literalmente nada neste planeta.

Agradeço minha inestimável companheira Natália que sempre me ampara e proporciona paz.

Agradeço ao apoio de meu irmão Álvaro, de meu pai Bartolomeu e de meus familiares.

Agradeço a Professora Eleni Gomes pela orientação acadêmica e de muitas vezes me considerar como um filho no laboratório.

Agradeço ao Professor Roberto da Silva, o primeiro docente que confiou em mim e abriu as portas de seu laboratório para que eu adentrasse a carreira acadêmica.

Agradeço ao Professor Maurício por além de me depositar confiança também me forneceu valiosos conhecimentos em química instrumental.

Agradeço a Professora Catarina Prista, por me acolher em seu laboratório em Portugal e me orientar no estudo de transporte de açúcar pela membrana plasmática.

Agradeço a amizade fraternal de todos os integrantes que caminharam comigo no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada-IBILCE/Unesp, infelizmente não consigo citar todos os nomes e alguns foram muito especiais, mas não posso deixar de citar o Pedro, pois colaborou e compartilhou com todos os bons momentos no laboratório.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, câmpus de São José do Rio Preto, por todo amparo institucional, principalmente pelo RU e Biblioteca.

Agradeço ao Instituto Superior de Agronomia e a Universidade de Lisboa pelos serviços prestados e manter trabalhadores eficientes tanto na secretaria quanto nos laboratórios.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O conhecimento das propriedades inerentes aos microrganismos assimiladores de pentoses deve ser obtido para que se desenvolva novas possibilidades de aplicação da biomassa lignocelulósica. A hemicelulose (polissacarídeo rico em pentoses) corresponde em média 25 % da massa da biomassa vegetal e sua hidrólise gera uma mistura de xilose e arabinose. Muitas leveduras, que utilizam pentoses como fonte de carbono, poderiam ser utilizadas direta ou indiretamente (através da expressão heteróloga de seus genes) na bioconversão dessas pentoses em combustível ou em outros produtos de elevado valor mercadológico. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial das cepas *Sporidiobolus pararoseus* U3, *Pichia terricola* G20 e *Metschnikowia koreensis* G18 de crescerem em xilose e arabinose nos pHs 4,5, 6,5 e 8,5, nas temperaturas 29 e 32 °C, na presença de compostos potencialmente tóxicos (8 compostos em três concentrações cada) e em hidrolisados de bagaço de cana. Dados sobre o efeito do pH, nutrientes e oxigenação e fontes de nitrogênio (nitrato de amônio, sulfato de amônio e ureia) em diferentes concentrações no crescimento e produção de ácidos orgânicos foram obtidos para da cepa *M. koreensis* G18. Todas as leveduras foram capazes de crescer em todos os pHs testados, com destaque as cepas *M. koreensis* G18 e *P. terricola* G20, uma vez que a primeira cresceu consideravelmente tanto em 29 °C como em 32 °C e a segunda por crescer mais rápido com arabinose, embora somente a 32 °C. A melhor assimiladora de pentose e resistente a inibidores foi a *P. terricola* G20, já que consumiu 100 % da xilose disponível e 30 % de arabinose e cresceu na presença de todos os compostos potencialmente tóxicos testados e em hidrolisados de bagaço de cana sem tratamento com carvão ativado. A levedura *M. koreensis* G18 foi capaz de produzir ácidos cítrico, láctico, fumárico e acético utilizando xilose como fonte de carbono, nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, pH inicial de 7,0 e em aerobiose. Foi observado consumo simultâneo de glicose e xilose pela cepa *M. koreensis* G18 e os dados estudo do transporte de açúcares demonstrou que esse consumo é possível devido a presença de proteínas de transporte de alta afinidade a pentoses que não sofrem inibição pela glicose.

Palavras-chave: Ácidos Orgânicos; Leveduras; Pentoses; Transportadores

ABSTRACT

The knowledge of the properties inherent to the pentoses assimilating microorganisms must be obtained in order to develop new possibilities for the application of lignocellulosic biomass. The hemicellulose (polysaccharide rich in pentoses) corresponds in average 25 % of the mass of the vegetal biomass and its hydrolysis generates a mixture of xylose and arabinose. Many yeasts, which use pentoses as a carbon source, could be used directly or indirectly (through the heterologous expression of their genes) in the bioconversion of these pentoses to fuel or other products of high market value. Therefore, the aim of this work was to evaluate the growth potential of strains *Sporidiobolus pararoseus* U3, *Pichia terricola* G20 and *Metschnikowia koreensis* G18 to grow in xylose and arabinose at pHs 4.5, 6.5 and 8.5 at temperatures of 29 and 32 °C in the presence of potentially toxic compounds (8 compounds in three concentrations each) and sugar cane bagasse hydrolysates. Data on the effect of pH, nutrients and oxygenation and sources of inorganic nitrogen (ammonium nitrate, ammonium sulfate and urea) at different concentrations in the growth and production of organic acids were obtained for the strain *M. koreensis* G18. All yeasts were able to grow in all tested pHs, with emphasis on the *M. koreensis* G18 and *P. terricola* G20 strains, since the former grow considerably both at 29 °C and at 32 °C and the second grow at a faster rate with arabinose, although only at 32 °C. The best pentose and inhibitor resistant assimilator was the *P. terricola* G20 as it consumed 100 % of the available xylose and 30% of the arabinose and grew in the presence of all potentially toxic compounds tested and in untreated cane bagasse hydrolysates with activated charcoal. *M. koreensis* G18 was able to produce citric, lactic, fumaric and acetic acids using xylose as carbon source, sodium nitrate as nitrogen source, at initial pH 7.0 and aerobiosis. Simultaneous consumption of glucose and xylose by the *M. koreensis* G18 strain was observed and the data on the transport of sugars demonstrated that this consumption is possible due to the presence of transport proteins of high affinity to pentoses that are not inhibited by glucose.

Keywords: Organic Acids; Pentoses; Transporters; Yeasts

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

- Figura 1** Vias metabólicas de assimilação de xilose, arabinose e glicose em leveduras..... 22

Capítulo 2

- Figura 1** Crescimento de *S. pararoseus* U3 em YEP (a), YEPD (b), YEPX (c), YEPA (d) com pHs 4,5, 6,5 e 8,5 nas temperaturas de 29 °C e 32 °C por 72 h em placas de 96 poços..... 45
- Figura 2** Crescimento de *P. terricola* G20 em YEP (a), YEPD (b), YEPX (c), YEPA (d) com pHs 4,5, 6,5 e 8,5 nas temperaturas de 29 °C e 32 °C por 72 h em placas de 96 poços..... 46
- Figura 3** Crescimento celular, assimilação de açúcar e variação do pH do meio durante cultivo de *S. pararoseus* U3 em YEP (a), YEPD (b), YEPX (c) e YEPA (d) a 29 °C em 150 rpm e pH 6,5 por 72 h em frascos erlenmeyers..... 48
- Figura 4** Crescimento celular, assimilação de açúcar e variação do pH do meio durante o cultivo de *P. terricola* G20 em YEP (a), YEPD (b), YEPX (c) e YEPA (d) a 29 °C em 150 rpm e pH 6,5 por 72 h em frascos erlenmeyers..... 49
- Figura 5** Densidade óptica máxima atingida por *S. pararoseus* U3 em cultura com compostos potencialmente tóxicos..... 50
- Figura 6** Densidade óptica máxima atingida por *P. terricola* G20 em cultura com compostos potencialmente tóxicos..... 51
- Figura 7** Teste de crescimento de *S. pararoseus* U3 em material tratado e hidrolisado: Máxima D.O. após 72 h de cultivo..... 52
- Figura 8** Teste de crescimento de *P. terricola* G20 em material tratado e hidrolisado: Máxima D.O. após 72 h de cultivo..... 53

Capítulo 3

- Figura 1** Estrutura química do ácido láctico..... 62
- Figura 2** Estrutura química do ácido cítrico..... 63
- Figura 3** Estrutura química do ácido fumárico..... 64
- Figura 4** Crescimento de *M. koreensis* G18: D.O. em meio com xilose, arabinose e glicose, a 29 °C..... 69
- Figura 5** Crescimento da *M. koreensis* G18 em YEP (a; b), YEPD (c; d) e YEPX (e; f) em pH 4,5, 6,5 e 8,5 a 29 °C e 32 °C..... 70
- Figura 6** Fase lag, taxa de crescimento e D.O. máx. e min. de culturas da *M. koreensis* G18 em xilose e glicose em pH 4,5, 6,5 e 8,5 71

	a 29 °C (a; c; e) e 32 °C (b; d; f).....	
Figura 7	Produção de biomassa de <i>M. koreensis</i> G18 e variações nas concentrações de açúcar e de valores pH dos meios, ao longo de 72 h de cultivo, a pH 7,0, 29 °C e 150 rpm. YNBX com inóculo em xilose (a), YNBX com inóculo em glicose (b), YNBG com inóculo em xilose (c) e YNBG com inóculo em glicose.....	73
Figura 8	Valores de pH final (a), biomassa final (b) e consumo de açúcar (c) após 72 h de cultivo de <i>M. koreensis</i> G18 em pH 7,0, 29 °C e 150 rpm, em meio contendo xilose, utilizando inóculos obtidos em meios com diferentes tipos de açúcar. YNBX-X: meio com xilose com inóculo obtido em xilose; YNBG-X: meio com glicose com inóculo obtido em xilose; YNBX-D: meio com xilose com inóculo obtido em glicose; YNBG-D: meio com glicose com inóculo obtido em glicose.....	74
Figura 9	Concentrações de ácido láctico no meio de cultivo de <i>M. koreensis</i> G18, após 72 h de cultivo, em meios com xilose e glicose e usando inóculos oriundos de meios com xilose e glicose.....	75
Figura 10	Crescimento de <i>M. koreensis</i> G18 em meio com xilose e nitrato de sódio (a), xilose e sulfato de amônio (c), xilose e ureia (e), glicose e nitrato de sódio (b), glicose e sulfato de amônio (d) e glicose e ureia (f). O eixo X corresponde às concentrações de N (2,0, 6,0 e 10 g/L).....	76
Figura 11	Crescimento de <i>M. koreensis</i> G18 em meio com xilose adicionado com nitrato de sódio (a) ou sulfato de amônio (b) em concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0 g/L.....	77
Figura 12	Biomassa, consumo de açúcar e pH durante 88 h de cultivo a 29 °C em 150 rpm, meio com pH inicial de 4,5 com xilose e nitrato de sódio em aerobiose (a) e em anaerobiose (b), com xilose e sulfato de amônio em aerobiose (c) e em anaerobiose (d) e meio com glicose e sulfato de amônio em aerobiose (e) e anaerobiose (f).....	79
Figura 13	Biomassa, consumo de açúcar e pH durante 88 h de cultivo a 29 °C em 150 rpm, meio em pH 7,0 com xilose e nitrato de sódio em aerobiose (a) e em anaerobiose (b), com xilose e sulfato de amônio em aerobiose (c) e em anaerobiose (d) e meio com glicose e sulfato de amônio em aerobiose (e) e anaerobiose (f).....	81

Capítulo 4

Figura 1	Registro do pH (linha azul) durante o ensaio de transporte pela <i>S. pararoseus</i> U3 e alcalinização do meio extracelular (A) após adição de arabinose.....	92
Figura 2	Registro do pH (linha azul) durante o ensaio de transporte pela <i>M. koreensis</i> G18, perturbação do sinal causado pela solução de glicose (A) e redução de pH do meio extracelular (B) após adição de glicose.....	95
Figura 3	Registro do pH (linha azul) durante o ensaio de transporte pela <i>M. koreensis</i> G18 e alcalinização do meio extracelular (A) após adição de xilose.....	96
Figura 4	Curvas de crescimento da <i>M. koreensis</i> G18 utilizando xilose como única fonte de carbono com os momentos da análise dos parâmetros cinéticos.....	96
Figura 5	Curvas de crescimento da <i>M. koreensis</i> G18 utilizando glicose (a) como única fonte de carbono e mistura de glicose e xilose (b) com os momentos da análise dos parâmetros cinéticos.....	98
Figura 6	Crescimento e concentração de xilose e glicose durante o cultivo da <i>M. koreensis</i> G18 em meio com mistura de xilose e glicose (1:1).....	99
Figura 7	Crescimento e concentração de xilose glicose durante o cultivo da <i>M. koreensis</i> G18 em meio com glicose (a) e xilose (b).....	100

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1	Compostos inibidores analisados e a faixa de concentrações testadas.....	42
-----------------	--	----

Capítulo 3

Tabela 1	Valores de pH, biomassa, consumo de açúcar e concentração de ácidos orgânicos após 88 h de cultivo em aerobiose e anaerobiose, pH inicial de 4,5, em 29 °C, em glicose e xilose, como fonte de carbono, e NaNO ₃ e (NH ₄) ₂ SO ₄ , como fontes de nitrogênio.....	80
Tabela 2	Valores de pH, biomassa, consumo de açúcar e concentração de ácidos orgânicos após 88h de cultivo em aerobiose e anaerobiose, pH 7,0 em 29 °C em glicose e xilose, como fonte de carbono, e NaNO ₃ e (NH ₄) ₂ SO ₄ , como fontes de nitrogênio..	82

Capítulo 4

Tabela 1	Presença de transporte por simporte com prótons de glicose, xilose e Arabinose pela cepa <i>P. terricola</i> G20 e <i>S. pararoseus</i> U3 cultivadas em arabinose e glicose a 29 °C, 150 rpm e pH 6,5 por 12, 24 e 72 h.....	94
Tabela 2	Parâmetros cinéticos do transporte de xilose pela cepa <i>M. koreensis</i> G18 cultivadas em glicose, xilose e mistura de xilose e glicose a 29 °C, 150 rpm e pH 6,5 por 12, 24, 72 e 96 h.....	97
Tabela 3	Biomassa, açúcar consumido e taxa de consumo nas primeiras 2 horas de cultivo da <i>M. koreensis</i> G18 em meios com glicose, xilose e mistura de glicose e xilose (1:1).....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIN EB	Bagaço inatura hidrolisado por extrato bruto
BIN EB (carv.)	Bagaço inatura hidrolisado por extrato bruto tratado com carvão ativado
BIN R	Bagaço inatura hidrolisado por enzima recombinante
BIN R (carv.)	Bagaço inatura hidrolisado por enzima recombinante tratado com carvão ativado
BT EB	Bagaço Tratado hidrolisado por extrato bruto
BT EB (carv.)	Bagaço Tratado hidrolisado por extrato bruto tratado com carvão ativado
BT R	Bagaço Tratado hidrolisado por enzima recombinante
BT R (carv.)	Bagaço Tratado hidrolisado por enzima recombinante tratado com carvão ativado
D.O.	Densidade Óptica
X EB	Xilana extraída hidrolisado por extrato bruto
X EB (carv.)	Xilana extraída hidrolisado por extrato bruto tratado com carvão ativado
X R	Xilana extraída hidrolisado por enzima recombinante
X R (carv.)	Xilana extraída hidrolisado por enzima recombinante tratado com carvão ativado
YEP	Yest Extract e Peptone
YEPA	Yest Extract, Peptone e Arabinose
YEPD	Yest Extract, Peptone e Dextrose
YEPX	Yest Extract, Peptone e Xilose

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	15
Organização do Trabalho Escrito.....	16
Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica Geral.....	17
1.1. Assimilação de pentoses em leveduras.....	19
1.2. Transporte de pentoses em leveduras.....	23
Referências.....	29
Objetivos.....	36
Capítulo 2 – Avaliação da capacidade das leveduras <i>Sporidiobolus pararoseus</i> U3 e <i>Pichia terricola</i> G20 de crescer utilizando xilose e arabinose em diferentes valores de pH, na presença de inibidores de crescimento microbiano e hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.....	37
1. Introdução.....	37
2. Material e Métodos.....	40
2.1. Leveduras utilizadas.....	40
2.2. Padronização do inóculo.....	40
2.3. Avaliação dos efeitos do pH e temperatura sobre o crescimento das cepas em meio com glicose, xilose e arabinose.....	41
2.4. Avaliação do crescimento e consumo de glicose, xilose e arabinose durante o cultivo.....	41
2.5. Teste de tolerância a compostos tóxicos.....	41
2.6. Avaliação da capacidade de crescimento das cepas em bagaço de cana-de-açúcar tratado e hidrolisado e xilana hidrolisada extraída de bagaço de cana-de-açúcar, antes e depois de tratamento com carvão ativado.....	42
2.6.1. Obtenção da xilose de bagaço de cana.....	42
2.6.2. Cultivo das leveduras no hidrolisado do bagaço de cana.....	43
3. Resultados e discussão.....	44
3.1. Avaliação dos efeitos do pH e temperatura sobre o crescimento das cepas.....	44
3.2. Crescimento celular, assimilação de açúcar e alteração do pH do meio na fermentação das leveduras <i>S. pararoseus</i> U3 e <i>P. terricola</i> G20.....	47

3.3. Teste de tolerância das leveduras a compostos potencialmente tóxicos.....	50
3.4. Teste de crescimento das cepas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	52
4. Conclusões.....	54
Referências.....	55

Capítulo 3 – Avaliação das condições de crescimento e produção de ácidos orgânicos pela levedura <i>Metschnikowia koreensis</i> G18 em meio com xilose como fonte de carbono.....	62
1. Introdução.....	62
2. Material e Métodos.....	65
2.1. Levedura utilizada.....	65
2.2. Padronização do inóculo.....	65
2.3. Avaliação dos efeitos do pH e temperatura sobre o crescimento celular em meio com glicose, xilose e arabinose.....	66
2.4. Avaliação do efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre o crescimento celular e em meio com glicose e xilose.....	66
2.5. Avaliação do crescimento e consumo de glicose e xilose durante o cultivo.....	66
2.6. Identificação e quantificação de ácidos orgânicos.....	67
3. Resultados e discussão.....	68
3.1. Crescimento em diferentes meios de cultura base de nitrogênio com diferentes fontes de carbono.....	68
3.2. Avaliação de parâmetros de crescimento celular em glicose e xilose em diferentes condições de pHs e temperaturas.....	69
3.3. Avaliação da influência da fonte de carbono do inóculo no crescimento celular em glicose e xilose e produção de ácido lático.....	72
3.4. Avaliação do crescimento de <i>M. koreensis</i> G18 em meio com glicose ou xilose como fonte de carbono e com diferentes fontes de nitrogênio.....	75
3.5. Avaliação do crescimento celular, consumo de açúcar, pH durante o cultivo e obtenção de ácidos orgânicos em aerobiose e anaerobiose em glicose e xilose, como fonte de carbono, NaNO ₃ e (NH ₄) ₂ SO ₄ , como fonte de nitrogênio.....	78
4. Conclusões.....	83
Referências.....	84

Capítulo 4 – Avaliação do mecanismo de transporte de D-xilose e L-arabinose pela membrana das leveduras <i>Metschnikowia koreensis</i> G18, <i>Sporidiobolus pararoseus</i> U3 e <i>Pichia terricola</i> G20.....	87
1. Introdução.....	87
2. Material e Métodos.....	89
2.1. Leveduras utilizadas.....	89
2.2. Condições de cultivo para avaliação do crescimento, consumo de açúcar e obtenção de biomassa.....	89
2.3. Análise cromatográfica para quantificação de açúcares.....	89
2.4. Análise para obtenção das taxas de transporte da xilose.....	90
3. Resultados e discussão.....	91
3.1. Avaliação do transporte de glicose, xilose e arabinose pela membrana da levedura <i>P. terricola</i> G20, <i>S. pararoseus</i> U3 e <i>M. koreensis</i> G18 cultivada em glicose, xilose e arabinose.....	91
3.2. Avaliação do perfil de consumo de xilose e glicose da levedura <i>M. koreensis</i> G18 cultivada em xilose, glicose e mistura de xilose e glicose (1:1).....	98
4. Conclusões.....	102
Referências.....	103

INTRODUÇÃO GERAL

No período de 2011 a 2015 o grupo de pesquisa desenvolveu um projeto temático (Proc. Fapesp 2010/12624-0), sob a coordenação da Prof.^a Dr.^a. Eleni Gomes, cujo objetivo principal foi a sacarificação enzimática de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. Desse projeto resultou, para o Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (LBMA) Unesp/Ibilce, uma coleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de enzimas fibrolíticas e leveduras capazes de assimilar as pentoses oriundas da hidrólise da hemicelulose.

Na coleção de leveduras capazes de crescer em xilose ou arabinose como únicas fontes de carbono, existem algumas linhagens que, embora foram capazes de consumir 80 a 100 % da xilose ou arabinose disponíveis no meio de cultura, apresentaram baixo crescimento e também não produziram etanol ou xilitol. Além disso, várias das cepas estudadas também foram capazes de tolerar derivados fenólicos descritos como tóxicos para leveduras.

Uma análise exploratória do meio de cultivo dessas leveduras revelou, em inúmeros picos cromatográficos, compostos de baixa massa molar, incluindo vários ácidos orgânicos.

Considerando que a fisiologia de algumas leveduras assimiladoras de pentose ainda não ser bem conhecida, seria importante um estudo direcionado ao conhecimento das condições físicas, químicas e nutricionais que determinam o máximo de crescimento das cepas e quais seriam os produtos formados pelas mesmas ao utilizar pentoses como única fonte de carbono.

Estudos sobre transporte de moléculas através da membrana plásmatica e os aspectos bioquímicos relacionados também são necessários. Investigar o transporte de moléculas através da membrana é uma etapa importante para conhecer a fisiologia dessas leveduras uma vez que impõe limitações aos rendimentos de vias metabólicas.

Portanto, este trabalho visa estudar a capacidade dessas leveduras para crescerem e produzirem ácidos orgânicos utilizando pentoses como fonte de carbono e conhecer aspectos bioquímicos do transporte de xilose e arabinose.

ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO ESCRITO

Este texto foi organizado em três capítulos para melhor distribuição e entendimento do conteúdo.

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica Geral

Neste capítulo foi realizada uma revisão de literatura abordando os principais temas do trabalho.

*Capítulo 2: Avaliação da capacidade das leveduras *S. pararoseus* U3 e *P. terricola* G20 para crescer utilizando xilose e arabinose em diferentes valores de pH, na presença de inibidores do crescimento microbianos e hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.*

*Capítulo 3: Produção de ácidos cítrico, fumárico acético e láctico pela levedura *Metschnikowia koreensis* G18 utilizando xilose como fonte de carbono.*

*Capítulo 4: Avaliação do mecanismo de transporte de D-xilose e L-arabinose pela membrana das leveduras *Metschnikowia koreensis* G18, *Sporidiobolus pararoseus* U3 e *Pichia terricola* G20*

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

O aproveitamento de biomassa residual oriunda da agroindústria ou da agricultura é uma tendência na biotecnologia e será crucial para valorizar as cadeias de produção de energia e outros produtos de alto valor agregado. Espera-se nos próximos 10 anos um grande avanço nos conhecimentos sobre processos de conversão de biomateriais (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; DAVISON et al., 2015).

Materiais lignocelulósicos são compostos por três grandes grupos de polímeros: celulose, lignina e hemiceluloses. A celulose é um homopolímero formado por glicoses unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4. Hemiceluloses são heteropolímeros altamente ramificados, constituídos de açúcares hexoses (galactose, glicose e manose) e pentoses (xilose e arabinose), sendo a xilose o principal produto da hidrólise da hemicelulose. A lignina é um constituinte estrutural das plantas, é a maior fração de não-carboidratos da lignocelulose e, por isso, não é utilizada em processos de fermentação (LEE et al., 2007).

A hidrólise da celulose e hemicelulose gera uma mistura de pentoses e hexoses. Para que o aproveitamento energético do material lignocelulósico é necessário que o microrganismo 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 xilose, devido à ausência de enzimas que convertam a xilose em xilulose (FROMANGER et al., 2010; TIAN et al., 2008). Entretanto, várias espécies de leveduras têm 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* (CHANDRAKANT; BISARIA, 2008; GONG et al., 1983; McMILLAN, 1993).

A bioconversão da biomassa lignocelulósica é uma temática importante dessa década visto a variedade de açúcares e derivados aromáticos que podem dela ser obtidos. Biomassa lignocelulósica refere-se aos resíduos agrícolas, agroindustriais e urbanos (YANG et al., 2015) cujo uso como matéria-prima, além de aproveitamento de materiais nobres como açúcares, ainda agrega valor a resíduos considerados materiais de descarte (LIGUORI; AMORE; FARACO, 2013).

Os ácidos orgânicos têm grande importância como *commodity* químico. Além da obtenção por via química, estes ácidos podem ser produzidos por vias biológicas empregando principalmente fungos. Os ácidos orgânicos são utilizados como aditivos alimentares, empregados na indústria química e farmacêutica e vem sendo explorados na nanomedicina. Os ácidos cítrico, láctico e fumárico têm alto potencial de mercado com produção anual de 1.600.000, 300.000 e 90.000 toneladas, respectivamente (YANG; LÜBECK, LÜBECK, 2017).

A obtenção dos ácidos orgânicos a partir de matérias renováveis como os resíduos lignocelulósicos, usando bioprocessos é uma alternativa econômica e ambientalmente sustentável em relação ao método tradicional usando derivados de petróleo (LIU et al., 2017).

Em trabalhos prévios desenvolvidos pelo grupo de pesquisa foram selecionadas várias cepas de leveduras capazes de crescer em xilose como única fonte de carbono. Algumas delas 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 produziram etanol. Considerando que a fisiologia das leveduras assimiladoras de pentose ainda não é bem conhecida, mostrou-se necessário um estudo de quais seriam os produtos formados a partir do consumo da xilose. Portanto foi realizado outro trabalho que testou a capacidade dessas leveduras para produzir ácidos orgânicos a partir de xilose.

Nesse trabalho foi confirmada a produção variada destes compostos. De todas as leveduras testadas, *Metschnikowia koreensis* G18, que além de consumir toda xilose presente no meio, mostrou potencial para produção de alguns ácidos orgânicos, dentre esses o ácido láctico.

Leveduras têm recebido muita atenção recentemente como produtores de ácido láctico, porque eles podem crescer em meios minerais que podem facilitar ainda mais a recuperação de ácido láctico. Além disso, as leveduras toleraram valores baixos de pH o que permitiria estabelecer fermentações sem correção do pH (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Muitas leveduras podem produzir naturalmente pequenas quantidades de ácido láctico e vários estudos têm sido conduzidos visando às leveduras modificadas geneticamente para a produção de ácido láctico, tendo como alvo principal a

inativação da piruvato descarboxilase ou piruvato desidrogenase (ILMÉN et al., 2007; OSAWA et al., 2009; REZNICEK et al., 2015).

1.1. Assimilação de pentoses em leveduras

Várias espécies de leveduras têm sido descritas como assimiladoras de xilose por vias oxidativa ou fermentativa, sendo os gêneros mais frequentemente citados *Brettanomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Meyerozyma*, *Pachysolen*, *Pichia* e *Schizosaccharomyces* (CHANDRAKANT; BISARIA, 2008; GONG et al., 1983; McMILLAN; D, 1993; SILVA et al., 2016; WANG et al., 2015).

Scheffersomyces stipitis é a espécie mais aplicada na fermentação de pentoses, sendo relatada estando em cerca de 85 publicações científicas entre 2005 e 2016. Há ainda outras culturas estudadas com menor frequência como *Spathaspora arborariae* (DA CUNHA-PEREIRA et al., 2011; HICKERT et al., 2014), *Pichia guilliermondii* (FAN et al., 2013), *Hansenula polymorpha* (VORONOVSKY et al., 2009).

Outros grupos microbianos como fungos filamentosos, principalmente os pertencentes aos gêneros *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. e *Rhizomucor* sp. (ABEDINIFAR et al., 2009; KOMEDA et al., 2014; MILLATI; EDEBO; TAHERZADEH, 2005; SUES et al., 2005), bem como *Fusarium* sp., *Neurospora* sp. e *Acremonium* sp. (DE ALMEIDA et al., 2013; PANAGIOTOU et al., 2005) também são reportados como bons assimiladores de pentoses. OKAMOTO et al. (2012) relatam a utilização das espécies *Trametes hirsuta* e *Neolentinus lepideus* com esse propósito. Entre as bactérias fermentadoras de pentoses são relatadas *Caloramator boliviensis* (CRESPO et al., 2012) e espécies dos gêneros *Thermoanaerobacter* sp., *Thermoanaerobacterium* sp. e *Caldanaerobacter* sp. (CHENXI et al., 2013; HE et al., 2009).

A assimilação de pentoses e crescimento microbiano de alto rendimento utilizando esses açúcares como única fonte de carbono implica na existência de um sistema eficiente de transporte através da membrana que não limite a via catabólica. O transporte de D-xilose em leveduras ocorre por sistemas de baixa e alta afinidade. Entre esses sistemas estão a difusão facilitada e o mecanismo de simportador ligado a co-transporte de próton e dependem do estado nutricional da levedura. Por exemplo, *Rhodotorula glutinis* tem pelo menos um sistema de transporte de baixa e um de alta afinidade para D-xilose. Esse último é reprimido quando a levedura

crece em xilose e desreprimido em *starvation*. Ambos os sistemas são totalmente reprimidos por glicose, sugerindo serem os mesmos que transportam esse açúcar (KILIAN; VAN UDEN, 1988).

Em *Pichia stipitis* o transporte tanto de xilose como de glicose ocorre principalmente por sistema simportador com próton (DE SALES et al., 2015). Em *Candida 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 pela glicose ($K_M = 0,12$ mM) e D-xilose ($K_M = 1,0$ mM) (DOES; BISSON, 1989). O transporte de açúcar e suas implicações são discutidos mais detalhadamente na sequência.

Após o transporte a D-xilose é encaminhada para a via das pentoses fosfatos (Figura 1), desta forma a D-xilose é reduzida a xilitol pela enzima D-xilose redutase (aldose redutase EC 1.1.1.21) e subsequentemente oxidada a D-xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (D-xilose redutase, EC 1.1.1.9). Pela ação da enzima D-xiluloquinase (EC 2.7.1.17.) a D-xilulose é convertida em D-xilulose-5-fosfato. Ribulose-fosfato-3-epimerase (EC 5.1.3.1) transaldolase (EC 2.2.1.2) e transcetolase (EC 2.2.1.1) sequencialmente convertem a D-xilulose-5-fosfato em gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato por rearranjo não oxidativo levando à formação de etanol pela via *Embden-Meyerhof* (CHANDEL et al., 2011).

A enzima xilose redutase (XR), que catalisa a primeira reação, é capaz de usar NADPH e NADH, com preferência por NADPH, enquanto a xilitol desidrogenase, que produz xilulose a partir do xilitol, é NAD^+ -dependente. Dependendo do balanço redox da célula (equilíbrio entre NADPH e NAD^+), o xilitol pode ser liberado para o meio externo, resultando em baixo rendimento em etanol. Desse modo, o potencial redox da célula pode determinar o produto extracelular obtido no processo fermentativo de xilose (LIANG et al., 2014).

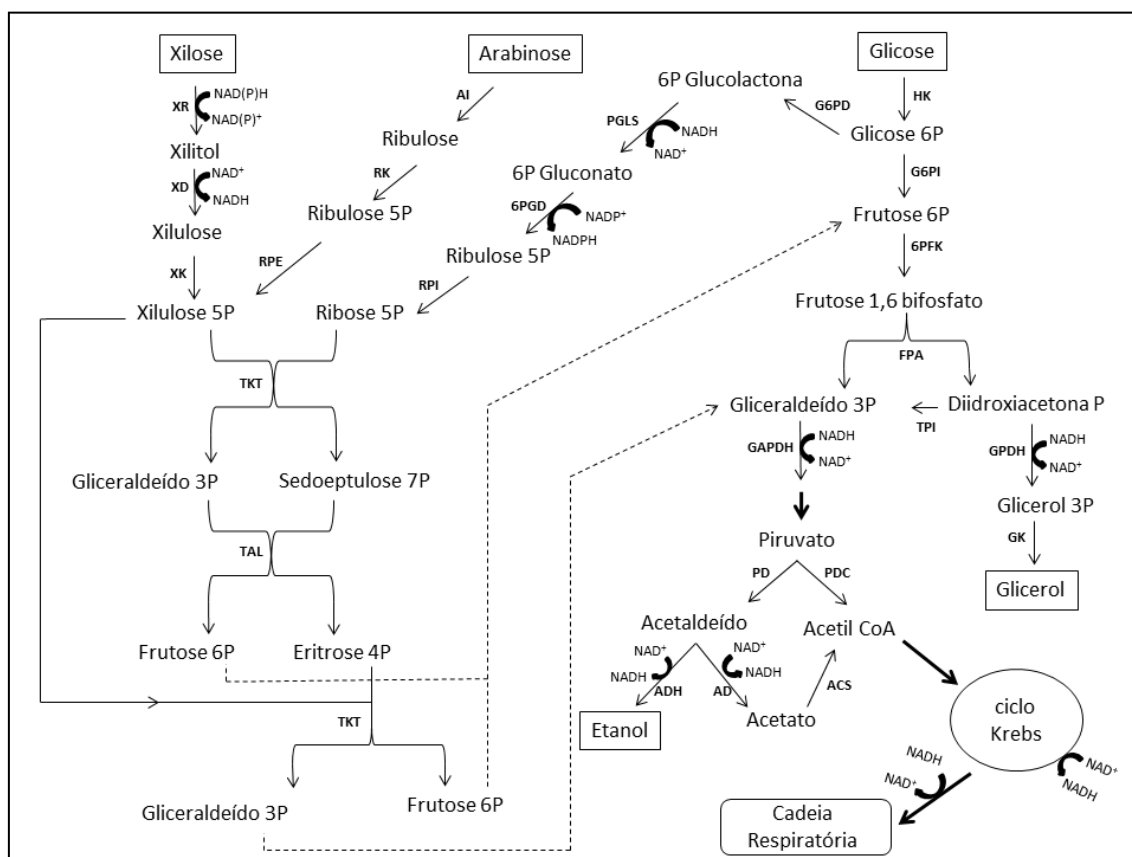
Os níveis de oxigênio durante a fermentação da xilose são frequentemente relacionados ao aparente desequilíbrio redox (MENG LIANG et al., 2013). Em condições anaeróbicas, devido à diferença de cofator das duas enzimas, ou seja, uma requer NADPH e outra NAD^+ , ocorre um acúmulo de $NADP^+$ e NADH. O $NADP^+$ pode ser reduzido via frutose-6-fosfato, porém esse sistema em algumas leveduras,

não reoxida NADH em ausência de oxigênio, levando à liberação de xilitol. Como essas leveduras não tem atividade transidrogenase ($\text{NADH} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$) o equilíbrio não pode ser obtido por essa rota (Figura 1). Entretanto, *S. stipitis*, *C. shehatae* e *P. tannophilus* tem atividade de XR com dupla especificidade pelo co-fator o que alivia o balanço redox e permite produção de etanol em anaerobiose, sem o acúmulo de xilitol (BRUINENBERG; VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1983).

A xilulose 5-fosfato formada é metabolizada pela via das pentoses fosfato. Essa via, ocorre na grande maioria dos eucariotos e tem a função de suprir as necessidades de NADPH, ribose-fosfato e eritrose-4-fosfato para as vias de síntese normais das células. Em geral, cerca de 0,9 a 10 % da glicose é desviada para essa via. Em leveduras fermentadoras de xilose, a totalidade do açúcar é metabolizada pela via das pentoses fosfato com conversão de xilulose-5-fosfato a frutose-6-fosfato que é direcionada por intersecção da via glicolítica a piruvato. A partir do piruvato, rotas oxidativas ou fermentativas podem se seguir (VAN VLEET; JEFFRIES, 2009).

Apesar de a maioria das pesquisas serem concentradas em D-xilose, a arabinose está presente em concentrações significantes em muitas hemiceluloses como os resíduos da cana-de-açúcar ou espécies herbáceas. As vias de assimilação de arabinose também são apresentadas na Figura 1.

Figura 1. Vias metabólicas de assimilação de xilose, arabinose e glicose em leveduras.



Fonte: Matins, 2015.

6PFK: 6-fosfofrutoquinase (EC2.7.1.11); **6PGD:** fosfogliconato 2-desidrogenase (EC1.1.1.43); **ACS:** acetil-CoA sintase (EC6.2.1.1); **AD:** aldeído desidrogenase (EC1.2.1.3); **ADH:** álcool desidrogenase (EC1.1.1.1); **AI:** arabinose isomerase (EC5.3.1.3); **FPA:** frutose-bisfosfato aldolase (EC4.1.2.13); **G6PD:** glicose-6-fosfato desidrogenase (EC1.1.1.49); **G6PI:** glicose-6-fosfato isomerase (EC5.3.1.9); **GAPDH:** gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (EC1.2.1.12); **GK:** glicerol quinase (EC2.7.1.30); **GPDH:** glicerol-3-fosfato desidrogenase (EC1.1.1.8); **HK:** hexoquinase (EC2.7.1.1); **PD:** piruvato descarboxilase (EC4.1.1.1); **PDC:** complexo piruvato desidrogenase (EC1.2.4.1; EC2.3.1.12; EC1.8.1.4); **PGLS:** 6-fosfogliconolactonase (EC3.1.1.31); **RK:** ribuloquinase (EC2.7.1.16); **RPE:** L-ribulose-5-fosfato 4-epimerase (EC5.1.3.4); **RPI:** ribose-5-fosfato isomerase (EC5.3.1.6); **TAL:** transaldolase (EC2.2.1.2); **TKT:** transcetolase (EC2.2.1.1); **TPI:** triose-fosfato isomerase (EC5.3.1.1); **XD:** xilitol desidrogenase (EC1.1.1.113); **XK:** xiluloquinase (EC2.7.1.17); **XR:** xilose redutase (EC1.1.1.307).

A primeira demonstração de fermentação de L-arabinose em etanol por uma levedura foi realizada em 1996 (DIEN et al., 1996), enquanto a produção de etanol a partir de D-xilose tem sido relatada desde o início da década de 80 (GONG et al., 1981, 1983; NIGAM et al., 1985; TOIVOLA et al., 1984).

Assim como acontece no metabolismo de D-xilose, a L-arabinose é convertida a D-xilulose-5-fosfato, porém por meio de cinco etapas. Primeiramente, ocorrem quatro reações redox: duas oxidações acopladas ao consumo de NAD⁺, nas quais a L-arabinose é primeiramente convertida a L-arabinitol pela enzima aldose redutase (EC 1.1.1.21) e, após, a L-arabinitol-4-desidrogenase (EC 1.1.1.12) forma L-xilulose a partir do L-arabinitol. Em seguida, ocorrem duas reduções com consumo de NADPH, a L-xilulose, por meio da L-xilulosereducutase (EC 1.1.1.10), é transformada em xilitol, que, por meio da D-xilulosereducutase (EC 1.1.1.9) é modificado a D-xilulose. Esta, por sua vez, é fosforilada, pela xiluloquinase (EC 2.7.1.17), a D-xilulose-5-fosfato, que adentra na via das pentoses fosfato, assim como ocorre com a D-xilose (RICHARD et al., 2003).

1.2. Transporte de pentoses em leveduras

O transporte de moléculas através da membrana e os aspectos bioquímicos relacionados são parte fundamental da fisiologia de qualquer organismo. Os sistemas de transporte facilitado ou ativo descritos em procariotos e/ou eucariotos são: 1) difusão facilitada (transporte passivo, sem gasto de energia); 2) transportadores ativos usando energia de potencial eletroquímico, potencial redox ou luminosa, acoplado a íons ou pela hidrólise de ATP; 3) transporte de solutos (íons, prótons, pequenas moléculas hidrofóbicas) mediada por canais formadores de poros através da membrana (CONDE et al., 2010).

As proteínas envolvidas com sistema de transporte correspondem àquelas diretamente integradas como transportadores na membrana, àquelas associadas aos receptores extra citoplasmáticos (associados à face externa da membrana) e outras, fazendo parte do sistema regulatório do transporte ou do sistema de liberação de energia para o transporte (CONDE et al., 2010; VAN BELLE; ANDRÉ, 2001). Dos cerca de 5690 genes codificadores registrados em *Saccharomyces cerevisiae*, pelo menos 300 (5 % do proteoma) são estabelecidos ou preditos como transportadores de membrana (YTPdb: <http://homes.esat.kuleuven.be/ytpdb/>, <http://wardlab.cbs.umn.edu/yeast/>). As proteínas Hxt fazem parte da família

"sugarporter" dentro da Superfamília Facilitadora Principal (MFS). Em *S. cerevisiae*, vinte proteínas foram classificadas como proteínas de transporte de hexose, com proteínas Hxt diferentes sendo induzidas por transcrição dependendo da concentração de glicose disponível (REIS et al., 2013).

Outras bases de dados classificam transportadores ou proteínas de membrana de um único ou de um pequeno número de organismos, com *Yeast Transport Information* (YETI), *Yeast Membrane Protein Library* (YMPL) ou *Plant Membrane Protein Database* (Aramemnon). Por fim, as informações sobre transportadores de membrana também são acessíveis através de bases de dados que recolhem dados sobre os conjuntos completos de genes e proteínas de organismos específicos, por exemplo, *Saccharomyces Genome Database* (SGD) ou *Comprehensive Yeast Genome Database* (CYGD) (BROHÉE et al., 2010).

Mais de 14% do genoma de todos os organismos é relacionado de alguma forma à expressão de proteínas envolvidas com o sistema de transporte na membrana. A porcentagem estimada das proteínas específicas de transporte em relação ao proteoma de diferentes grupos de seres vivos é de 2 a 10% em bactéria, de 2 a 7 % em eucariotos e 2,7 % em humanos (BROHÉE et al., 2010).

Estudos de biologia sintética e avanços em engenharia metabólica têm sido divulgados envolvendo linhagem industrial da levedura *S. cerevisiae*. A maior parte dessas pesquisas foca na obtenção de cepas com habilidade de fermentar, além da glicose, a pentose, oriunda da sacarificação da biomassa lignocelulósica, no contexto do etanol de segunda geração. A maioria das abordagens de engenharia metabólica tem como alvo as vias celulares internas envolvendo substituições de enzimas de baixa capacidade por versões mais ativas ou ainda inserindo genes para desenvolvimento de novas vias ou otimização de outras pouco expressivas no microrganismo nativo (MATSUSHIKA; SAWAYAMA, 2010). Porém, as proteínas envolvidas no sistema de transporte transmembrana de pentoses ainda têm sido pouco exploradas, assim como, poucas ferramentas para modificá-las têm sido desenvolvidas (BETTIGA et al., 2009).

A taxa de transporte de moléculas através da membrana impõe limitações aos rendimentos de vias metabólicas mascarando sua otimização principalmente no catabolismo de açúcar exógeno (RUNQUIST; HAHN-HÄGERDAL; RÅDSTRÖM, 2010; VAN VLEET; JEFFRIES, 2009; YOUNG et al., 2012) gerando a premente necessidade de investigações nessa linha.

Entre os microrganismos, a *S. cerevisiae* por ser o mais explorado nesses estudos, é aqui tomada por referência. Essa levedura pode utilizar glicose em concentrações variando de frações micromolar a molar, com cinética multifásica que sugere uma combinação de sistemas de transporte ativo e difusão facilitada. Um componente linear de absorção de glicose tem indicado que uma absorção via canais de glicose também pode ser considerada. Esses canais, semelhantes às aquaporinas ou MIPs (*Major Intrinsic Proteins*) apresentam diferentes diâmetros e seletividade decorrentes de substituições de resíduos de amino ácidos das proteínas constituintes. Originalmente descritos como canais de água através da membrana (ISHIBASHI et al., 1994) e posteriormente, como transportadores de substâncias apolares e de baixa massa molar como uréia, glicerol, purinas, pirimidinas, CO₂, H₂O₂ e outros não-eletrólitos (GOMES et al., 2009; HAN et al., 1998; HUB; DE GROOT, 2006), passaram a ser considerados como possíveis transportadores de glicose num transporte linear até concentrações de até 100 mM (LALONDE, 1999).

Walsh et al. (1994) propuseram que uma cinética bifásica de absorção de glicose (maior e menor afinidade) que ocorre em *S. cerevisiae* é devido a um único transportador de funcionalidade incomum capaz de realizar transporte de dupla afinidade e cuja atividade é controlada pelas condições de crescimento. Maier et al. (2002) sugerem que alguns transportadores de açúcar em leveduras também podem se comportar como canais de membrana, uma vez que a ausência dessa absorção difusiva foi constatada em cepas mutantes sem os transportadores HXT1-7. Por outro lado, cepas mutantes que expressam individual e exclusivamente GAL2, HXT2, HXT3, HXT4, HXT6 e HXT7 como transportadores de hexose apresentaram cinética de primeira ordem para a absorção de glicose (CONDE et al., 2010).

Técnicas de engenharia metabólica têm sido intensamente aplicadas para melhoria da via das pentoses fosfato em linhagens industriais de *S. cerevisiae* visando a um consumo eficiente de pentoses presentes na fração hemicelulósica (HASUNUMA et al., 2014; RUNQUIST; HAHN-HÄGERDAL; RÅDSTRÖM, 2010) visto que esta levedura não cresce em xilose como única fonte de carbono, assim como, não fermenta esse açúcar a etanol (BETTIGA et al., 2009).

A levedura *S. cerevisiae* apesar de sua grande eficiência no transporte de glicose conforme mencionado acima apresenta absorção ineficiente da xilose, visto que esse processo usa os transportadores de hexose com baixa afinidade por pentoses e sofrem intensa repressão catabólica pela glicose (OZCAN; JOHNSTON,

1999). Além disso, as baixas atividades das enzimas envolvidas na via da pentose fosfato (xilose redutase – XR, xilitol desidrogenase - XDH, xilulo-quinase -XK, ribulose 5-fosfato 3-epimerase-RPE-, ribulose 5-fosfato isomerase-RPI, transquetolase-TKL e transaldolase-TAL) dificultam a aplicação dessa via em um processo industrial (MATSUSHIKA; SAWAYAMA, 2010).

Embora alguns trabalhos bem sucedidos de engenharia de *S. cerevisiae* com expressão de até seis enzimas metabólicas xilose-chave (XI, XK, TAL, TKL) (KUYPER et al., 2005) tenham elevado o consumo ou a fermentação de xilose por essa levedura, o transporte xilose precisa ainda ser otimizado para se obter um fluxo de açúcar suficiente para não limitar a via citoplasmática otimizada. Segundo Gárdonyi et al. (2003), o coeficiente de controle de fluxo para transporte de xilose naquela levedura fica entre 0,2 e 0,5 com concentrações variáveis do açúcar o que limita a via das pentoses fosfato otimizada. Essa cinética de transporte de xilose foi alterada por Kuyper et al. (2005) mudando o V_{max} de 15,8 para 32 mmol / (g de biomassa seca) / h e reduzindo K_M em 25 % (de 132 para 99 mmol).

Vários estudos têm-se centrado na melhoria do transporte de pentose em *S. cerevisiae* via expressão de um transportador heterólogo (DU; LI; ZHAO, 2010; LEANDRO; SPENCER-MARTINS; GONÇALVES, 2008; SALOHEIMO et al., 2007; WEIERSTALL; HOLLENBERG; BOLES, 1999) sendo publicadas várias ORFs (*open reading frame*) para proteínas envolvidas no transporte de xilose, porém, todas com uma afinidade mais elevada para a glicose ou seja, não apresentam especificidade para transporte de pentoses. Apenas um estudo revelou transportadores com uma afinidade mais acentuada para xilose, porém, quando expresso em *S. cerevisiae*, demonstra um baixo valor de V_{max} e essa ineficiência no transporte não permitiu o crescimento da levedura em pentose como fonte única de carbono (DU; LI; ZHAO, 2010).

Estudos funcionais de transportadores de açúcar heterólogos em *S. cerevisiae* avaliaram 26 proteínas conhecidas e preditas para transporte de monossacarídeo e apenas dez destas proteínas estavam relacionadas a especificidade para os açúcares individuais testados. A maioria destas proteínas de transporte exibiu uma ampla gama de afinidade por substratos e todos favoreceram a glicose, não sendo nenhum específico para a xilose. No entanto, algumas abordagens de engenharia de proteínas para os transportadores têm sido desenvolvidas (ABRAMSON et al., 2003; DANG et al., 2010; HUANG, 2003; YIN et

al., 2006) e outros envolvendo evolução dirigida. Os transportadores de xilose estudados em cepas de leveduras recombinantes incluem proteínas transporte do grupo hxt e gal2 (galactose metabolism). Embora essas proteínas de transporte sejam facilitadores de glicose também aceitam como substrato a xilose (CONDE et al., 2010; LEANDRO; SPENCER-MARTINS; GONÇALVES, 2008). Hamacher et al. (2002), Saloheimo et al. (2007) e Reis et al. (2013) demonstraram que as proteínas hxt4, hxt5, hxt7, hxt12, hxt13, hxt14, hxt15 e gal2 estão envolvidas no transporte de xilose.

Organismos conhecidos por assimilarem eficientemente xilose têm servido de fonte de genes para engenharia metabólica de *S. cerevisiae*. Transportadores heterólogos como xlt1 de *Trichoderma reesei* (SALOHEIMO et al., 2007), sut1 de *S. stipitis* (KATAHIRA et al., 2008), xut4-7 de *S. stipitis*, xylH de *Debaryomyces hansenii*, xut3 e xut1 de *S. stipitis* (YOUNG et al., 2011) gxf1 e gxs1 glicose/xilose de *Candida intermedia* (TANINO et al., 2012), xut4-7 de *S. stipitis* (YOUNG et al., 2014), MGT05196 de *Meyerozyma guilliermondii* (WANG et al., 2015) foram expressos nessa levedura.

Outros sistemas como TrXlt1p em *T. reesei*, Gxf1p e Gxs1p de *C. intermedia*, XylH de *D. hansenii* e Xut1p e Xut3p de *S. stipitis* foram descritos como envolvidos em transporte primário de xilose. Os transportadores An25p e Xyp29p de *Neurospora crassa* e *S. stipitis*, respectivamente, aumentaram a concentração de xilose intracelular nessas cepas, mas não sustentaram seu crescimento em xilose (WANG et al., 2013).

Associada à expressão heteróloga, a evolução dirigida de proteínas de transportes tem sido aplicada para aumentar a eficiência do transportador heterólogo de xilose em *S. cerevisiae* (BAYLEY; JAYASINGHE, 2004; SOBERÓN; SAIER, 2006). Genes *GXS1* de *C. intermedia* e *XUT3* *S. stipitis* geraram mutantes expressos em *S. cerevisiae* com até 70 % de aumento na assimilação de xilose (aumento de V_{max} e de afinidade). Adicionalmente, estes mutantes não mostraram aumento da taxa de crescimento em glicose, mas crescimento em outros açúcares como galactose, manose, frutose, ribose (YOUNG et al., 2014).

No contexto do discutido aqui pode-se inferir que, tanto as técnicas de engenharia metabólica alterando as vias de metabolismo de pentose, como a expressão de transportadores heterólogos e/ou alteração desses transportadores por meio de engenharia de proteínas só são possíveis diante do conhecimento do

que o universo natural dos microrganismos oferece como modelo para o avanço do conhecimento. Portanto, o isolamento e caracterização de cepas com capacidade natural de assimilar eficientemente a pentose, ou metabolizá-la para produção de compostos de interesse biotecnológico como etanol, xilitol, ácidos orgânicos ou outros e entender seus mecanismos de transporte do açúcar é sem dúvida uma etapa importante do processo e muito contribuirá para o avanço desse conhecimento.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. **Journal of biotechnology**, [s. l.], v. 156, n. 4, p. 286–301, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165611003166>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 367–370, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.016>>

BOLES, E.; HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 85–111, 1997. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00346.x>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

CONDE, A.; DIALLINAS, G.; CHAUMONT, F. F.; CHAVES, M.; GERÓS, H. Transporters, channels, or simple diffusion? Dogmas, atypical roles and complexity in transport systems. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 857–868, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272509003653>>. Acesso em: 1 ago. 2016.

DE SALES, B. B.; SCHEID, B.; GONÇALVES, D. L.; KNYCHALA, M. M.; MATSUSHIKA, A.; BON, E. P. S.; STAMBUK, B. U. Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing d-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 1973–1982, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10529-015-1893-2>>. Acesso em: 4 fev. 2020.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 220–225, 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022995002375>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

DU PREEZ, J. C.; PRIOR, B. A. A quantitative screening of some xylose-fermenting yeast isolates. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 241–246, 1985. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01042370>>. Acesso em: 18 mar. 2020.

FONSECA, C.; OLOFSSON, K.; FERREIRA, C.; RUNQUIST, D.; FONSECA, L. L.; HAHN-HÅGERDAL, B.; LIDÉN, G. The glucose/xylose facilitator Gxf1 from *Candida intermedia* expressed in a xylose-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* increases xylose uptake in SSCF of wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 48, n. 6–7, p. 518–525, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022911000378>>. Acesso em: 17 fev. 2017.

- FRANÇA, H. C. R. **Produção de ácido cítrico a partir do cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* em bagaço de cana-de-açúcar e fermentação etanólica do extrato fúngico**. 2016. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, [s. l.], 2016.
- GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 334–61, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98918&tool=pmcentrez&endertype=abstract>>. Acesso em: 25 nov. 2015.
- GARCÍA-FRAILE, P.; SILVA, L. R.; SÁNCHEZ-MÁRQUEZ, S.; VELÁZQUEZ, E.; RIVAS, R. Plums (*Prunus domestica* L.) are a good source of yeasts producing organic acids of industrial interest from glycerol. **Food chemistry**, [s. l.], v. 139, n. 1–4, p. 31–4, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613000125>>. Acesso em: 26 maio. 2015.
- GÁRDONYI, M. A.; ÖSTERBERG, M. A.; RODRIGUES, C.; SPENCER-MARTINS, I.; HAHN-HÄGERDAL, B. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 45–52, 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713560200137X>>. Acesso em: 15 nov. 2016.
- GERMEC, M.; KARHAN, M.; BIALKA, K. L.; DEMIRCI, A.; TURHAN, I. Mathematical modeling of lactic acid fermentation in bioreactor with carob extract. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 14, p. 254–263, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187881811830077X>>. Acesso em: 5 abr. 2018.
- GONÇALVES, D.; MATSUSHIKA, A.; DE SALES, B.; LAGOS, M.; GOSHIMA, T.; STAMBUK, B. Influence of individual HXT transporters in xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. **BMC Proceedings**, [s. l.], v. 8, n. Suppl 4, p. P209, 2014. Disponível em: <<http://bmcproc.biomedcentral.com/articles/10.1186/1753-6561-8-S4-P209>>. Acesso em: 27 jan. 2020.
- HALL, B. G.; ACAR, H.; NANDIPATI, A.; BARLOW, M. Growth rates made easy. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 232–238, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/mst187>>
- 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**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 117–123, 2007. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33846134053&partnerID=40&md5=ff90e605f1a7e93fd5340565295543b2>>
- JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 199, p. 103–112, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415014042>>. Acesso em: 5 set. 2017.
- KANG, S.; PARK, H.; LEE, J.; LEE, Y.; KWON, I.; MISAENGMUL, N. S. Citric acid

fermentation from mandarin orange peel by *Aspergillus niger*. **Sanop Misaengmul Hakhoechi**, [s. l.], v. 17, p. 510–518, 1989.

KAUTOLA, H.; LINKO, Y. Y. Production of fumaric acid with immobilized biocatalysts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 24–25, n. 1, p. 161–170, 1990. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02920242>>. Acesso em: 18 mar. 2020.

KIM, S. R.; HA, S. J.; WEI, N.; OH, E. J.; JIN, Y. S. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: A promising strategy for producing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 274–282, 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779912000157>>. Acesso em: 22 jan. 2020.

KIM, S. R.; PARK, Y.-C.; JIN, Y.-S.; SEO, J.-H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 851–861, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975013000633>>. Acesso em: 18 mar. 2020.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 10–26, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-004-1642-2>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

KURTZMAN, C. P.; SMILEY, M. J.; JOHNSON, C. J. Emendation of the Genus *Issatchenkia* Kudriavzev and Comparison of Species by Deoxyribonucleic Acid Reassociation, Mating Reaction, and Ascospore Ultrastructure. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 503–513, 1980. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-30-2-503>>. Acesso em: 31 out. 2016.

KWAK, S.; JO, J. H.; YUN, E. J.; JIN, Y. S.; SEO, J. H. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 271–283, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975018302015>>. Acesso em: 23 set. 2019.

LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: An overview. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 511–525, 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2009.00509.x>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

LEANDRO, M. J.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 395, n. 3, p. 543–549, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16402921>>. Acesso em: 22 mar. 2019.

LI, Q.; LI, C.; LI, P.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; ZHENG, X.; YANG, Q.; APALIYA, M. T.; BOATENG, N. A. S.; SUN, Y. The biocontrol effect of *Sporidiobolus pararoseus*

Y16 against postharvest diseases in table grapes caused by *Aspergillus niger* and the possible mechanisms involved. **Biological Control**, [s. l.], v. 113, p. 18–25, 2017.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 103–121, 1983. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260250109>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MARTINS, G. M. **Estudo do comportamento fisiológico de cepas de leveduras frente às condições do meio de cultivo visando processos de fermentação alcoólica**. 2015. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, [s. l.], 2015.

MARTINS, G. M.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; BEZZERRA-BUSSOLI, C.; PAGNOCCA, F. C.; BOSCOLO, M.; MONTEIRO, D. A.; SILVA, R. Da; GOMES, E. The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 162–168, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216303653?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 set. 2018.

MATTEY, M. The production of organic acids. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 1–2, p. 87–132, 1992. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388559209069189>>. Acesso em: 16 mar. 2020.

NAGAMORI, E.; FUJITA, H.; SHIMIZU, K.; TOKUHIRO, K.; ISHIDA, N.; TAKAHASHI, H. Fed-batch system for cultivating genetically engineered yeast that produces lactic acid via the fermentative promoter. **Journal of bioscience and bioengineering**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 193–5, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172312003647>>. Acesso em: 26 jul. 2015.

OZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 554–569, 1999. Disponível em: <<http://mmb.asm.org/content/63/3/554.figures-only>>. Acesso em: 8 dez. 2015.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852499001613#FIG1>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

PAN, X.; LIU, H.; LIU, J.; WANG, C.; WEN, J. Omics-based approaches reveal phospholipids remodeling of *Rhizopus oryzae* responding to furfural stress for fumaric acid-production from xylose. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 222, p. 24–32, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416313682>>. Acesso em: 16 mar. 2020.

PANESAR, P. S.; KAUR, S. Bioutilisation of agro-industrial waste for lactic acid production. **International Journal of Food Science & Technology**, [s. l.], v. 50, n. 10, p. n/a-n/a, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ijfs.12886>>.

Acesso em: 18 ago. 2015.

PEREIRA, I.; MADEIRA, A.; PRISTA, C.; LOUREIRO-DIAS, M. C.; LEANDRO, M. J. Characterization of new polyol/H+symporters in *Debaryomyces hansenii*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. e88180, 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0088180>>

RAMOS, J.; SYCHROVÁ, H.; KSCHISCHO, M. **Yeast Membrane Transport**. Cham Heidelberg New York Dordrecht London: Springer International Publishing, 2016. v. 892 Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25304-6>>. Acesso em: 3 out. 2018.

REIDER APEL, A.; OUELLET, M.; SZMIDT-MIDDLETON, H.; KEASLING, J. D.; MUKHOPADHYAY, A. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 19512, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep19512>>. Acesso em: 6 out. 2017.

REIS, T. F. Dos; MENINO, J. F.; BOM, V. L. P.; BROWN, N. A.; COLABARDINI, A. C.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H. S.; RODRIGUES, F.; GOLDMAN, G. H. Identification of glucose transporters in *aspergillus nidulans*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1–15, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081412>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RÅDSTRÖM, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, [s. l.], v. 3, p. 5, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2851583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 nov. 2015.

SEDLAK, M.; HO, N. W. Y. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. **Yeast**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 671–684, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/yea.1060>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

SHARMA, N. K.; BEHERA, S.; ARORA, R.; KUMAR, S.; SANI, R. K. Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 125, n. 3, p. 346–352, 2018. a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172317305431?via%3Dihub>>. Acesso em: 3 out. 2018.

SHARMA, S.; VARGHESE, E.; ARORA, A.; SINGH, K. N.; SINGH, S.; NAIN, L.; PAUL, D. Augmenting pentose utilization and ethanol production of native *Saccharomyces cerevisiae* LN using medium engineering and response surface methodology. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 6, n. SEP, 2018. b. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2018.00132/full>>. Acesso em: 27 jan. 2020.

SILVA-FERNANDES, T.; SANTOS, J. C.; HASMANN, F.; RODRIGUES, R. C. L. B.; IZARIO FILHO, H. J.; FELIPE, M. G. A. Biodegradable alternative for removing toxic compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for valorization in

biorefineries. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 243, p. 384–392, 2017.

TORRADO, A. M.; CORTÉS, S.; SALGADO, J. M.; MAX, B.; RODRÍGUEZ, N.; BIBBINS, B. P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 394–409, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822011000100049&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 16 mar. 2020.

TRAN, A. V.; CHAMBERS, R. P. Red oak wood derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia stipitis* CBS 5776. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 841–845, 1985. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01025567>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

VIANA, T.; LOUREIRO-DIAS, M. C.; LOUREIRO, V.; PRISTA, C. Peculiar H⁺ homeostasis of *Saccharomyces cerevisiae* during the late stages of wine fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 78, n. 17, p. 6302–6308, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752170>>. Acesso em: 12 abr. 2019.

WANG, C.; BAO, X.; LI, Y.; JIAO, C.; HOU, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; LIU, W.; SHEN, Y. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 30, p. 79–88, 2015.

WANG, C.; SHEN, Y.; HOU, J.; SUO, F.; BAO, X. An assay for functional xylose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 442, n. 2, p. 241–248, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326971300359X>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

WANG, S.; SUN, X.; YUAN, Q. Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: A review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 258, p. 302–309, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852418304127>>. Acesso em: 13 mar. 2020.

WANG, Y.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 10–18, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172314002199>>

WEI, L.; LIU, J.; QI, H.; WEN, J. Engineering *Scheffersomyces stipitis* for fumaric acid production from xylose. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 187, p. 246–254, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241500454X>>. Acesso em: 18 mar. 2020.

WEIERSTALL, T.; HOLLENBERG, C. P.; BOLES, E. Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 871–883, 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.1999.01224.x>>. Acesso em: 9 fev. 2017.

WOOD, I. P.; ELLISTON, A.; RYDEN, P.; BANCROFT, I.; ROBERTS, I. N.; WALDRON, K. W. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 44, n. 0, p. 117–121, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>>. Acesso em: 8 set. 2016.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 54–60, 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022910001997>>. Acesso em: 13 mar. 2020.

YOUNG, E. M.; COMER, A. D.; HUANG, H.; ALPER, H. S. A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 401–411, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717612000298>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

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**, Dipartimento Valorizzazione, Università di Torino, Via L. da Vinci 44, 10095, Grugliasco, Torino, Italy, v. 49, n. 6, p. 2722–2726, 2001. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034840223&partnerID=40&md5=7a12c46c3cccbf2d97157139d5d60274>>

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Conhecer o potencial de aplicação biotecnológica de três leveduras assimiladoras de pentoses isoladas do ambiente.

Objetivos Específicos

Revisar a bibliografia existente sobre metabolismo das pentoses e os mecanismos de transporte através da membrana citoplasmática de leveduras

Avaliar o potencial de crescimento em xilose e arabinose de cepas de leveduras isoladas do ambiente e mantidas em coleção de trabalho do laboratório;

Definir as condições físico-químicas e nutricionais que determinem o máximo de crescimento das cepas selecionadas quando utilizando as pentoses como única fonte de carbono;

Avaliar os efeitos de compostos fenólicos naturais e derivados de hidrólise da biomassa sobre o crescimento das cepas de leveduras;

Avaliar a capacidade das cepas de leveduras de crescer em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar;

Avaliar a produção de ácidos orgânicos pelas cepas selecionadas e definir as condições que elevem a produção dos mesmos;

Identificar os mecanismos de transporte para assimilação de pentoses;

Definir a cinética de transporte de xilose, arabinose e glicose pelas cepas.

CAPÍTULO 2 - Avaliação da capacidade das leveduras *Sporidiobolus pararoseus* U3 e *Pichia terricola* G20 de crescer utilizando xilose e arabinose em diferentes valores de pH, na presença de inibidores de crescimento microbiano e hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar

1. INTRODUÇÃO

Utilizar fontes renováveis como os materiais lignocelulósicos para gerar substrato para obtenção de bioprodutos tem se tornado cada vez mais atrativo financeiramente. As vantagens desse material são: proporcionar custo reduzido de matéria-prima, possuir diferentes tipos de açúcares e tornar possível a produção em escala industrial sem a dependência de safra, uma vez que estes materiais podem ser armazenados durante todo o ano. Contudo, nos tratamentos aplicados para a obtenção dos açúcares oriundos de resíduos lignocelulósicos ocorre liberação e/ou formação de compostos que são tóxicos para microrganismos inibindo-os parcial ou totalmente. Estes tratamentos podem ser processos químicos, físicos, físico-químicos e biológicos, os quais tornam o material lignocelulósico mais poroso ou rompe a estrutura da lignina e facilita a ação de enzimas para liberar diferentes açúcares utilizados nos bioprocessos (WANG; SUN; YUAN, 2018).

A quantidade e os tipos de compostos inibidores variam de cada material lignocelulósico e estes compostos podem ser divididos em grupos, classificados como furanos, ácidos fracos e compostos fenólicos. Fazem parte dos furanos o furfural e o hidroximetilfurfural, os quais resultam na degradação de pentoses e hexoses, respectivamente (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Os furanos são considerados os mais importantes dos compostos tóxicos, uma vez que afetam a viabilidade celular e a taxa de crescimento, resultando em aumento na fase *lag* e assim, tanto o rendimento quanto a produtividade são prejudicadas (XIMENES et al., 2011).

Para os ácidos fracos, ou ácidos alifáticos, são destacados os ácidos acético, fórmico e levulínico. O ácido acético é formado na quebra da hemicelulose, logo no início da desconstrução do material lignocelulósico e os ácidos fórmico e levulínico são produtos da degradação do hidroximetilfurfural. A toxicidade destes ácidos

ocorre de acordo com sua concentração e sua capacidade de entrar na célula. Uma vez que a quantidade de ácido que entra na célula é maior do que expelido o pH intracelular reduz constantemente ocasionando morte celular (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; WANG; SUN; YUAN, 2018).

Os compostos fenólicos aromáticos são encontrados na lignina, fração dos materiais lignocelulósicos que fornecem à planta estrutura e proteção, o que torna a lignina de difícil ruptura e quando quebrada libera os compostos aromáticos. Podem ser encontrados diferentes compostos fenólicos podendo ser álcoois, aldeídos e ácidos, se destacando os ácidos vanílico e 4-hidroximetilbenzóico. A forma como os compostos fenólicos agem na inibição do microrganismo não é totalmente elucidada (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000), entretanto sabe-se que estas substâncias causam danos na membrana celular. Os compostos fenólicos de baixa massa molecular são considerados mais prejudiciais, já que são capazes de se difundir mais rapidamente pela membrana celular acarretando na inibição da assimilação da glicose dentro da célula (WANG; SUN; YUAN, 2018)

Existem vários métodos que são utilizados para reduzir a concentração de alguns destes compostos inibidores, contudo esta etapa, que nem sempre tem alta eficácia, pode resultar em aumento de custos para a empresa, principalmente a nível industrial, e, em alguns casos, podem gerar mais resíduos, causando um problema ambiental e custos adicionais para as empresas (SILVA-FERNANDES et al., 2017). Portanto estudar as concentrações inibidoras destes compostos em diferentes microrganismos é de suma importância, uma vez que os materiais lignocelulósicos podem ser utilizados como matéria-prima para o desenvolvimento de diversos produtos para as indústrias alimentícia, farmacêutica e química.

Encontrada no solo, suco de frutas e água do mar a levedura *Pichia terricola* possui características similares às da levedura *P. kudriavzevii*. Assim como as leveduras *Hanseniaspora* sp., a *P. terricola* pode ser utilizada na produção de vinhos, já que produz compostos aromáticos que melhoram a qualidade sensorial desta bebida (KURTZMAN; SMILEY; JOHNSON, 1980).

A levedura *Sporidiobolus pararoseus* é um microrganismo capaz de produzir carotenóides como β -caroteno, γ -caroteno e torularodina (LI et al., 2017).

As cepas *P. terricola* G20 e *S. pararoseus* U3 foram isoladas em trabalhos anteriores e foi relatado a capacidade dessas leveduras de crescer utilizando pentoses. Portanto, o objetivo dessa etapa do trabalho foi avaliar a capacidade

dessas cepas de crescer utilizando xilose e arabinose em diferentes pH, na presença de inibidores do crescimento microbiano e hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Leveduras utilizadas

Foram utilizadas nos experimentos as leveduras *Sporidiobolus pararoseus* U3 e *Pichia. terricola* G20 (MARTINS et al., 2018) cuja identificação foi realizada por pesquisadores do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – Unesp Campus de Rio Claro, sob a coordenação do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca. Os marcadores genéticos utilizados para o sequenciamento foram as regiões D1/D2, que têm 570 pares de bases (pb) e codificam parte do RNA ribossômico da subunidade 18S (MARTINS, 2015).

A conservação das culturas puras foi feita por estocagem a -80 °C. Pérolas de vidro, lavadas com ácido nítrico e esterilizadas foram adicionadas à suspensão de leveduras, que foram mantidas, *overnight*, em glicerol 15 % a -20 °C e, então, transferidas para -80 °C.

2.2. Padronização do inóculo

As leveduras foram recuperadas da manutenção (estoque em -80 °C) em YEPD sólido (1 % extrato de levedura, 2 % peptona, 2 % glicose e 2 % ágar) a 30 °C. Após 12 h de incubação a biomassa do meio sólido foi transferida para 25 mL de meio YEPD líquido, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, a 30 °C e agitação de 150 rpm. Ao final do cultivo a biomassa foi lavada e ressuspensa em solução NaCl 0,9 %. Em seguida foram feitas diluições seriadas da cultura e realizadas medidas de Densidade Óptica (D.O.) a 600 nm. Paralelamente, as mesmas suspensões foram distribuídas em tubos (de massa conhecida) centrifugadas a 10000 x g, por 15 min., sendo o sobrenadante descartado, as células suspensas em água destilada e centrifugadas e descartado o sobrenadante novamente. Os tubos com a biomassa precipitada foram levados à estufa a 60 °C até peso constante. A partir desses dados, foi construída uma curva de calibração, plotando-se os valores de D.O representando a densidade celular e de biomassa seca (após subtração da massa dos tubos) correspondentes, obtendo-se uma equação de regressão linear. Esta equação foi utilizada para estimar a massa celular a ser utilizada como inóculo.

2.3. Avaliação dos efeitos do pH e temperatura sobre o crescimento das cepas em meio com glicose, xilose e arabinose

Cada cepa foi avaliada quanto a capacidade de crescimento em meio YEP (1 % extrato de levedura e 2 % peptona) contendo uma das fontes de carbono (2 % de glicose, xilose e arabinose) em pH 4,5, 6,5 e 8,5 a 29 e 32 °C. Foram utilizados H_3PO_4 1,0 mol L⁻¹ e Na_2CO_3 2,0 mol L⁻¹ para diminuir ou elevar o pH, respectivamente. Os cultivos ocorreram em placas de 96 poços e incubadas no espectrofotômetro SpectraMaxplus 384 (Molecular Devices) que controlou as temperaturas e realizou medidas de D.O. e agitação automaticamente a cada hora por 72 h. Cada poço continha 200 µL de meio com inóculo. O inóculo foi obtido conforme o item 2.2. O volume de inóculo em solução salina aplicado foi o suficiente para iniciar os cultivos em 0,1 de D.O.

2.4. Avaliação do crescimento e consumo de glicose, xilose e arabinose durante o cultivo

Os cultivos deste experimento ocorreram em 50 mL de meio em erlenmeyer de 125 mL, a 29 °C e em 150 rpm por 70 h. O meio de cultivo utilizado foi o YEP contendo 20 mg/mL de uma fonte de carbono (glicose, xilose e arabinose) e com pH 6,5. A obtenção de inóculo foi conforme descrito no item 2.2. Alíquotas foram tomadas nos períodos 0h, 5h, 10h, 20h, 30h, 40h, 50h, 60h e 70h para estimar biomassa através da regressão linear obtida, açúcar residual utilizando ácido 3,5 dinitrosalicílico (WOOD et al., 2012) e pH.

2.5. Teste de tolerância a compostos tóxicos

Os cultivos ocorreram em placas de 96 poços e incubadas no espectrofotômetro SpectraMaxplus 384 (Molecular Devices) que controlou a temperatura em 29 °C e realizou medidas de D.O automaticamente a cada hora por 72 h. Cada poço recebeu 200 µL de meio YEPD com inóculo e com o composto tóxico. Os compostos utilizados e as concentrações aplicadas são encontradas na Tabela 1. O inóculo foi obtido conforme o item 2.2. O volume de inóculo em solução salina aplicado foi o suficiente para iniciar os cultivos em 0,1 de D.O.

Tabela 1. Compostos inibidores analisados e a faixa de concentrações testadas.

Composto inibidor	Concentrações (g.L ⁻¹)			Referência
Vanilina	0,04	1	2	DELGENES et al. (1996)
Ácido acético	0,3	8	15	TRAN; CHAMBERS, (1985)
Ácido fórmico	0,1	2,5	5	KLINKE; THOMSEN; AHRING, (2004)
Ácido levulínico	0,4	10	20	KLINKE; THOMSEN; AHRING, (2004)
Ácido láctico	1	25	50	MAIORELLA et al. (1983)
Ácido 4-hidroxibenzóico	1	25	50	KLINKE; THOMSEN; AHRING, (2004)
Furfural	0,04	1	2	DELGENES et al. (1996)
Hidroximetilfurfural (HMF)	0,1	2,5	5	KLINKE; THOMSEN; AHRING, (2004)

Fonte: autoria própria

2.6. Avaliação da capacidade de crescimento das cepas em bagaço de cana-de-açúcar tratado e hidrolisado e xilana hidrolisada extraída de bagaço de cana-de-açúcar, antes e depois de tratamento com carvão ativado

2.6.1-Obtenção de xilose de bagaço da cana

O método de tratamento empregado no bagaço de cana-de-açúcar foi a ozonólise com posterior extração alcalina. O bagaço (25 g com 50 % de umidade) em coluna de vidro (500 x 27 mm) foi submetido a fluxo de ozônio de 32 mg/min por 1 h (com alternância de sentido do fluxo de ozônio a cada 30 min). Após o tratamento com ozônio foi adicionado ao bagaço 500 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e mantido em agitador magnético por 2 h. Decorrido o tempo, o bagaço foi lavado até que todo NaOH fosse eliminado e seco em estufa com circulação de ar a 60 °C.

Para a extração de xilana do bagaço de cana-de-açúcar 50 g de bagaço foi lavado três vezes com 150 mL de NaOH 13 % em banho-maria em 60 °C por 2h. Decorrido o tempo, sob o volume total foram adicionados 200 mL de água a 60 °C e filtrado nylon. O líquido filtrado teve seu pH ajustado em 5,0 com ácido acético. O volume foi reduzido a 1/3 e ressuspenso ao volume inicial com etanol 95 % e mantido overnight sob refrigeração. Decorrido o tempo, o líquido foi centrifugado (10000 g por 10 min), o precipitado foi ressuspenso em 20 mL de etanol 95 %, centrifugado e o precipitado foi liofilizado e estocado em -80 °C.

Tanto o bagaço tratado quanto a xilana extraída foram hidrolisados enzimaticamente por xilanases de *Thermoascus aurantiacus* da Família GH10.

Foram utilizadas enzimas de extrato bruto de *T. aurantiacus* e de enzimas obtidas por expressão heteróloga por *Pichia pastoris*. A carga de enzima utilizada foi de 40 U por grama de bagaço ou xilana a 40 °C, 170 rpm por 48 h.

Os materiais submetidos à inoculação e incubação das leveduras foram tratados com carvão ativado para descoloração e eliminação de lignina insolúvel e diminuir o poder inibidor de crescimento microbiano do hidrolisado. Foram utilizados 0,1 g de carvão para cada 1mL de material. Depois de 10 min foi retirado o carvão por centrifugação e a esterilização foi por meio de filtração em membrana de 0,22 µm.

2.6.2- Cultivo das leveduras no hidrolisado do bagaço de cana

As leveduras foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas no espectrofotômetro SpectraMaxplus 384 (Molecular Devices), a temperatura de 29 °C e as medidas de D.O. foram registradas automaticamente a cada hora por 72 h. Cada poço recebeu 200 µL dos materiais obtidos nos tratamentos.

Foram testados crescimento da *S. pararoseus* U3 e *P. terricola* G20 nos hidrolisados obtidos de bagaço não ozonizado, hidrolisado com enzima em extrato bruto (BIN EB); bagaço não ozonizado, hidrolisado com enzima em extrato bruto tratado com carvão (BIN EB carv.); bagaço não ozonizado, hidrolisado com enzima recombinante (BIN R); bagaço não ozonizado, hidrolisado com enzima recombinante tratado com carvão (BIN R carv.); bagaço ozonizado, hidrolisado com enzima em extrato bruto (BT EB); bagaço ozonizado, hidrolisado com enzima em extrato bruto tratado com carvão (BT EB carv.); bagaço ozonizado, hidrolisado com enzima recombinante (BT R); bagaço ozonizado, hidrolisado com enzima recombinante tratado com carvão (BT R carv.); xilana hidrolisada com enzima em extrato bruto (X EB); xilana hidrolisada com enzima em extrato bruto tratada com carvão (X EB carv.); xilana hidrolisada com enzima recombinante (X R); xilana hidrolisada com enzima recombinante tratada com carvão (X R carv.).

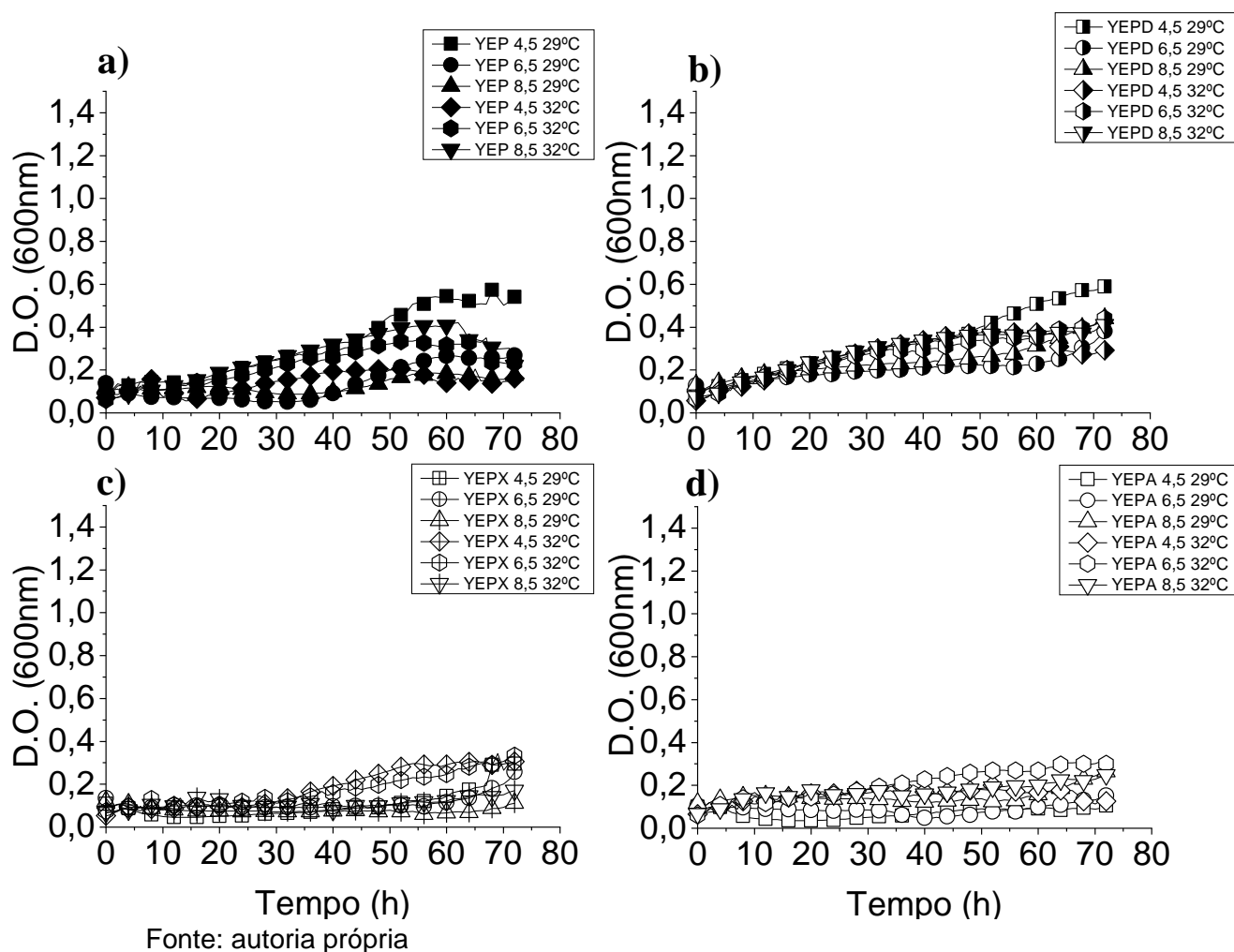
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação dos efeitos do pH e temperatura sobre o crescimento das cepas

Como é possível observar na Figura 1 b, em 29 °C, a cepa de *S. pararoseus* U3 apresentou maior crescimento em meio com glicose (YEPD) com pH 4,5, seguido do meio YEP (Figura 1a, sem adição de açúcar), no mesmo pH. Nos meios contendo xilose (YEPX) e arabinose (YEPA) como fonte de carbono (Figuras 1c e 1d) foi observado uma tendência dessa levedura desenvolver-se melhor em pH 6,5 a 32 °C quando as pentoses são fontes de carbono. No entanto, o crescimento foi menor do que em YEPD e também foi menor que no crescimento em YEP, que é o meio controle sem açúcar no qual se esperava a menor taxa de crescimento. No meio YEPX com pH 6,5 a 32 °C foi observado maior valor de D.O., entretanto valores próximos foram obtidos em YEPX pH 4,5, 6,5 a 29 °C e YEPX pH 4,5 a 32 °C (Figura 1c). Nos meios com YEPA o crescimento da levedura foi muito baixo em todos pHs e temperaturas testados, mas obteve-se o maior crescimento em cultivos em pH 6,5 a 32 °C (Figura 1 d). A levedura mostrou desempenho semelhante àquele em YEPA pH 8,5 a 29 e 32 °C. Os meios que apresentaram maior máxima de D.O foram YEPD com pH 4,5.

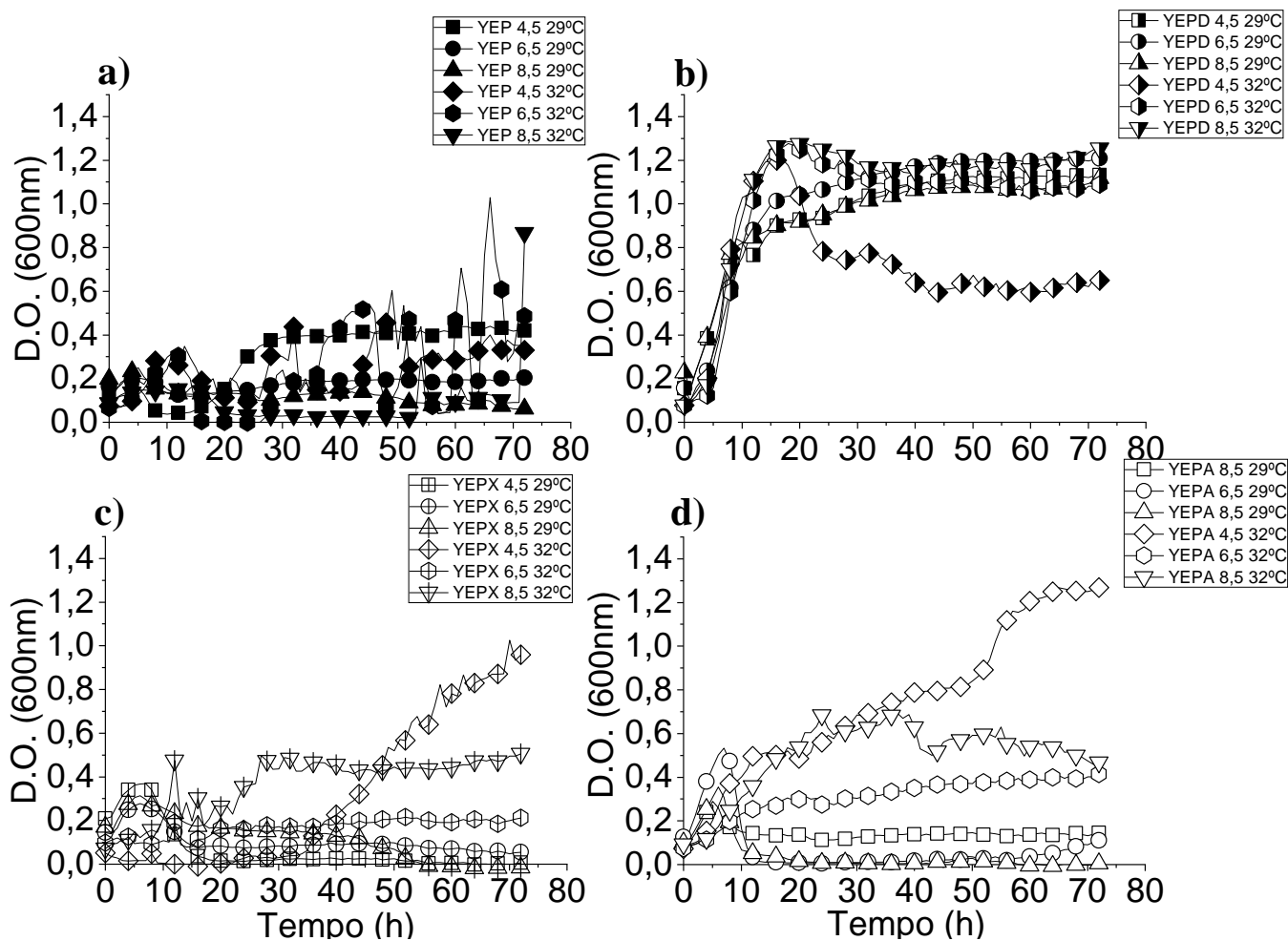
Dentre os meios contendo xilose e arabinose, não houve diferenças entre a biomassa produzida pela *S. pararoseus* U3 a pH 4,5 e pH 6,5. É possível que, caso o tempo de incubação tivesse sido maior, a densidade óptica dos meios com pentoses tivesse sido maior que a do meio controle (YEP), pois em alguns meios o crescimento não atingiu a fase estacionária.

Figura 1. Crescimento de *S. pararoseus* U3 em YEP (a), YEPD (b), YEPX (c), YEPA (d) com pHs 4,5, 6,5 e 8,5 nas temperaturas de 29 °C e 32 °C por 72 h em placas de 96 poços.



A levedura *P. terricola* G20 apresentou desempenho de crescimento melhor que a *S. pararoseus* U3 nas mesmas condições testadas. Os maiores crescimentos observados foram em YEPD, com maior valor de D.O. obtido no cultivo em YEPD pH 8,5 a 32 °C e com diferença considerável somente com a D.O. atingida em YEPD pH 4,5 a 32 °C (Figura 2 b). A médias realizadas do cultivo em YEP ficaram ruidosas (Figura 2 a), mas podemos observar crescimento com fase estacionária bem definida em pH 4,5 a 29 °C indicando que as pentoses são melhor assimiladas em pH 4,5. Em xilose e arabinose a *P. terricola* G20 apresentou crescimento satisfatório somente a 32 °C e principalmente em pH 4,5 para ambos as pentoses. O crescimento em YEPA pH 4,5 foi superior ao crescimento em YEPX nas mesmas condições, isso demonstra que dentre as leveduras testadas a cepa *P. terricola* G20 foi a melhor cresceu utilizando arabinose como fonte de carbono.

Figura 2. Crescimento de *P. terricola* G20 em YEP (a), YEPD (b), YEPX (c), YEPA (d) com pHs 4,5, 6,5 e 8,5 nas temperaturas de 29 °C e 32 °C por 72 h em placas de 96 poços.



Fonte: autoria própria

3.2. *Crescimento celular, assimilação de açúcar e alteração do pH do meio na fermentação da levedura S. pararoseus U3 e P. terricola G20.*

A *S. pararoseus* U3 foi a levedura com o menor consumo de pentoses, pois não foi capaz de esgotar a xilose e arabinose presente nos meios (Figuras 3 c e 3 d). Podemos observar também, através da Figura 3 b, que o consumo de glicose foi o mais lento, sendo esse açúcar totalmente consumido em 70 h de cultivo. Por outro lado, a *P. terricola* G20 consumiu toda glicose em 10 h (Figura 4 b).

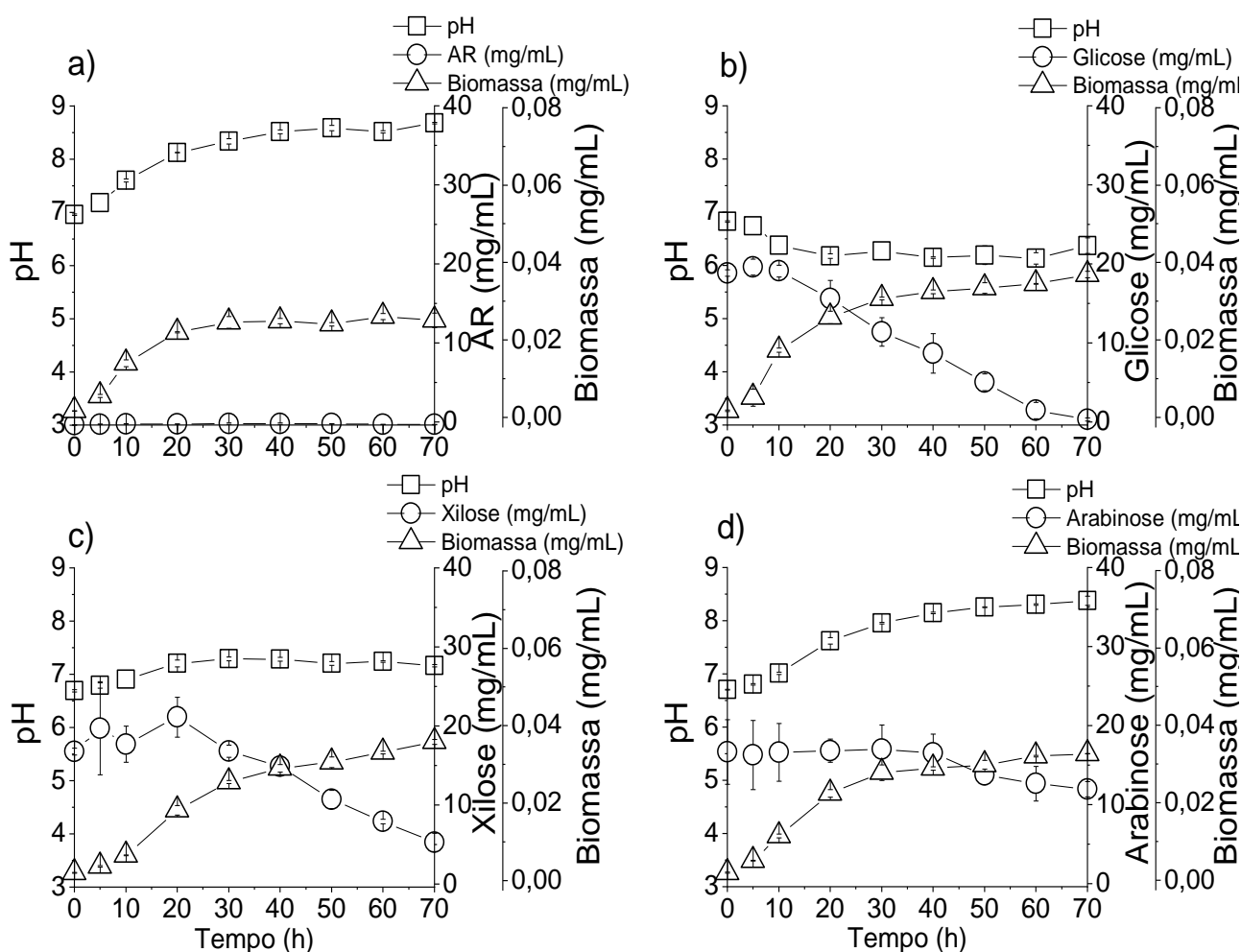
O baixo consumo de pentoses e o consumo lento de glicose pela *S. pararoseus* U3 pode estar relacionado ao fato dessa cepa atingir fase estacionária do crescimento ainda com fonte de carbono disponível. Em cerca de 30 h atinge-se a fase estacionária e no mesmo período ainda havia disponível até 50 % de açúcar adicionado (Figuras 3 b, 3 c e 3 d). No entanto, especificamente em meio com xilose, a fase estacionária é atingida mais lentamente e foi nesse cultivo que a biomassa obtida com uma pentose foi próxima a obtida por glicose (Figuras 1 b e 1 c), indicando potencial dessa levedura em crescer usando pentoses como fonte de carbono e energia.

O consumo de xilose pela *P. terricola* G20 (Figura 4 c) foi completo em 70 h, entretanto produziu quantidade muito menor de biomassa quando comparada ao cultivo em glicose (Figura 4 b) e arabinose (Figura 4 d).

Quanto à produção de biomassa, a *S. pararoseus* U3 apresentou formação de biomassa semelhantes nos meios YEPD, YEPX e YEPA (Figura 3). Em YEPA essa levedura apresentou o menor consumo de açúcar, assimilando em torno de 30 % da arabinose disponível, embora a produção de biomassa tenha sido similar àquela obtida em meio YEPX, onde foi consumido cerca de 70 % da xilose.

O desempenho do crescimento da *P. terricola* G20 foi melhor que o da *S. pararoseus* U3, inclusive em arabinose (Figura 4 d) onde se obteve crescimento celular maior que a *S. pararoseus* U3 utilizando glicose (Figura 3 b).

Figura 3. Crescimento celular, assimilação de açúcar e variação do pH do meio durante cultivo de *S. pararoseus* U3 em YEP (a), YEPD (b), YEPX (c) e YEPA (d) a 29 °C em 150 rpm e pH 6,5 por 72 h em frascos erlenmeyers.



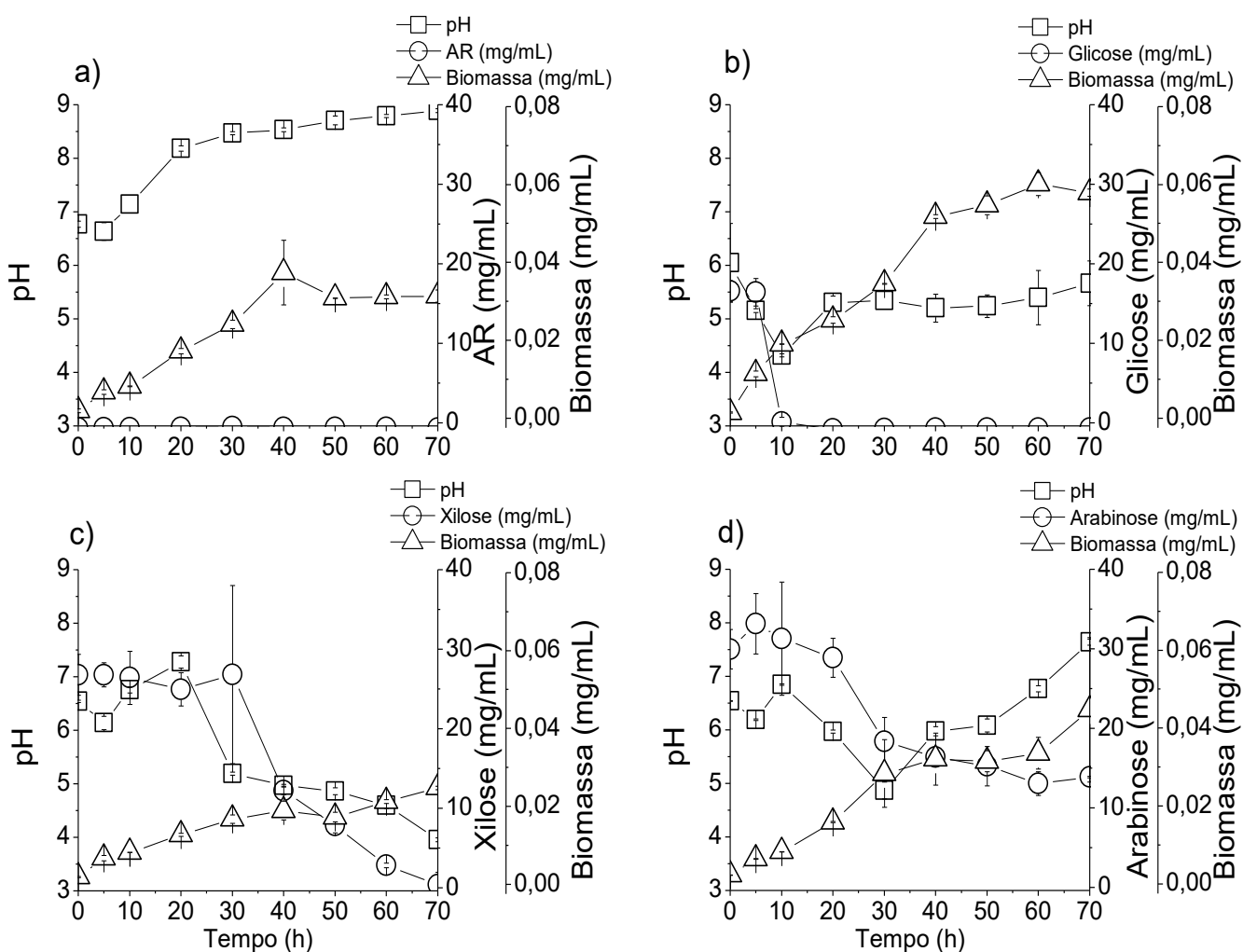
Fonte: autoria própria

No meio controle (YEP) houve crescimento celular em ambas as leveduras, como é possível observar na Figuras 3 a e 4 a, porém a quantidade de biomassa formada foi menor do que nos meios contendo açúcar. Em meio YEP o pH aumentou com o decorrer do cultivo, atingindo valor próximo de 8,5 com *S. pararoseus* U3 e atingindo valor próximo a 9,0 com *P. terricola* G20. Não foi estimado o consumo de açúcar, uma vez que não foi adicionado ao meio nenhum tipo de açúcar e não foram detectados açúcares redutores residuais no meio.

A *P. terricola* G20 no meio YEPD o pH sofreu uma queda enquanto o açúcar era consumido, o que sugere produção de compostos ácidos durante o consumo. Mesmo após o esgotamento do açúcar a levedura continua a crescer e o pH volta a subir. Observando a curva de crescimento é possível afirmar que há um crescimento

diaúxico, isso indica que houve o consumo desses ácidos e explica o aumento do pH. Em YEPX (Figura 4) o pH sofreu uma queda nas primeiras 5 h de fermentação, depois eleva até 20 h e então torna a cair, finalizando a fermentação com um pH menor que o inicial (pH 6,5). Algo semelhante ocorre em arabinose onde pH diminui nas primeiras 5 h de fermentação, entretanto sobe até 10 h, volta a cair até 30 h e torna a subir até o fim do cultivo, atingindo pH 7,7 (Figura 4 d).

Figura 4. Crescimento celular, assimilação de açúcar e variação do pH do meio durante o cultivo de *P. terricola* G20 em YEP (a), YEPD (b), YEPX (c) e YEPA (d) a 29 °C em 150 rpm e pH 6,5 por 72 h em frascos erlenmeyers.



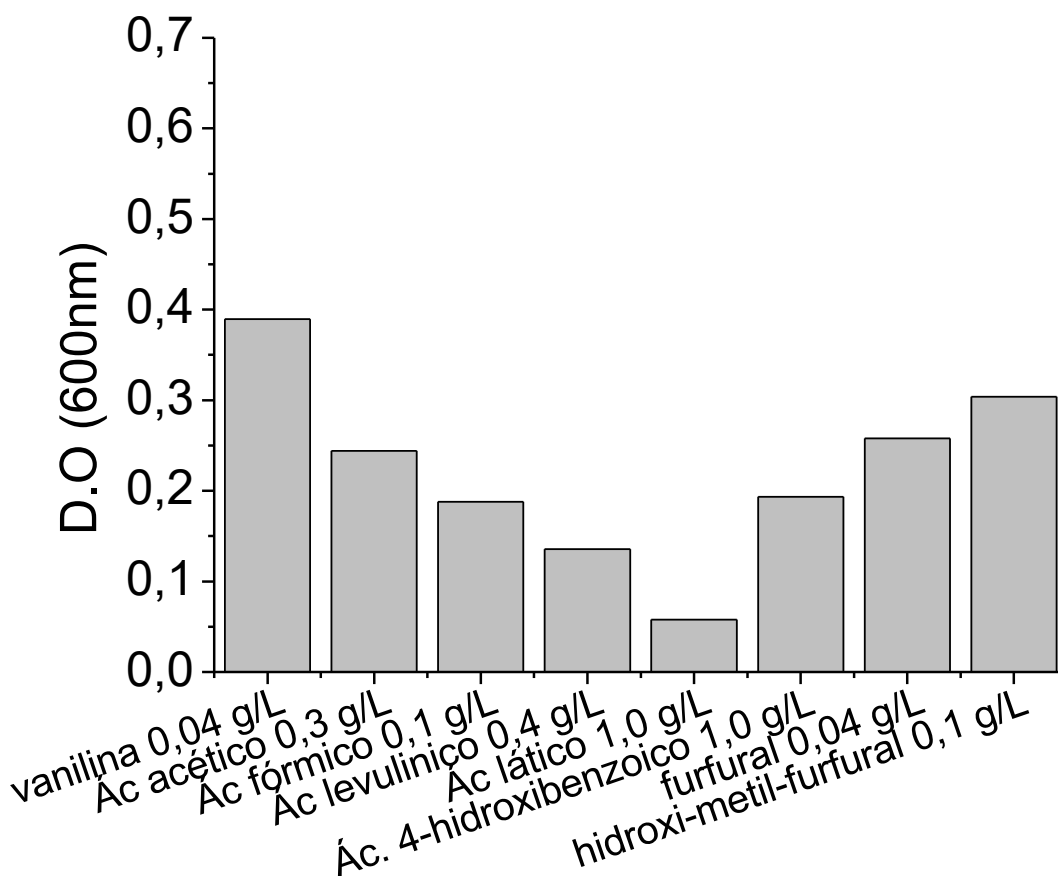
Fonte: autoria própria

3.3. Teste de tolerância das leveduras a compostos potencialmente tóxicos

Nos ensaios para avaliar a tolerância da levedura aos compostos considerados potencialmente tóxicos, foram escolhidos 8 compostos normalmente encontrados em hidrolisados de biomassa lignocelulósica, testados em três concentrações cada um (Tabela 1).

A *S. pararoseus* U3 cresceu na presença de todos os compostos em baixas concentrações conforme citado na Tabela 1. Como é possível observar na Figura 5, comparando as D.O., o ácido láctico exerceu maior efeito inibitório, seguido pelo ácido levulínico. O menor efeito inibitório foi exercido pela vanilina. Os ácidos 4-hidroxibenzoico e o fórmico exerceram efeitos inibitórios equivalentes, assim como o ácido acético e o furfural também foram equivalentes em seus efeitos.

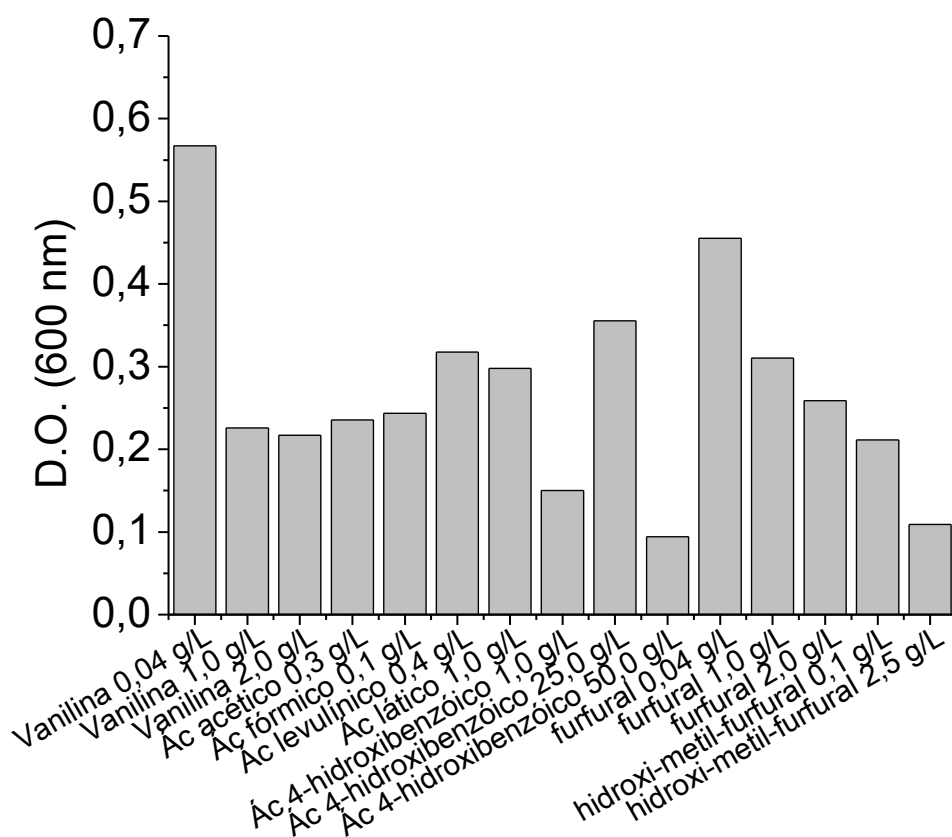
Figura 5. Densidade óptica máxima atingida por *S. pararoseus* U3 em cultura com compostos potencialmente tóxicos.



Fonte: autoria própria

A levedura *P. terricola* G20 foi capaz de crescer na presença dos 8 compostos tóxicos utilizados e em alguns deles na maior concentração testada (Figura 6), sendo esta levedura mais resistente a estes compostos que a *S. pararoseus* U3. Em vanilina, ácido hidroxibenzoico e furfural a *P. terricola* G20 foi capaz de crescer em todas as concentrações testadas (Tabela 1), em hidroximetil-furfural cresceu até 2,5 g/L e em ácido acético, fórmico, levulínico e lático cresceu somente até 0,3, 0,1, 0,4 e 1,0 g/L, respectivamente. Isso demonstra que essa levedura é mais resistente aos compostos fenólicos derivados de lignina, menos resistente a ácidos orgânicos de baixo peso molecular e com uma resistência intermediária aos furanos. O ácido hidroxibenzoico a 50 g/L seguido pelo hidroximetil-furfural a 2,5 g/L foram os que causaram maior inibição do crescimento e, assim como para a *S. pararoseus* U3, a vanilina 0,04 g/L inibiu menos e com destaque ao furfural 0,04 g/L onde a *P. terricola* G20 resistiu melhor depois da vanilina. Os ácidos orgânicos causaram efeitos inibitórios muito semelhantes.

Figura 6. Densidade óptica máxima atingida por *P. terricola* G20 em cultura com compostos potencialmente tóxicos.

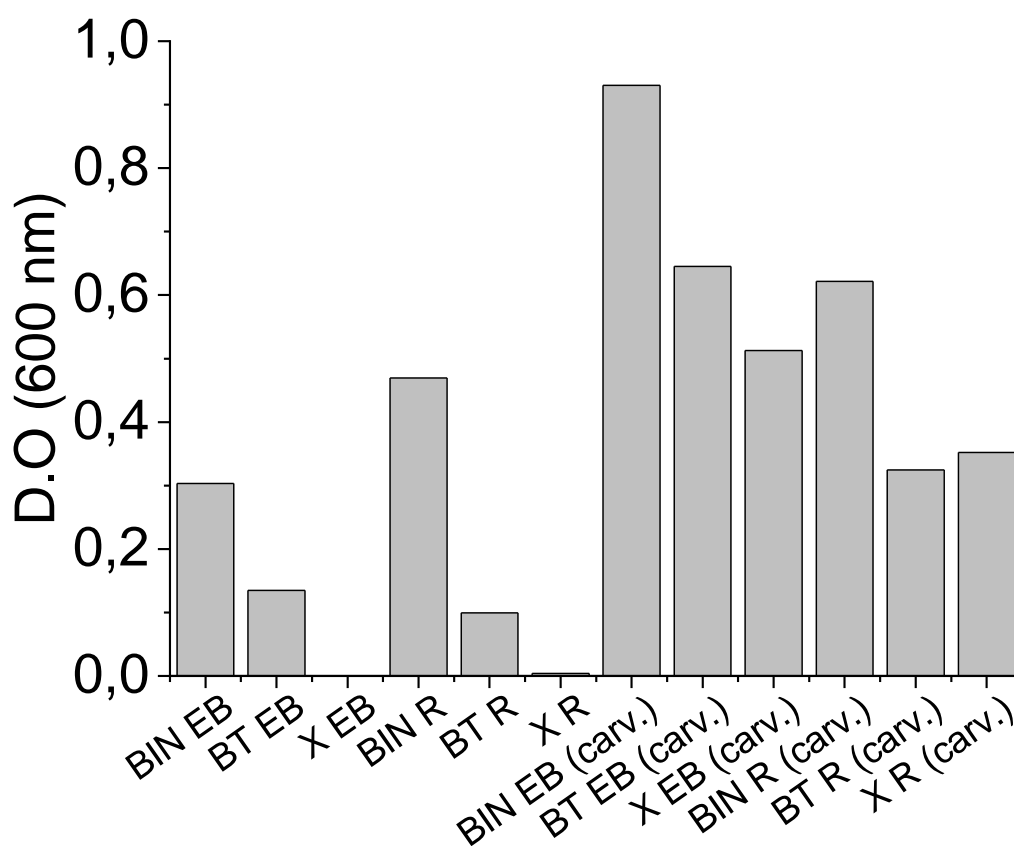


Fonte: autoria própria

3.4. Teste de crescimento das cepas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

A Figura 7 mostra que a *S. pararoseus* U3 foi capaz de crescer na maioria dos materiais hidrolisados, exceto em X EB. Os melhores crescimentos apresentados por essa levedura foram em materiais tratados com carvão. O tratamento com carvão ativado teve a finalidade de eliminar elementos inibidores de crescimento como aqueles utilizados nos testes de inibição por compostos potencialmente tóxicos. Como foi relatado a *S. pararoseus* U3 é inibida por tais elementos, portanto é possível afirmar que o tratamento com carvão foi satisfatório na redução da toxicidade de materiais tratados.

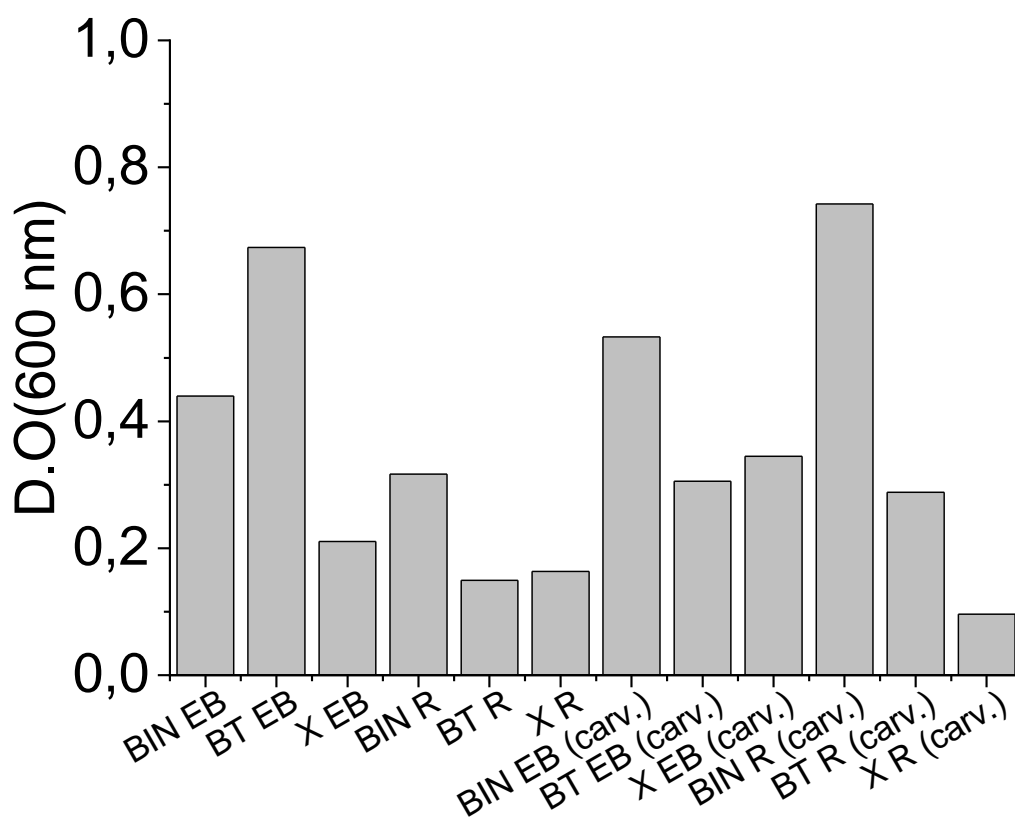
Figura 7. Teste de crescimento de *S. pararoseus* U3 em material tratado e hidrolisado: Máxima D.O. após 72 h de cultivo.



Fonte: autoria própria

A levedura *P. terricola* G20 foi capaz de crescer em todos os materiais testados. Como demonstrado nos testes de inibição por composto tóxico a *P. terricola* G20 tolerou muitos níveis de concentração destes compostos, isso explica ter crescido mais que *S. pararoseus* U3 (Figura 8) nos mesmos materiais hidrolisados.

Figura 8. Teste de crescimento de *P. terricola* G20 em material tratado e hidrolisado: Máxima D.O. após 72 h de cultivo.



Fonte: autoria própria

4. CONCLUSÕES

A levedura *S. pararoseus* U3 mostrou maior produção de biomassa a 29 °C em YEPX com pH 4,5, e a 32 °C no pH 6,5. A levedura *P. terricola* G20 obteve maior produção de biomassa a 29 °C em arabinose com pH 6,5 e a 32 °C no pH 4,5.

Em YEPA *S. pararoseus* U3 assimila em torno de 30 % da arabinose disponível e em meio YEPX consome cerca de 70 % da xilose. A levedura *P. terricola* G20 Em YEPA assimila em torno de 50 % da arabinose disponível e em meio YEPX consome 100 % da xilose em 70 h

As leveduras *S. pararoseus* U3 e *P. terricola* G20 são tolerantes aos compostos considerados potencialmente tóxicos. A maior inibição exercida sobre *S. pararoseus* U3 foi ácido láctico e menor efeito inibitório foi exercido pelo hidróxi-metil-furfural. A *P. terricola* G20 é mais resistente aos compostos fenólicos derivados de lignina, menos resistente a ácidos orgânicos de baixo peso molecular e com uma resistência intermediária aos furanos.

S. pararoseus U3 é capaz de crescer na maioria dos materiais hidrolisados, exceto em X EB. Enquanto a *P. terricola* G20 é capaz de crescer em todos os hidrolisados de bagaço testados.

O tratamento de hidrolisados com carvão ativado resulta em substratos menos agressivos as leveduras.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. **Journal of biotechnology**, [s. l.], v. 156, n. 4, p. 286–301, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165611003166>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 367–370, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.016>>

BOLES, E.; HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 85–111, 1997. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00346.x>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

CONDE, A.; DIALLINAS, G.; CHAUMONT, F. F.; CHAVES, M.; GERÓS, H. Transporters, channels, or simple diffusion? Dogmas, atypical roles and complexity in transport systems. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 857–868, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272509003653>>. Acesso em: 1 ago. 2016.

DE SALES, B. B.; SCHEID, B.; GONÇALVES, D. L.; KNYCHALA, M. M.; MATSUSHIKA, A.; BON, E. P. S.; STAMBUK, B. U. Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing d-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 1973–1982, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10529-015-1893-2>>. Acesso em: 4 fev. 2020.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 220–225, 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022995002375>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

DU PREEZ, J. C.; PRIOR, B. A. A quantitative screening of some xylose-fermenting yeast isolates. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 241–246, 1985. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01042370>>. Acesso em: 18 mar. 2020.

FONSECA, C.; OLOFSSON, K.; FERREIRA, C.; RUNQUIST, D.; FONSECA, L. L.; HAHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G. The glucose/xylose facilitator Gxf1 from *Candida intermedia* expressed in a xylose-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* increases xylose uptake in SSCF of wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 48, n. 6–7, p. 518–525, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022911000378>>. Acesso em: 17 fev. 2017.

FRANÇA, H. C. R. **Produção de ácido cítrico a partir do cultivo de**

Aspergillusniger e Trichoderma reesei em bagaço de cana-de-açúcar e fermentação etanólica do extrato fúngico. 2016. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, [s. l.], 2016.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 334–61, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98918&tool=pmcentrez&endertype=abstract>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

GARCÍA-FRAILE, P.; SILVA, L. R.; SÁNCHEZ-MÁRQUEZ, S.; VELÁZQUEZ, E.; RIVAS, R. Plums (*Prunus domestica* L.) are a good source of yeasts producing organic acids of industrial interest from glycerol. **Food chemistry**, [s. l.], v. 139, n. 1–4, p. 31–4, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613000125>>. Acesso em: 26 maio. 2015.

GÁRDONYI, M. A.; ÖSTERBERG, M. A.; RODRIGUES, C.; SPENCER-MARTINS, I.; HAHN-HÄGERDAL, B. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 45–52, 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713560200137X>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

GERMEC, M.; KARHAN, M.; BIALKA, K. L.; DEMIRCI, A.; TURHAN, I. Mathematical modeling of lactic acid fermentation in bioreactor with carob extract. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 14, p. 254–263, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187881811830077X>>. Acesso em: 5 abr. 2018.

GONÇALVES, D.; MATSUSHIKA, A.; DE SALES, B.; LAGOS, M.; GOSHIMA, T.; STAMBUK, B. Influence of individual HXT transporters in xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. **BMC Proceedings**, [s. l.], v. 8, n. Suppl 4, p. P209, 2014. Disponível em: <<http://bmcproc.biomedcentral.com/articles/10.1186/1753-6561-8-S4-P209>>. Acesso em: 27 jan. 2020.

HALL, B. G.; ACAR, H.; NANDIPATI, A.; BARLOW, M. Growth rates made easy. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 232–238, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/mst187>>

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**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 117–123, 2007. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33846134053&partnerID=40&md5=ff90e605f1a7e93fd5340565295543b2>>

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 199, p. 103–112, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415014042>>. Acesso em: 5 set. 2017.

KANG, S.; PARK, H.; LEE, J.; LEE, Y.; KWON, I.; MISAENGMUL, N. S. Citric acid fermentation from mandarin orange peel by *Aspergillus niger*. **Sanop Misaengmul**

Hakhoechi, [s. l.], v. 17, p. 510–518, 1989.

KAUTOLA, H.; LINKO, Y. Y. Production of fumaric acid with immobilized biocatalysts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 24–25, n. 1, p. 161–170, 1990. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02920242>>. Acesso em: 18 mar. 2020.

KIM, S. R.; HA, S. J.; WEI, N.; OH, E. J.; JIN, Y. S. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: A promising strategy for producing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 274–282, 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779912000157>>. Acesso em: 22 jan. 2020.

KIM, S. R.; PARK, Y.-C.; JIN, Y.-S.; SEO, J.-H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 851–861, 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975013000633>>. Acesso em: 18 mar. 2020.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 10–26, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-004-1642-2>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

KURTZMAN, C. P.; SMILEY, M. J.; JOHNSON, C. J. Emendation of the Genus *Issatchenkia* Kudriavzev and Comparison of Species by Deoxyribonucleic Acid Reassociation, Mating Reaction, and Ascospore Ultrastructure. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 503–513, 1980. Disponível em: <<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-30-2-503>>. Acesso em: 31 out. 2016.

KWAK, S.; JO, J. H.; YUN, E. J.; JIN, Y. S.; SEO, J. H. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 271–283, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975018302015>>. Acesso em: 23 set. 2019.

LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: An overview. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 511–525, 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2009.00509.x>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

LEANDRO, M. J.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 395, n. 3, p. 543–549, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16402921>>. Acesso em: 22 mar. 2019.

LI, Q.; LI, C.; LI, P.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; ZHENG, X.; YANG, Q.; APALIYA, M. T.; BOATENG, N. A. S.; SUN, Y. The biocontrol effect of *Sporidiobolus pararoseus* Y16 against postharvest diseases in table grapes caused by *Aspergillus niger* and

the possible mechanisms involved. **Biological Control**, [s. l.], v. 113, p. 18–25, 2017.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 103–121, 1983. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260250109>>. Acesso em: 10 fev. 2020.

MARTINS, G. M. **Estudo do comportamento fisiológico de cepas de leveduras frente às condições do meio de cultivo visando processos de fermentação alcoólica**. 2015. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, [s. l.], 2015.

MARTINS, G. M.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; BEZZERRA-BUSSOLI, C.; PAGNOCCA, F. C.; BOSCOLO, M.; MONTEIRO, D. A.; SILVA, R. Da; GOMES, E. The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 162–168, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216303653?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 set. 2018.

MATTEY, M. The production of organic acids. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 1–2, p. 87–132, 1992. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388559209069189>>. Acesso em: 16 mar. 2020.

NAGAMORI, E.; FUJITA, H.; SHIMIZU, K.; TOKUHIRO, K.; ISHIDA, N.; TAKAHASHI, H. Fed-batch system for cultivating genetically engineered yeast that produces lactic acid via the fermentative promoter. **Journal of bioscience and bioengineering**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 193–5, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172312003647>>. Acesso em: 26 jul. 2015.

OZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 554–569, 1999. Disponível em: <<http://mmbr.asm.org/content/63/3/554.figures-only>>. Acesso em: 8 dez. 2015.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852499001613#FIG1>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

PAN, X.; LIU, H.; LIU, J.; WANG, C.; WEN, J. Omics-based approaches reveal phospholipids remodeling of *Rhizopus oryzae* responding to furfural stress for fumaric acid-production from xylose. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 222, p. 24–32, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416313682>>. Acesso em: 16 mar. 2020.

PANESAR, P. S.; KAUR, S. Bioutilisation of agro-industrial waste for lactic acid production. **International Journal of Food Science & Technology**, [s. l.], v. 50, n. 10, p. n/a-n/a, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ijfs.12886>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

PEREIRA, I.; MADEIRA, A.; PRISTA, C.; LOUREIRO-DIAS, M. C.; LEANDRO, M. J. Characterization of new polyol/H+symporters in *Debaryomyces hansenii*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. e88180, 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0088180>>

RAMOS, J.; SYCHROVÁ, H.; KSCHISCHO, M. **Yeast Membrane Transport**. Cham Heidelberg New York Dordrecht London: Springer International Publishing, 2016. v. 892 Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25304-6>>. Acesso em: 3 out. 2018.

REIDER APEL, A.; OUELLET, M.; SZMIDT-MIDDLETON, H.; KEASLING, J. D.; MUKHOPADHYAY, A. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 19512, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep19512>>. Acesso em: 6 out. 2017.

REIS, T. F. Dos; MENINO, J. F.; BOM, V. L. P.; BROWN, N. A.; COLABARDINI, A. C.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H. S.; RODRIGUES, F.; GOLDMAN, G. H. Identification of glucose transporters in *aspergillus nidulans*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1–15, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081412>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RÅDSTRÖM, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, [s. l.], v. 3, p. 5, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2851583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 nov. 2015.

SEDLAK, M.; HO, N. W. Y. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. **Yeast**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 671–684, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/yea.1060>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

SHARMA, N. K.; BEHERA, S.; ARORA, R.; KUMAR, S.; SANI, R. K. Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 125, n. 3, p. 346–352, 2018. a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172317305431?via%3Dihub>>. Acesso em: 3 out. 2018.

SHARMA, S.; VARGHESE, E.; ARORA, A.; SINGH, K. N.; SINGH, S.; NAIN, L.; PAUL, D. Augmenting pentose utilization and ethanol production of native *Saccharomyces cerevisiae* LN using medium engineering and response surface methodology. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 6, n. SEP, 2018. b. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2018.00132/full>>. Acesso em: 27 jan. 2020.

SILVA-FERNANDES, T.; SANTOS, J. C.; HASMANN, F.; RODRIGUES, R. C. L. B.; IZARIO FILHO, H. J.; FELIPE, M. G. A. Biodegradable alternative for removing toxic compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for valorization in biorefineries. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 243, p. 384–392, 2017.

- TORRADO, A. M.; CORTÉS, S.; SALGADO, J. M.; MAX, B.; RODRÍGUEZ, N.; BIBBINS, B. P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 394–409, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822011000100049&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 16 mar. 2020.
- TRAN, A. V.; CHAMBERS, R. P. Red oak wood derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia stipitis* CBS 5776. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 841–845, 1985. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01025567>>. Acesso em: 10 fev. 2020.
- VIANA, T.; LOUREIRO-DIAS, M. C.; LOUREIRO, V.; PRISTA, C. Peculiar H⁺ homeostasis of *Saccharomyces cerevisiae* during the late stages of wine fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 78, n. 17, p. 6302–6308, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752170>>. Acesso em: 12 abr. 2019.
- WANG, C.; BAO, X.; LI, Y.; JIAO, C.; HOU, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; LIU, W.; SHEN, Y. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 30, p. 79–88, 2015.
- WANG, C.; SHEN, Y.; HOU, J.; SUO, F.; BAO, X. An assay for functional xylose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 442, n. 2, p. 241–248, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326971300359X>>. Acesso em: 21 fev. 2017.
- WANG, S.; SUN, X.; YUAN, Q. Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: A review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 258, p. 302–309, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852418304127>>. Acesso em: 13 mar. 2020.
- WANG, Y.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 10–18, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172314002199>>
- WEI, L.; LIU, J.; QI, H.; WEN, J. Engineering *Scheffersomyces stipitis* for fumaric acid production from xylose. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 187, p. 246–254, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241500454X>>. Acesso em: 18 mar. 2020.
- WEIERSTALL, T.; HOLLENBERG, C. P.; BOLES, E. Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 871–883, 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.1999.01224.x>>. Acesso em: 9 fev. 2017.
- WOOD, I. P.; ELLISTON, A.; RYDEN, P.; BANCROFT, I.; ROBERTS, I. N.; WALDRON, K. W. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates:

Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 44, n. 0, p. 117–121, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>>. Acesso em: 8 set. 2016.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 54–60, 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022910001997>>. Acesso em: 13 mar. 2020.

YOUNG, E. M.; COMER, A. D.; HUANG, H.; ALPER, H. S. A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 401–411, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717612000298>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

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**, Dipartimento Valorizzazione, Università di Torino, Via L. da Vinci 44, 10095, Grugliasco, Torino, Italy, v. 49, n. 6, p. 2722–2726, 2001. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034840223&partnerID=40&md5=7a12c46c3cccbf2d97157139d5d60274>>

CAPÍTULO 3 - Avaliação das condições de crescimento e produção de ácidos orgânicos pela levedura *Metschnikowia koreensis* G18 em meio com xilose como fonte de carbono

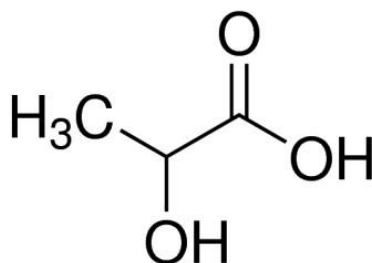
1. INTRODUÇÃO

Os ácidos orgânicos são compostos biológicos que podem ser obtidos por extração a partir de fontes naturais ou produzidos por microrganismos em processos fermentativos. Os ácidos mais comuns e de grande inserção no mercado são os ácidos láctico, cítrico e fumárico.

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico, $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$) (Figura 1) é utilizado pelas indústrias têxtil, farmacêuticas, alimentos, química, cosméticos e de couro. Na natureza encontra-se em dois isômeros óticos, o D (-) ácido láctico e L (+) ácido láctico, sendo o último preferido pela indústria farmacêutica e de alimentos devido ao fato de que, em altas concentrações, o D (-) ácido láctico pode causar danos à saúde humana (PANESAR; KAUR, 2015).

O ácido láctico pode ser obtido por síntese química, mas com a desvantagem de se obter uma mistura racêmica de isômeros DL ácido láctico (GERMEC et al., 2018). Por outro lado, a produção por fermentação microbiana apresenta a vantagem da especificidade ótica, além de condições brandas de produção como baixa temperatura, baixo consumo de energia e ainda, permitir a utilização de fontes renováveis como substrato (WANG; TASHIRO; SONOMOTO, 2015).

Figura 1. Estrutura química do ácido láctico.



Fonte: Sigma-Aldrich, Inc. Web site

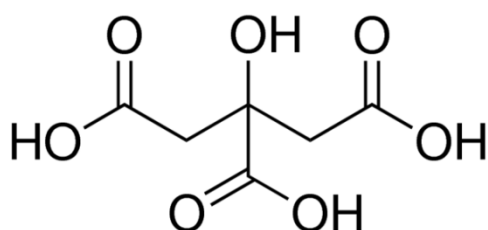
Há alguns anos aumentou o interesse em materiais de fontes renováveis, como, por exemplo, plásticos biodegradáveis. Paralelamente o mercado de ácido

lático vem-se expandindo, pois esse ácido é monômero do ácido polilático (APL), que é um polímero biodegradável. Em 2012 cerca de 260 toneladas de ácido lático foram produzidas em todo mundo (GERMEC et al., 2018). APL é usado para produção de produtos com aplicações médicas e polímeros biodegradáveis, que podem substituir plásticos sintéticos derivados do petróleo (ILMÉN et al., 2007; NAGAMORI et al., 2013; PANESAR; KAUR, 2015).

A biomassa lignocelulósica, resíduo de atividades agrícolas e agroindustriais, representa uma matéria-prima de baixo custo, encontra-se em abundância e pode ser aplicada em processos fermentativos de larga escala mediante separação dos açúcares presentes na celulose e hemicelulose (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011).

O ácido cítrico (Figura 2) é um ácido tricarboxílico naturalmente presente em frutas ácidas principalmente em cítricos. É um ácido versátil empregado na indústria farmacêutica, de alimentos, cosméticos e produtos de limpeza (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013). Foi isolado pela primeira vez em 1784 do suco de limão por Scheele. A extração do ácido cítrico continuou até o ano de 1919, sendo substituído por processo fermentativo com o fungo *Aspergillus niger*. A partir daí a produção deste ácido por rotas microbiológicas se tornaram comuns com uso de diferentes microrganismos como agentes fermentadores como fungos dos gêneros *Penicillium*, *Mucor*, *Ustilina*, *Botrytis*, *Ascochyta*, *Absidia*, *Talaromyces*, *Acremonium* e *Eupenicillium* (KANG et al., 1989; MATTEY, 1992; TORRADO et al., 2011). Entre gêneros de leveduras pode-se citar *Pichia*, *Debaromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Yarrowia* e *Candida* (FRANÇA, 2016).

Figura 2. Estrutura química do ácido cítrico.



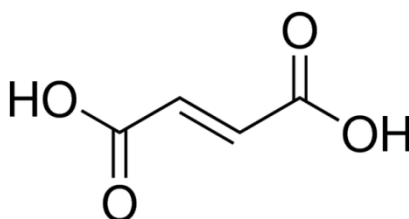
Fonte: Sigma-Aldrich, Inc. Web site

O ácido cítrico é utilizado em vários setores a nível industrial principalmente na indústria de alimentos, o qual é empregado 75 % da quota do mercado,

empregado como acidulante, flavorizante e antioxidante. Na indústria farmacêutica e de produtos de limpeza o ácido cítrico é utilizado como antioxidante, sequestrante e tampão (MATTEY, 1992).

O ácido fumárico (Figura 3) é um ácido dicarboxílico utilizado na indústria farmacêutica, de alimentos e química. Este ácido é obtido do petróleo, entretanto a obtenção por vias biológicas tem ganhado interesse por questões energéticas e ambientais. A espécie de microrganismo mais utilizado para produção de ácido fumárico é o *Rhizopus*, contudo as características morfológicas e de crescimento deste fungo filamentosos é complexa e limita a produção em escala industrial. Por isso leveduras tem atraído atenção para produção de ácido fumárico (WEI et al., 2015).

Figura 3. Estrutura química do ácido fumárico.



Fonte: Sigma-Aldrich, Inc. Web site

A produção de ácidos orgânicos a partir de xilose foi descrita por Kautola; Linko (1990) que utilizaram células de livres e imobilizadas de *Rhizopus arrhizus* para produzir ácido fumárico. A produção de ácido fumárico pode ser realizada com a xilose oriunda da hemicelulose como apresentado por Pan et al. (2016).

Entretanto, compostos considerados inibidores microbianos e que podem ser gerados durante o processo de desconstrução da estrutura da lignocelulose podem interferir no processo fermentativo de produção dos ácidos orgânicos conforme constatado por Pan et al. (2016), que observaram a interferência do furfural na produção de ácido fumárico por *Rhizopus oryzae*.

No presente trabalho estudou-se a produção de ácidos orgânicos pela levedura *Metschnikowia koreensis* G18 a partir de xilose, além da avaliação de alguns parâmetros químicos e físico químicos que interferem nesse processo como pH, temperatura e fonte de nitrogênio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Levedura utilizada.

Foi utilizada nos experimentos a cepa *Metschnikowia koreensis* G18, isolada em trabalho prévio (MARTINS et al., 2018) cuja identificação foi realizada por pesquisadores do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – Unesp Campus de Rio Claro, sob a coordenação do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca. Os marcadores genéticos utilizados para o sequenciamento foram as regiões D1/D2, que têm 570 pares de bases (pb) e codificam parte do RNA ribossômico da subunidade 18S (MARTINS, 2015).

A conservação das culturas puras foi feita por estocagem a -80 °C. Pérolas de vidro, lavadas com ácido nítrico e esterilizadas foram adicionadas à suspensão de leveduras, que foram mantidas, *overnight*, em glicerol 15 % a -20 °C e, então, transferidas para -80 °C.

2.2. Padronização do inóculo.

A *M. koreensis* G18 foi recuperada da manutenção em YEPD sólido (1 % extrato de levedura, 2 % peptona, 2 % glicose e 2 % ágar) a 30 °C. Após 12 h de incubação a biomassa do meio sólido foi transferida para 25 mL de meio YEPD líquido, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, a 30 °C e agitação de 150 rpm. Ao final do cultivo a biomassa foi lava e ressuspensa em solução NaCl 0,9 %. Em seguida foram feitas diluições seriadas da cultura e realizado medidas de Densidade Óptica (D.O.) a 600 nm. Paralelamente, as mesmas suspensões foram distribuídas em tubos (de massa conhecida) centrifugadas a 10000 x g, por 15 min., sendo o sobrenadante descartado, as células suspensas em água destilada e centrifugadas e descartado o sobrenadante novamente. Os tubos com a biomassa precipitada foram levados à estufa a 60 °C até peso constante. A partir desses dados, foi construída uma curva de calibração, plotando-se os valores de D.O. representando a densidade celular e de biomassa seca (após subtração da massa dos tubos) correspondentes, obtendo-se uma equação de regressão linear. Esta equação foi utilizada para estimar a massa celular a ser utilizada como inóculo.

2.3. Avaliação dos efeitos do pH e temperatura sobre o crescimento celular em meio com glicose, xilose e arabinose.

A *M. koreensis* G18 foi avaliada quanto a sua capacidade de crescimento em meio YEP (1 % extrato de levedura e 2 % peptona) contendo uma das fontes de carbono (2% de glicose, xilose e arabinose) em pH 4,5, 6,5 e 8,5 a 29 e 32 °C. Foram utilizados H_3PO_4 1,0 mol.L⁻¹ e Na_2CO_3 2,0 mol.L⁻¹ para diminuir ou elevar o pH, respectivamente. Os cultivos ocorreram em placas de 96 poços e incubadas no espectrofotômetro SpectraMaxplus 384 (Molecular Devices) que controlou as temperaturas e realizou medidas de D.O. automaticamente a cada hora por 72 h. Cada poço recebeu 200 µL de meio com inóculo. O inóculo foi obtido conforme o item 2.2. O volume de inóculo em solução salina aplicado foi o suficiente para iniciar os cultivos em 0,1 de D.O.

2.4. Avaliação do efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre o crescimento celular e em meio com glicose e xilose.

A *M. koreensis* G18 foi avaliada quanto a sua capacidade de crescimento em YNB (meio sintético com vitaminas sem aminoácidos e sulfato de amônio - Sigma-Aldrich®) contendo uma das fontes de carbono (2 % de glicose ou xilose) a 29 °C. Foram testados como fonte de nitrogênio Nitrato de sódio (NaNO_3), Sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e ureia em concentrações de nitrogênio de 1, 2, 4, 6 e 10 g/L. Os cultivos ocorreram em placas de 96 poços e incubadas no espectrofotômetro SpectraMaxplus 384 (Molecular Devices) que controlou as temperaturas e realizou medidas de D.O. automaticamente a cada hora por 72 h. Cada poço recebeu 200 µL de meio com inóculo. O inóculo foi obtido conforme o item 2.2. O volume de inóculo em solução salina aplicado foi o suficiente para iniciar os cultivos em 0,1 de D.O.

2.5. Avaliação do crescimento e consumo de glicose e xilose durante o cultivo.

Os cultivos deste experimento ocorreram em 50 mL de meio em frascos erlenmeyer de 125 mL, a 29 °C e em 150 rpm por 70 h. O meio de cultivo utilizado foi o YEP contendo 20 mg/mL de uma fonte de carbono (glicose, xilose e arabinose) e pH 6,5. A obtenção de inóculo foi conforme descrito no item 2.2. Alíquotas foram retiradas nos períodos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 h para estimar biomassa

através da regressão linear obtida, açúcar residual utilizando ácido 3,5 dinitrosalicílico (WOOD et al., 2012) e pH.

2.6. Identificação e quantificação de ácidos orgânicos.

Os ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia líquida. As culturas da levedura foram centrifugadas a 10000 x g por 5 min a 10 °C, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm e 20 µL foi aplicado no cromatógrafo (GARCÍA-FRAILE et al., 2013). Foi utilizado um cromatógrafo Perkin Elmer modelo Flexar, equipado com bomba binária, amostrador automático, forno de coluna e um detector UV/VIS. A coluna utilizada foi a Bio-RadAminex HPX-87H (300 x 7,1 mm) mantida a temperatura de 65 °C. A eluição foi isocrática, com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ de ácido sulfúrico (0,0065 mol.L⁻¹) e com detector ajustado em 210 nm de comprimento de onda (ZEPPA; CONTERNO; GERBI, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

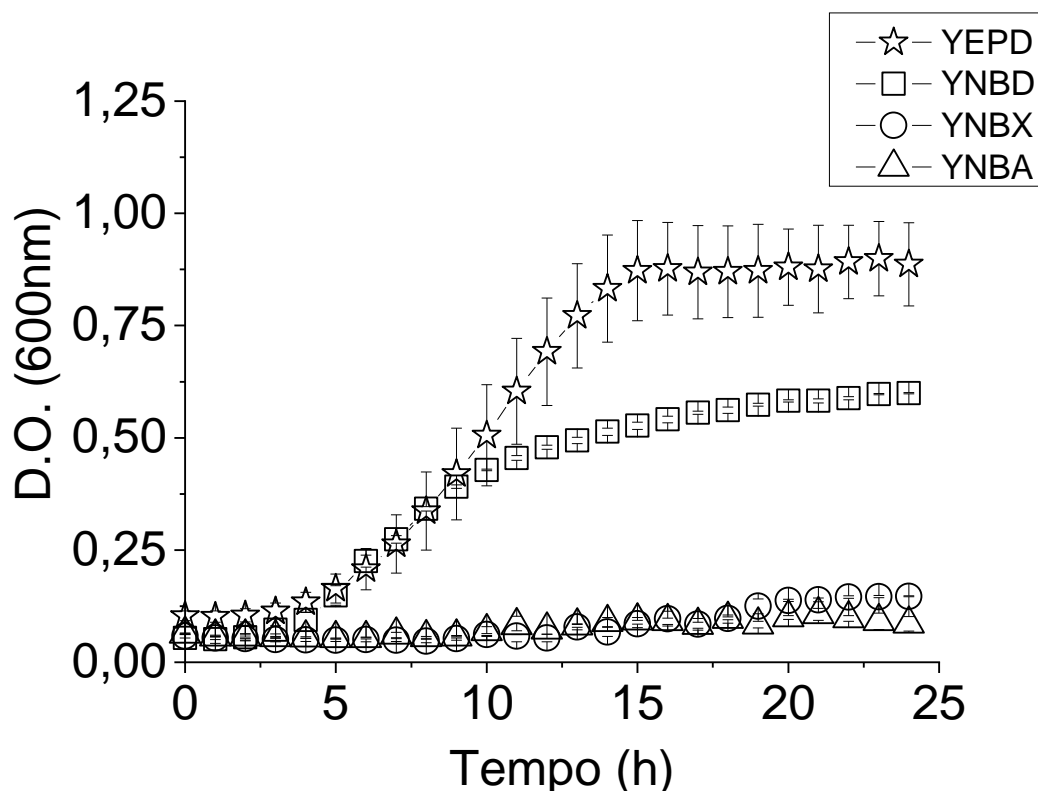
3.1. Crescimento em diferentes meios de cultura base de nitrogênio com diferentes fontes de carbono.

Esta etapa teve como objetivo verificar o crescimento, através da medida da D.O., da *M. koreensis* G18 em dois meios de cultura base de nitrogênio, o YEP (meio complexo com extrato de levedura e peptona) e o YNB (meio sintético com vitaminas, aminoácidos e sulfato de amônio - Sigma-Aldrich®). As fontes de carbono utilizadas foram dextrose (D), xilose (X) e arabinose (A). O maior crescimento celular obtido foi em YEP com dextrose (YEPD) e o segundo maior crescimento foi em base YNB com dextrose (YNBD). Portanto, a base YEP é a que melhor supre as necessidades nutricionais da *M. koreensis* G18 indicando que essa levedura não requer suplementação com vitaminas, porém, a presença de compostos complexos como peptona e extrato de levedura induziram aumento no crescimento (Figura 4).

Nota-se pela figura 4, que em ambas as bases de nutrientes suplementares o crescimento em meios com xilose foi muito baixo (D.O.= 0,15) comparado àquele em meio com glicose (D.O.= 0,82). A *M. koreensis* G18 não foi capaz de crescer utilizando somente arabinose, em 24h de ensaio.

Com base nesses resultados, foi utilizado YEP como base nos ensaios de crescimento com glicose e xilose em diferentes pHs e temperaturas.

Figura 4. Crescimento de *M. koreensis* G18: D.O. em meio com xilose, arabinose e glicose, a 29 °C.



Fonte: autoria própria

3.2. Avaliação de parâmetros de crescimento celular em glicose e xilose em diferentes condições de pHs e temperaturas.

A cepa de *M. koreensis* G18 foi avaliada quanto sua capacidade de se desenvolver em meios ácidos, neutros e alcalinos usando-se meio de cultura base de nitrogênios em adição de açúcar (YEP), com adição de dextrose (YEPD) ou xilose (YEPX), a 29 °C e 32 °C, pHs 4,5, 6,5, e 8,5.

Como pode-se observar pela Figura 5, houve maior crescimento a 29 °C e pH entre neutro (6,5) e alcalino (8,5). Nesses experimentos, foi considerado um tempo de cultivo mais prolongado tendo sido obtido crescimento considerável em xilose, porém com uma fase *lag* muito maior do que em glicose (30 e 5 h, respectivamente). Esses dados indicam que o sistema de utilização de xilose por essa levedura requer um tempo de indução, sugerindo a expressão de proteínas específicas.

Para uma avaliação mais completa da capacidade da *M. koreensis* G18 além da D.O. máxima e mínima, outros parâmetros foram obtidos conforme Hall et al. (2014). Foi calculada a duração da fase *lag* que estima o tempo que a cepa leva

para se ambientar e começar a crescer. Também foi calculada a taxa de crescimento da cepa (Figura 6). Os dados deixam claro os maiores tempos de fases *lag* em meios com xilose e maiores taxas de crescimento em pH 6,5.

Em 32 °C pode-se observar que a *M. koreensis* G18 cresce com maior intensidade (Figuras 6 c e 6 d), mas atinge maiores concentrações de biomassa quando a temperatura está em 29 °C.

Figura 5. Crescimento da *M. koreensis* G18 em YEP (a; b), YEPD (c; d) e YEPX (e; f) em pH 4,5, 6,5 e 8,5 a 29 °C e 32 °C.

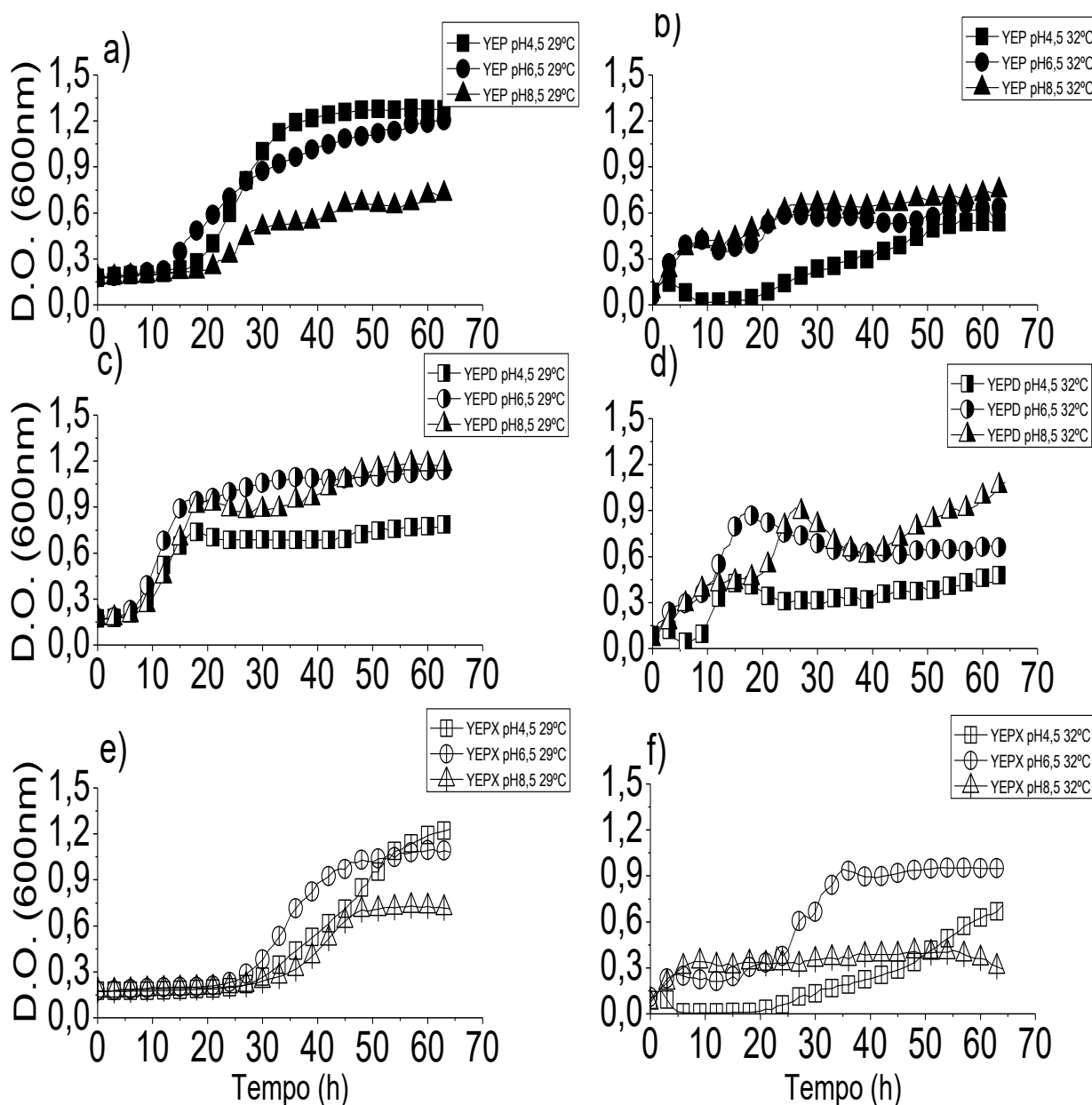
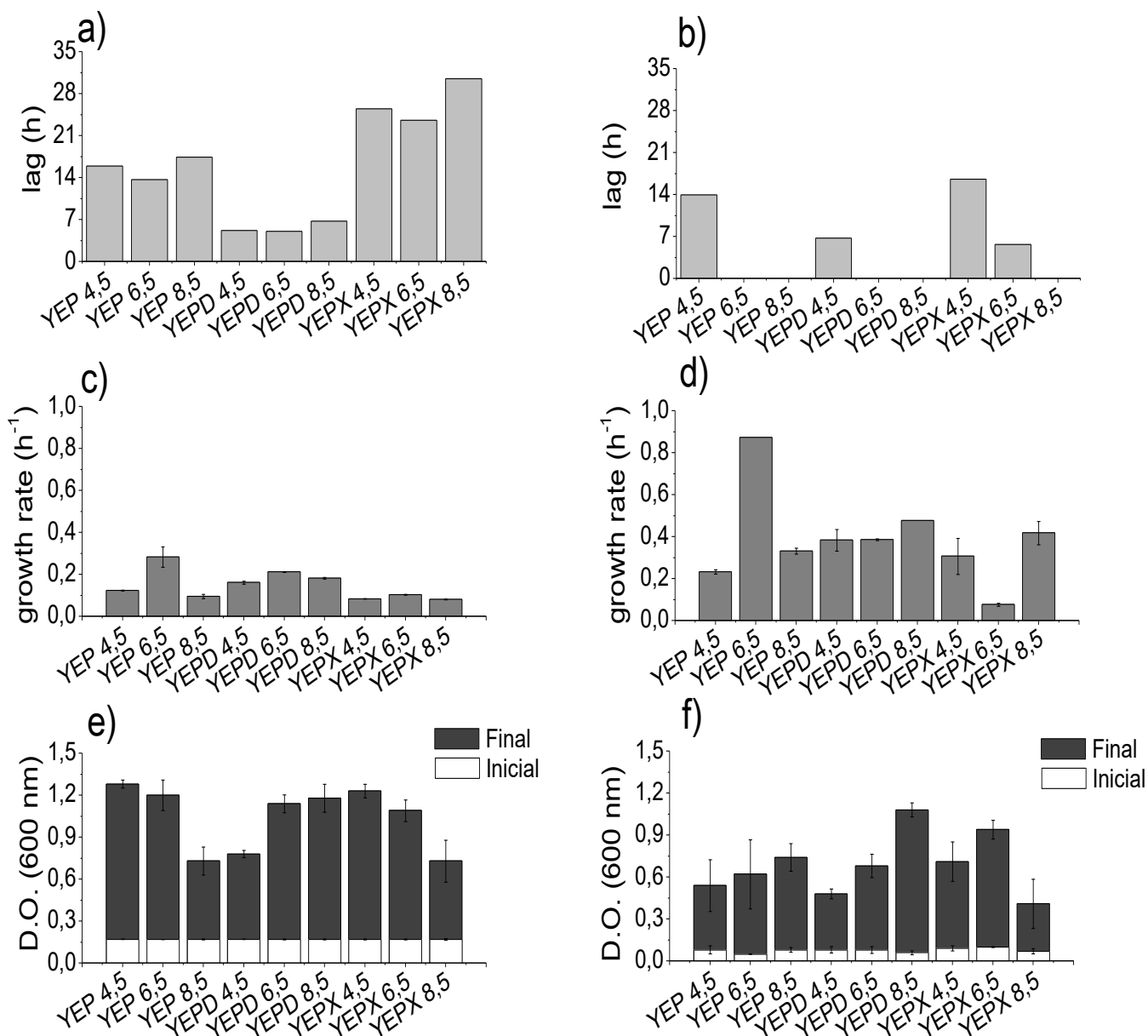


Figura 6. Fase lag, taxa de crescimento e D.O. máx. e min. de culturas da *M. koreensis* G18 em xilose e glicose em pH 4,5, 6,5 e 8,5 a 29 °C (a; c; e) e 32 °C (b; d; f).



Fonte: autoria própria

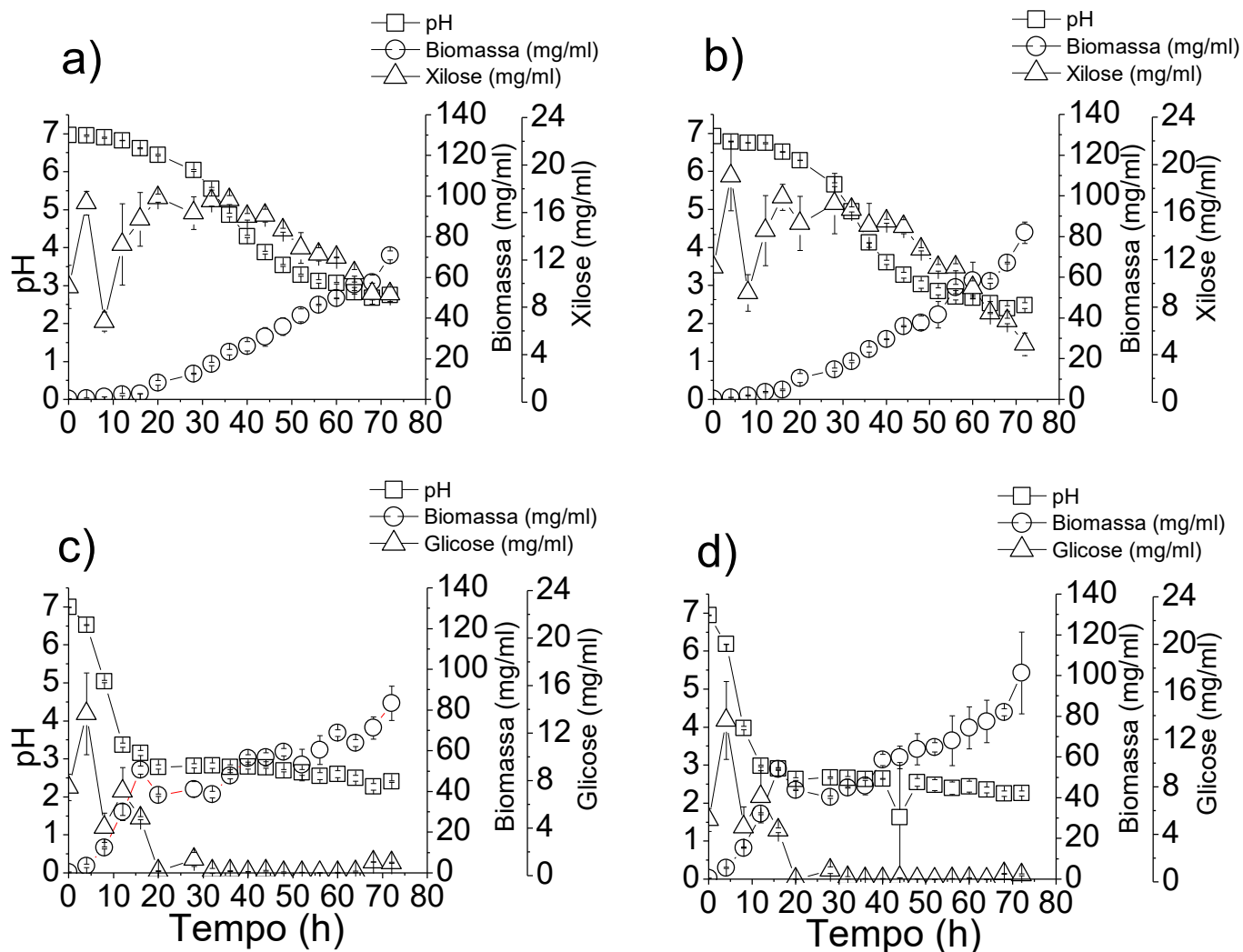
3.3. Avaliação da influência da fonte de carbono do inóculo no crescimento celular em glicose e xilose e produção de ácido lático.

Considerando os dados anteriores, nos quais a fase *lag* da curva de crescimento foi muito mais longa quando a xilose foi a fonte de carbono, e a hipótese de que isso seria consequência da necessidade de indução de proteínas/enzimas envolvidas no transporte e metabolização desse açúcar, realizou-se ensaios nos quais os inóculos foram obtidos com glicose ou com xilose. Para isso quatro cultivos foram realizados como as seguintes composições de meios: meio base YNB com xilose e inóculo obtido em xilose (YNBX-X); meio base YNB com xilose e inóculo obtido em glicose (YNBX-G); meio base YNB com glicose e inóculo obtido em xilose (YNBG-X); meio base YNB com glicose e inóculo obtido em glicose (YNBG-G). Os resultados estão apresentados na Figura 7.

O perfil da curva indicou que não houve alteração com relação ao tempo de fase *lag* de crescimento da *M. koreensis* G18 quando pré-cultivada em xilose e não confirmando nossa hipótese de necessidade de indução de proteínas. A levedura consumiu aproximadamente 75 % da xilose em 72 h quando o inóculo foi obtido em meio com glicose e aproximadamente 45 %, quando em xilose. O consumo total de glicose ocorreu em 20 h nas culturas realizadas a partir de inóculos de glicose e xilose (Figura 7).

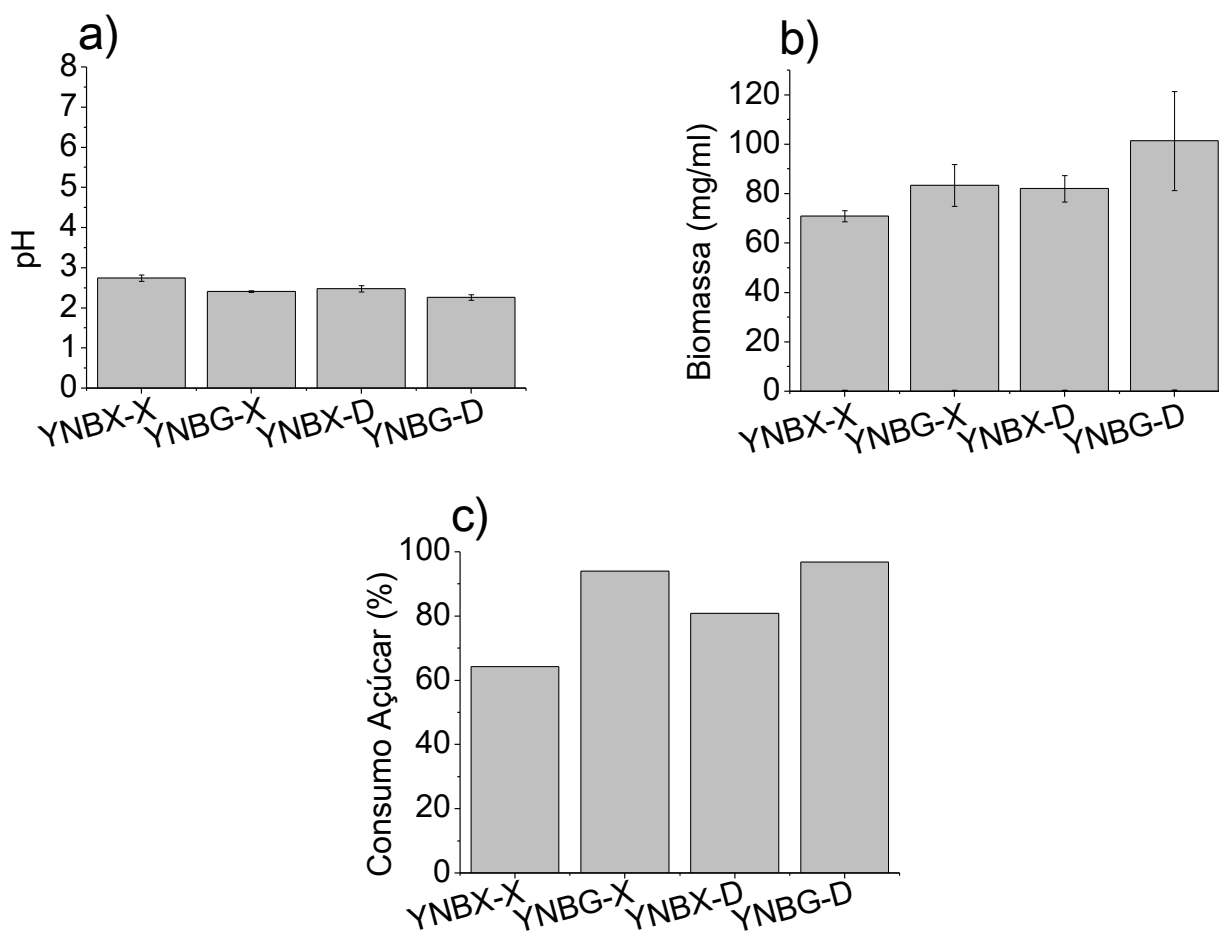
A figura 9 mostra a concentração de ácido lático no meio após 27 h de cultivo. Como pode ser observada, a produção do ácido foi maior em meio com xilose, porém, um pouco maior quando o inóculo foi obtido em meio com glicose.

Figura 7. Produção de biomassa de *M. koreensis* G18 e variações nas concentrações de açúcar e de valores pH dos meios, ao longo de 72 h de cultivo, a pH 7,0, 29 °C e 150 rpm. YNBX com inoculo em xilose **(a)**, YNBX com inóculo em glicose **(b)**, YNBG com inóculo em xilose **(c)** e YNBG com inóculo em glicose.



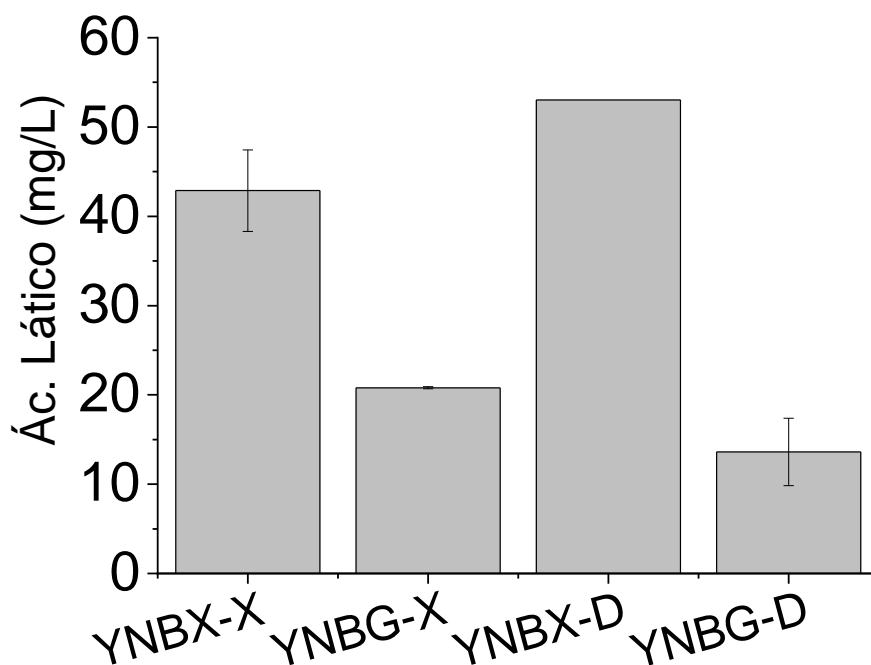
Fonte: autoria própria

Figura 8. Valores de pH final **(a)**, biomassa final **(b)** e consumo de açúcar **(c)** após 72 h de cultivo de *M. koreensis* G18 em pH 7,0, 29 °C e 150 rpm, em meio contendo xilose, utilizando inóculos obtidos em meios com diferentes tipos de açúcar. **YNBX-X**: meio com xilose com inóculo obtido em xilose; **YNBG-X**: meio com glicose com inóculo obtido em xilose; **YNBX-D**: meio com xilose com inóculo obtido em glicose; **YNBG-D**: meio com glicose com inóculo obtido em glicose.



Fonte: autoria própria

Figura 9. Concentrações de ácido láctico no meio de cultivo de *M. koreensis* G18, após 72 h de cultivo, em meios com xilose e glicose e usando inóculos oriundos de meios com xilose e glicose.



Fonte: autoria própria

3.4. Avaliação do crescimento de *M. koreensis* G18 em meio com glicose ou xilose como fonte de carbono e com diferentes fontes de nitrogênio.

Nesta etapa foi avaliado o efeito de diferentes fontes de nitrogênio e em diferentes concentrações, no crescimento da levedura *M. koreensis* G18 utilizando xilose e glicose como fonte de carbono. Foram testados o nitrato de sódio (NaNO_3), sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e ureia como fontes de nitrogênio, com a concentração do elemento nitrogênio em 2, 6 e 10 g/L.

Como pode ser observado na Figura 10 a e b, *M. koreensis* G18 apresentou crescimento satisfatório em nitrato de sódio 2 g/L. Sulfato de amônio com 2,0 e 6,0 g/L de nitrogênio em meio com xilose. Sulfato de amônio é convencionalmente utilizado como fonte de nitrogênio para leveduras. Além do nitrato de sódio a ureia (Figura 10 c) também favoreceu o crescimento de *M. koreensis* G18. Em meio com glicose (Figura 10 b, d e f), concentrações de 10 g/L de nitrogênio levaram o

crescimento da levedura, enquanto que a ureia, favoreceu o crescimento até 6 g/L, passando a exercer efeito inibidor em 10 g/L

Um novo ensaio foi realizado utilizando-se nitrato de sódio ou sulfato de amônio em concentrações de 1,0 e 4,0 g/L de nitrogênio, em meio com xilose (Figura 11). Observou-se que maior crescimento ocorreu em meio suplementados com 1 g/L de sulfato de amônio, confirmando ser esta a melhor fonte de nitrogênio para cultivo da levedura.

Figura 10. Crescimento de *M. koreensis* G18 em meio com xilose e nitrato de sódio (a), xilose e sulfato de amônio (c), xilose e ureia (e), glicose e nitrato de sódio (b), glicose e sulfato de amônio (d) e glicose e ureia (f). O eixo X corresponde às concentrações de N (2,0, 6,0 e 10 g/L).

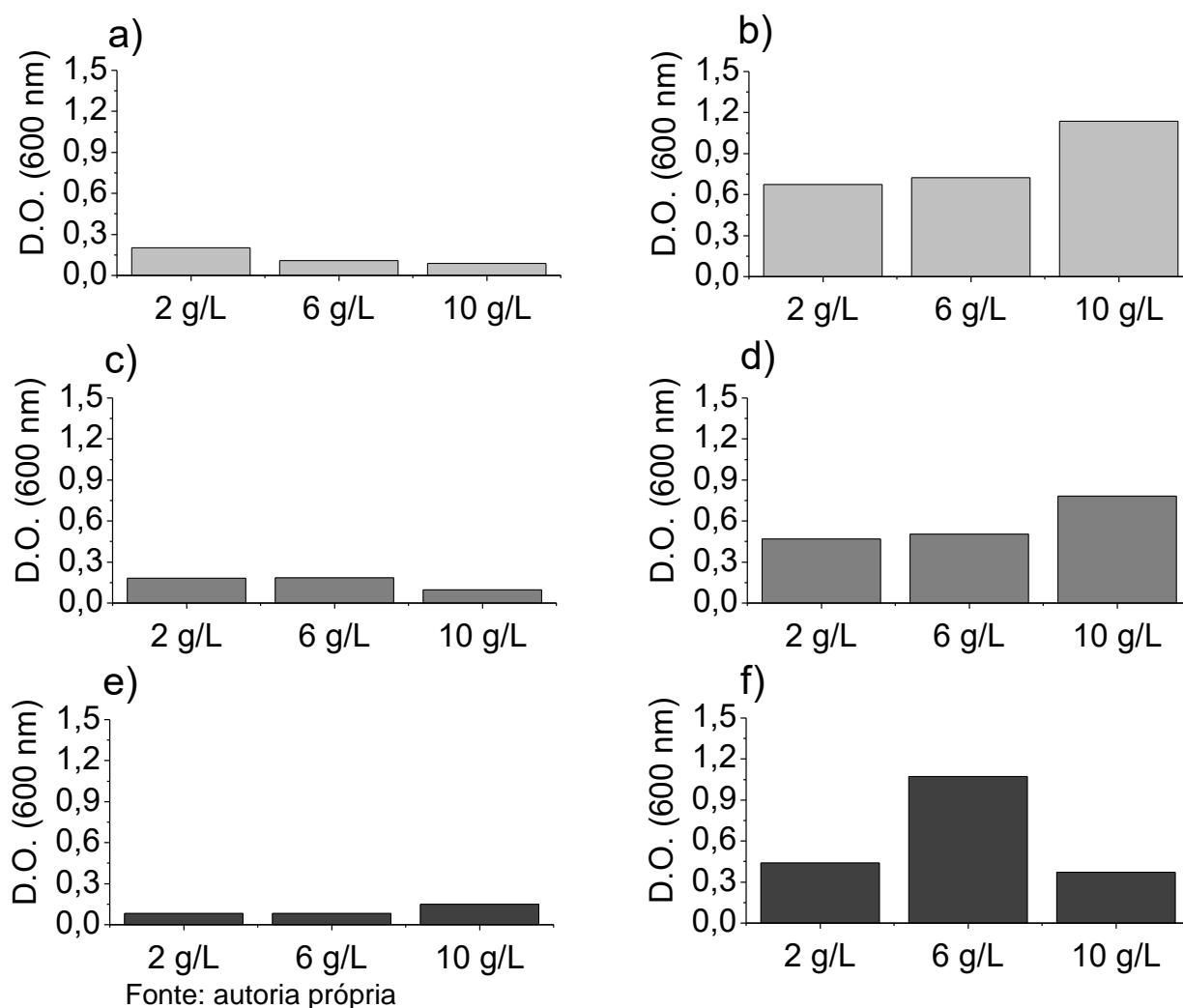
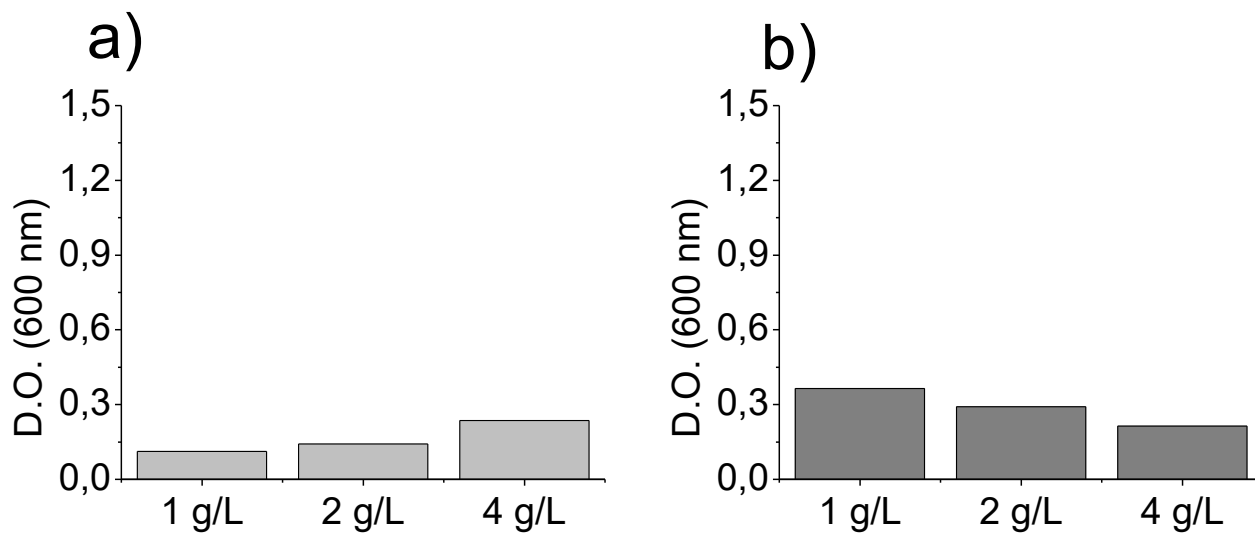


Figura 11. Crescimento de *M. koreensis* G18 em meio com xilose adicionado com nitrato de sódio **(a)** ou sulfato de amônio **(b)** em concentrações de 1,0, 2,0 e 4,0 g/L.



Fonte: autoria própria

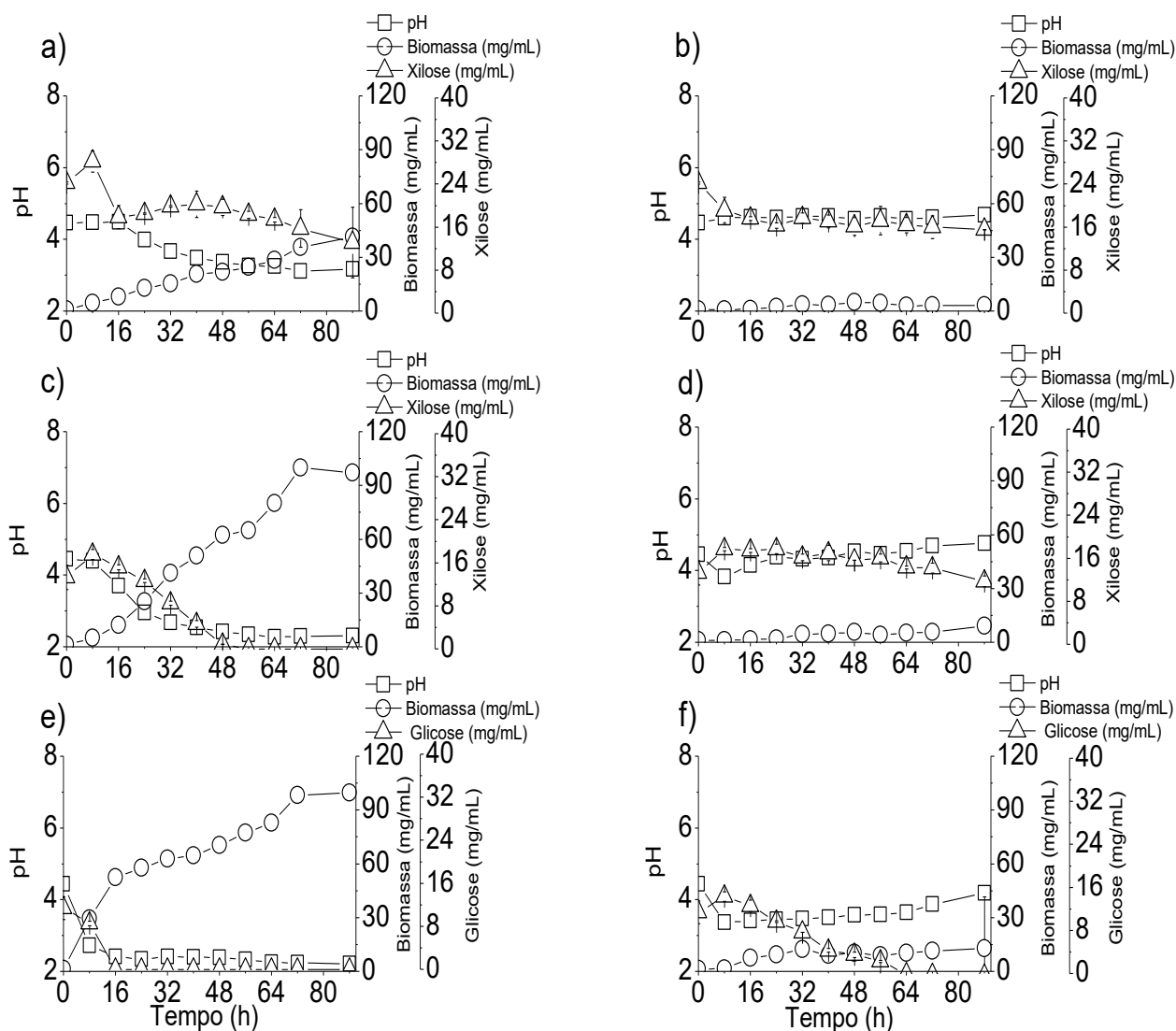
3.5. Avaliação do crescimento celular, consumo de açúcar, pH durante o cultivo e obtenção de ácidos orgânicos em aerobiose e anaerobiose em glicose e xilose, como fonte de carbono, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, como fontes de nitrogênio.

A cepa *M. koreensis* G18 foi submetida a determinados fatores nutricionais e ambientais para conhecer quais seriam as combinações desses fatores que proporcionariam um crescimento satisfatório da levedura. Foi observado que a *M. koreensis* G18 cresceu utilizando xilose e glicose em condições ácidas e alcalinas (pHs 4,5 – 8,5) a 29 °C e utiliza como fonte de nitrogênio o nitrato de sódio e sulfato de amônio com 4 e 1g/L de nitrogênio, respectivamente. A próxima etapa foi avaliar se diferentes pHs iniciais, fontes de nitrogênios e as condições de incubação (anaerobiose e aerobiose) haveria diferenças no consumo de xilose, crescimento celular e na produção de ácidos orgânicos.

Ao observar as Figuras 12 b e d pode-se concluir que praticamente não houve crescimento da *M. koreensis* G18 e pouco consumo de xilose em anaerobiose e em pH inicial de 4,5. Por outro lado, em pH inicial 4,5 e em aerobiose foi observado crescimento e consumo de açúcar em meios com nitrato de sódio e sulfato de amônio. A xilose foi consumida totalmente em 48 h quando a fonte de nitrogênio era sulfato de amônio (Figura 12 c) e a glicose consumida totalmente em 16 h (Figura 9 e). Pode-se inferir que o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio é melhor para o crescimento quando se tem disponível xilose como fonte de carbono, pois nessa condição apresentou crescimento semelhante a glicose com sulfato de amônio em aerobiose (Figura 12 e).

Utilizando xilose em pH 4,5 (pH inicial) e aerobiose a *M. koreensis* G18 resultou em maior produção de ácido cítrico e láctico, enquanto que a glicose favoreceu a produção de ácido acético. Utilizando nitrato de sódio foi obtido cerca de 660 mg/L de ácido cítrico e 50 mg/L de ácido láctico (Tabela 1). De acordo com os resultados da Tabela 1 a produção de ácido cítrico seja estimulada pelo nitrato de sódio, pois em sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e xilose houve produção maior de ácido láctico (87 mg/L) e não foi detectado ácido cítrico. A produção de ácido acético foi observada em aerobiose e anaerobiose, mas com glicose como fonte de carbono.

Figura 12. Biomassa, consumo de açúcar e pH durante 88 h de cultivo a 29 °C em 150 rpm, meio com pH inicial de 4,5 com xilose e nitrato de sódio em aerobiose **(a)** e em anaerobiose **(b)**, com xilose e sulfato de amônio em aerobiose **(c)** e em anaerobiose **(d)** e meio com glicose e sulfato de amônio em aerobiose **(e)** e anaerobiose **(f)**.



Fonte: autoria própria

Tabela 1. Valores de pH, biomassa, consumo de açúcar e concentração de ácidos orgânicos após 88 h de cultivo em aerobiose e anaerobiose, pH inicial de 4,5, em 29 °C, em glicose e xilose, como fonte de carbono, e NaNO₃ e (NH₄)₂SO₄, como fontes de nitrogênio.

	pH (inicial-final)	Biomassa (mg/mL)	Consumo (%)	Ác. Cítrico (mg/L)	Ác. Lático (mg/L)	Ác. Fumárico (mg/L)	Ác. Acético (mg/L)
Aerobiose							
Xilose NaNO ₃ 4gN	4,47 - 3,18	40,39	45,79	663,23	48,06	n.d.	n.d.
Xilose (NH ₄) ₂ SO ₄ 1gN	4,45 - 2,31	96,08	100,0	n.d.	87,19	n.d.	n.d.
Glicose (NH ₄) ₂ SO ₄ 1gN	4,44 - 2,22	98,27	100,0	413,35	n.d.	n.d.	163,46
Anaerobiose							
Xilose NaNO ₃ 4gN	4,47 - 4,68	2,29	35,71	n.d.	29,72	n.d.	n.d.
Xilose (NH ₄) ₂ SO ₄ 1gN	4,45 - 4,76	7,89	11,79	n.d.	30,02	n.d.	n.d.
Glicose (NH ₄) ₂ SO ₄ 1gN	4,44 - 4,19	11,43	100,0	n.d.	n.d.	28,89	139,16

n.d.: não detectado; **Ae**: aerobiose; **An**: anaerobiose

Fonte: autoria própria

Através da Figura 13 e Tabela 2 podemos observar que em meios de cultivo com pH inicial de 7,0 a *M.koreensis* G18 apresenta perfis de crescimento, consumo de açúcar, redução de pH do meio e produção de ácidos orgânicos diferentes àqueles apresentados em pH inicial 4,5.

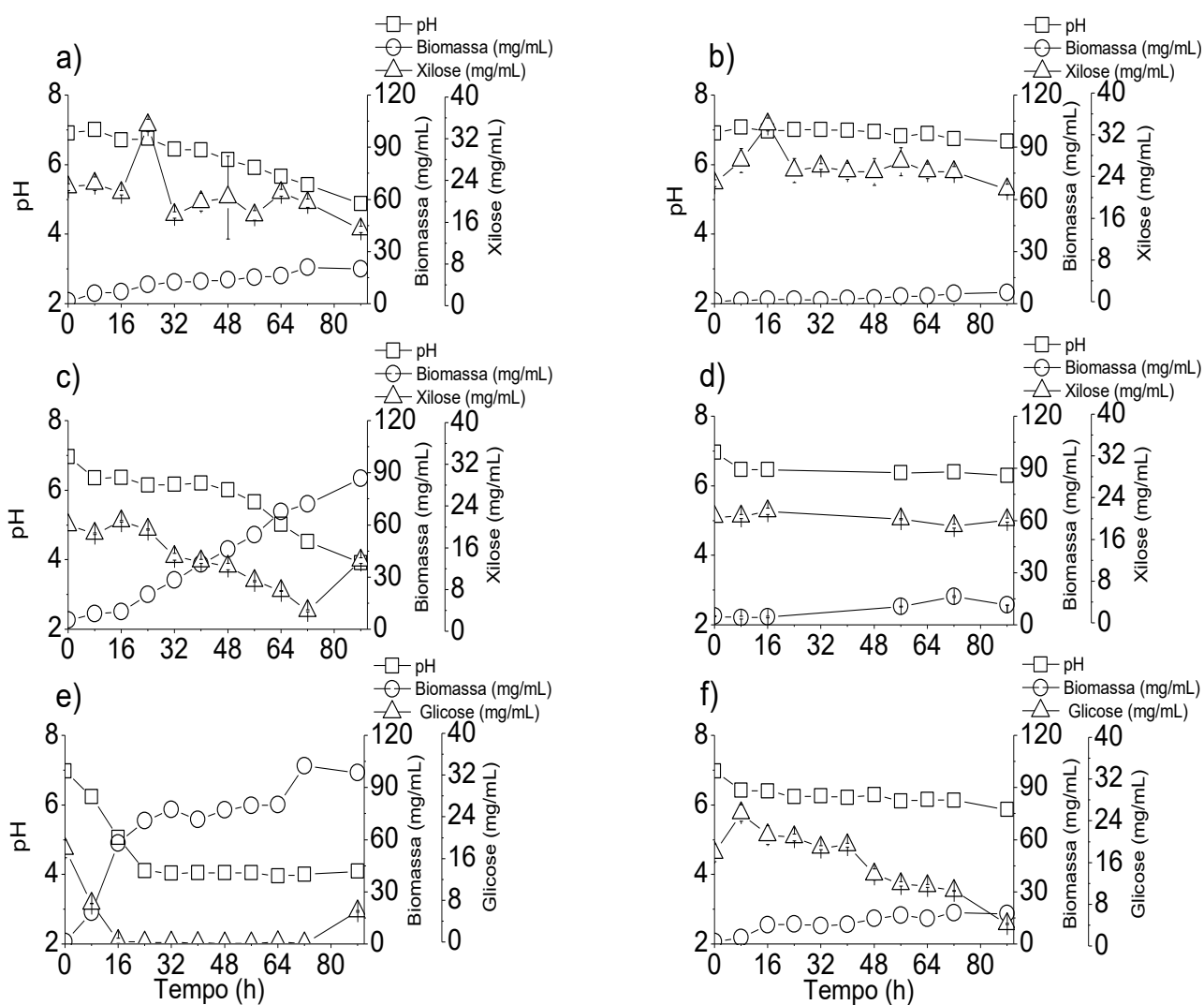
Iniciar o pH em 7 não causa melhorias no desenvolvimento da *M. koreensis* G18 em anaerobiose (Figuras 13 b e 13 d), pois o crescimento celular e o consumo de xilose foram semelhantes aos observados nos ensaios de pH inicial 4,5. Quanto ao crescimento da cepa, foi observado que em pH 7,0 a formação de biomassa foi menor que em pH 4,5, isso pode explicar o fato da cepa ter consumido menos xilose e glicose (Tabela 2).

A produção de ácidos orgânicos, bem como a quantidade obtida deles, é influenciada pelo pH inicial do cultivo. Podemos observar na Tabela 2 que em meio pH inicial 7, aerobiose, xilose como fonte de carbono e nitrato de sódio não foi detectado os ácidos cítrico e lático, os quais foram produzidos quando iniciado em pH 4,5 no mesmo tipo de meio. Entretanto, houve a produção de ácido fumárico. Iniciando o cultivo em pH 7, aerobiose, xilose como fonte de carbono e sulfato de amônio houve a produção de ácido cítrico em aerobiose, xilose como fonte de carbono e sulfato de amônio em pH inicial 7, este dado é interessante, pois como

mostrado nas Tabelas 1 e 2 o ácido cítrico não havia sido produzido nesse meio em pH 4,5 e em pH 7 foi onde se conseguiu a maior concentração desse ácido.

Em anaerobiose a produção de alguns ácidos a partir de xilose ocorrem somente ao iniciar o cultivo em pH 7, como, por exemplo, o ácido cítrico e fumárico que foram obtidos em ambas fontes de nitrogênio. O mesmo aconteceu para o de ácido láctico que foi obtido cerca de 860 mg/L em anaerobiose e glicose como fonte de carbono.

Figura 13. Biomassa, consumo de açúcar e pH durante 88 h de cultivo a 29 °C em 150 rpm, meio em pH 7,0 com xilose e nitrato de sódio em aerobiose **(a)** e em anaerobiose **(b)**, com xilose e sulfato de amônio em aerobiose **(c)** e em anaerobiose **(d)** e meio com glicose e sulfato de amônio em aerobiose **(e)** e anaerobiose **(f)**.



Fonte: autoria própria

Tabela 2. Valores de pH, biomassa, consumo de açúcar e concentração de ácidos orgânicos após 88h de cultivo em aerobiose e anaerobiose, pH 7,0 em 29 °C em glicose e xilose, como fonte de carbono, e NaNO₃ e (NH₄)₂SO₄, como fontes de nitrogênio.

	pH (inicial- final)	Biomassa (mg/mL)	Consumo (%)	Ác. Cítrico (mg/L)	Ác. Lático (mg/L)	Ác. Fumárico (mg/L)	Ác. Acético (mg/L)
Aerobiose							
Xilose NaNO ₃ 4gN	6,91 - 4,88	18,41	35,46	n.d.	n.d.	21,37	n.d.
Xilose (NH ₄) ₂ SO ₄ 1gN	6,96 - 3,91	81,49	80,60	750,43	123,43	n.d.	n.d.
Glicose (NH ₄) ₂ SO ₄ 1gN	6,98 - 4,10	97,25	100,00	514,30	672,81	11,08	758,21
Anaerobioses							
Xilose NaNO ₃ 4gN	6,91 - 6,68	4,85	5,24	432,15	30,61	2,03	247,86
Xilose (NH ₄) ₂ SO ₄ 1gN	6,96 - 6,30	6,09	3,10	40,93	1,74	235,81	n.d.
Glicose (NH ₄) ₂ SO ₄ 1gN	6,98 - 5,87	16,21	76,27	n.d.	858,07	19,54	501,45

n.d.: não detectado; **Ae**: aerobiose; **An**: anaerobiose

Fonte: autoria própria

4. CONCLUSÕES

A base YEP é a que melhor supre as necessidades nutricionais da *M. koreensis* G18.

A *M. koreensis* G18 não é capaz de crescer quando a xilose é a única fonte de carbono disponível.

A *M. koreensis* G18 é capaz de crescer em ambientes ácidos, neutros e alcalinos. Possui menor fase *lag* e cresce com maior velocidade a 32 °C, contudo a 29 °C atinge maior crescimento celular.

Inóculos de *M. koreensis* G18 obtidos com glicose como fonte de carbono são mais eficientes no consumo de açúcar, crescimento e produção de ácido lático em testes de cultivo com xilose.

A *M. koreensis* G18 tendo xilose como fonte de carbono cresce melhor utilizando nitrato de sódio e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

O pH inicial do cultivo, a aeração e fonte de nitrogênio influenciam no crescimento celular, consumo de açúcar e produção de ácidos orgânicos. Em aerobiose há maior consumo de xilose e crescimento celular. Iniciando o cultivo de *M. koreensis* G18 em pH 7,0 ocorre maior produção de ácidos orgânicos.

O ácido cítrico é produzido principalmente quando a fonte de nitrogênio é o sulfato de amônio, em pH inicial de 7,0 e em aerobiose. O ácido lático é obtido em maiores concentrações quando a glicose é fonte de carbono, em anaerobiose e pH inicial de 7,0.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. **Journal of biotechnology**, [s. l.], v. 156, n. 4, p. 286–301, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165611003166>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 367–370, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.016>>

FRANÇA, H. C. R. **Produção de ácido cítrico a partir do cultivo de Aspergillusniger e Trichodermareesei em bagaço de cana-de-açúcar e fermentação etanólica do extrato fúngico**. 2016. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, [s. l.], 2016.

GARCÍA-FRAILE, P.; SILVA, L. R.; SÁNCHEZ-MÁRQUEZ, S.; VELÁZQUEZ, E.; RIVAS, R. Plums (*Prunus domestica* L.) are a good source of yeasts producing organic acids of industrial interest from glycerol. **Food chemistry**, [s. l.], v. 139, n. 1–4, p. 31–4, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613000125>>. Acesso em: 26 maio. 2015.

GERMEC, M.; KARHAN, M.; BIALKA, K. L.; DEMIRCI, A.; TURHAN, I. Mathematical modeling of lactic acid fermentation in bioreactor with carob extract. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 14, p. 254–263, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187881811830077X>>. Acesso em: 5 abr. 2018.

HALL, B. G.; ACAR, H.; NANDIPATI, A.; BARLOW, M. Growth rates made easy. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 232–238, 2014.

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**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 117–123, 2007.

KANG, S.; PARK, H.; LEE, J.; LEE, Y.; KWON, I.; MISAENGMUL, N. S. Citric acid fermentation from mandarin orange peel by *Aspergillus niger*. **Sanop Misaengmul Hakhoechi**, [s. l.], v. 17, p. 510–518, 1989.

KAUTOLA, H.; LINKO, Y. Y. Production of fumaric acid with immobilized biocatalysts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 24–25, n. 1, p. 161–170, 1990.

MARTINS, G. M. **Estudo do comportamento fisiológico de cepas de leveduras frente às condições do meio de cultivo visando processos de fermentação**

alcoólica. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, [s. l.], 2015.

MARTINS, G. M.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; BEZZERRA-BUSSOLI, C.; PAGNOCCA, F. C.; BOSCOLO, M.; MONTEIRO, D. A.; SILVA, R. Da; GOMES, E. The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 162–168, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216303653?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 set. 2018.

MATTEY, M. The production of organic acids. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 1–2, p. 87–132, 1992.

NAGAMORI, E.; FUJITA, H.; SHIMIZU, K.; TOKUHIRO, K.; ISHIDA, N.; TAKAHASHI, H. Fed-batch system for cultivating genetically engineered yeast that produces lactic acid via the fermentative promoter. **Journal of bioscience and bioengineering**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 193–5, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172312003647>>. Acesso em: 26 jul. 2015.

PAN, X.; LIU, H.; LIU, J.; WANG, C.; WEN, J. Omics-based approaches reveal phospholipids remodeling of *Rhizopus oryzae* responding to furfural stress for fumaric acid-production from xylose. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 222, p. 24–32, 2016.

PANESAR, P. S.; KAUR, S. Bioutilisation of agro-industrial waste for lactic acid production. **International Journal of Food Science & Technology**, [s. l.], v. 50, n. 10, p. n/a-n/a, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ijfs.12886>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

TORRADO, A. M.; CORTÉS, S.; SALGADO, J. M.; MAX, B.; RODRÍGUEZ, N.; BIBBINS, B. P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 394–409, 2011.

WANG, Y.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 119, n. 1, p. 10–18, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172314002199>>

WEI, L.; LIU, J.; QI, H.; WEN, J. Engineering *Scheffersomyces stipitis* for fumaric acid production from xylose. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 187, p. 246–254, 2015.

WOOD, I. P.; ELLISTON, A.; RYDEN, P.; BANCROFT, I.; ROBERTS, I. N.; WALDRON, K. W. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. **Biomass and**

Bioenergy, [s. l.], v. 44, n. 0, p. 117–121, 2012. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>>. Acesso em: 8 set. 2016.

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**, Dipartimento Valorizzazione, Università di Torino, Via L. da Vinci 44, 10095, Grugliasco, Torino, Italy, v. 49, n. 6, p. 2722–2726, 2001. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034840223&partnerID=40&md5=7a12c46c3cccbf2d97157139d5d60274>>

CAPÍTULO 4 - Avaliação do mecanismo de transporte de D-xilose e L-arabinose pela membrana das leveduras *Metschnikowia koreensis* G18, *Sporidiobolus pararoseus* U3 e *Pichia terricola* G20

1. INTRODUÇÃO

A prospecção, caracterização e finalmente expressão heteróloga de enzimas do metabolismo de D-xilose, xilose redutase (XR) e xitol desidrogenase (XDH), em *S. cerevisiae* aumentou a possibilidade de utilizar a xilose, proporcionando melhor aproveitamento da porção carboidrato da biomassa lignocelulósica. Muitos trabalhos que estudaram a XR e XDH visavam principalmente a obtenção de etanol de 2^o geração, porém essas enzimas podem ser associadas a caminhos metabólicos que levam a formação de outros produtos (DU PREEZ; PRIOR, 1985; KIM et al., 2013; KWAK et al., 2019).

A etapa de captação de substrato é fator limitante do fluxo metabólico da célula e pode mascarar a otimização do catabolismo de açúcar exógeno. Logo, é plausível que melhorando a taxa de transporte de xilose uma fermentação mais eficiente será promovida. O transporte de xilose pode ocorrer através de proteínas transportadoras de alta afinidade, que possuem mecanismo simporte, e por proteínas transportadores de hexoses (família hxt), que comumente utilizam difusão facilitada (KIM et al., 2012; SHARMA et al., 2018a, 2018b).

O transporte de açúcar em *S. cerevisiae* ocorre principalmente por difusão facilitada empregando os transportadores hxt1-7 e gal2. Essas proteínas também são capazes de transportar glicose e xilose, mas o transporte de xilose é comprometido pela presença de glicose, devido a pelo menos duas razões: inibição severa da expressão dos principais transportadores de xilose (hxt5 e hxt7) em meios com concentração de glicose superior a 3,5 % e inibição competitiva no transporte causada pela maior afinidade a glicose. A presença de glicose inibe cerca 20-30 % a taxa de captação de xilose. A afinidade é estimada pelo valor da constante de Michaelis Mentem (K_M), quanto menor esse valor maior a afinidade, e os K_M reportado para xilose é 10 vezes maior que para glicose (DE SALES et al., 2015; GONÇALVES et al., 2014; LEANDRO; FONSECA; GONÇALVES, 2009; RUNQUIST; HAHN-HÄGERDAL; RÅDSTRÖM, 2010; YOUNG et al., 2012).

O mecanismo de transporte simporte de xilose possui maior afinidade que o mecanismo de difusão facilitada e são encontradas em leveduras fermentadoras de xilose, como por exemplo, *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces stipitis*, *Candida intermedia* e *Candida Shehatae*. Bactérias também podem possuir proteínas simportadoras, como é o caso da proteína xylE de *Escherichia coli*. Para se ter uma ideia da diferença da afinidade entre mecanismo de transporte, em *C. intermedia* um simportador de glicose/xilose possui K_M de $\sim 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ enquanto que o K_M de um facilitador é $\sim 50 \text{ mmol L}^{-1}$. Um trabalho de caracterização molecular de transportadores identificou e clonou o cDNA do primeiro simportador de glicose/xilose (GXS1) de alta afinidade e foi expressado em *S. cerevisiae* para determinar suas características de transporte. Entretanto, esse transportador não conferiu crescimento intenso da levedura em xilose, o autor sugere que uma forte expressão do gene é necessária para permitir o crescimento (FONSECA et al., 2011; PEREIRA et al., 2014; REIS et al., 2013; WANG et al., 2013, 2015; WEIERSTALL; HOLLENBERG; BOLES, 1999).

Novos estudos sobre os mecanismos de transporte em leveduras assimiladoras de xilose devem ser realizados para superar os problemas fundamentais da captação de pentoses: transportadores de baixa afinidade e/ou capacidade, maior afinidade dos transportadores a glicose e inibição da expressão de transportadores específicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Leveduras utilizadas.

Foi utilizada nos experimentos a cepa *Pichia terricola* G20, *Sporidiobolus pararoseus* U3 e *Metschnikowia koreensis* G18, isolada em trabalho prévio (MARTINS et al., 2018) cuja identificação foi realizada por pesquisadores do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – Unesp Campus de Rio Claro, sob a coordenação do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca. Os marcadores genéticos utilizados para o sequenciamento foram as regiões D1/D2, que têm 570 pares de bases (pb) e codificam parte do RNA ribossômico da subunidade 18S (MARTINS, 2015).

A conservação das culturas puras foi feita por estocagem a -80°C. Pérolas de vidro, lavadas com ácido nítrico, foram esterilizadas e adicionadas à suspensão de leveduras, que foram mantidas, *overnight*, em glicerol 15 % a -20 °C e, então, transferidas para -80 °C.

2.2. Condições de cultivo para avaliação do crescimento, consumo de açúcar e obtenção de biomassa.

Os cultivos ocorreram em 100 mL de meio em erlenmeyer de 250 mL a 29 °C e agitação de 150 rpm. O meio de cultivo utilizado foi o YEP contendo 20 mg/mL de uma ou duas fontes de carbono (glicose, xilose e arabinose) e com pH 6,9. Alíquotas das culturas foram tomadas periodicamente para análises de transporte, açúcar residual e medir D.O. para estimar biomassa através da regressão linear obtida de uma curva de D.O. vs. mg/mL de biomassa.

2.3. Análise cromatográfica para quantificação de açúcares.

A glicose e xilose foram quantificados por cromatografia líquida. As culturas da levedura foram centrifugadas a 10000 x g por 5 min a 10 °C, o sobrenadante foi filtrado em membrana de *nylon* de 0,45 µm e 2,50 mL foram aplicados no cromatógrafo. Foi utilizado um cromatógrafo Dionex – Thermo Scientific modelo ICS-5000, equipado com bomba quaternária, amostrador automático, forno de coluna e um detector de amperometria pulsada. A coluna utilizada foi a CarboPac PA-100 (250 x 4,1 mm) mantida a temperatura de 25 °C. A eluição foi realizada em

gradiente, iniciando com 95 % de A e 5 % de B e terminando com até 5 % de A e 95 % de B, utilizando água ultra pura (A) e NaOH 300 mmol.L⁻¹ (B). O fluxo de fase móvel foi de 1,0 mL.min⁻¹.

2.4. Análise para obtenção das taxas de transporte por simporte da xilose.

O transporte de açúcares pela levedura foi determinado por meio da análise do fluxo de prótons para dentro da célula quando ocorre a captação do açúcar, ou seja, medida da alcalinização do meio extracelular. Os ensaios de transporte foram realizados utilizando um sistema de bancada composto pelos seguintes módulos: reator de 10 mL de capacidade, com barra magnética para agitação e encamisado para controle de temperatura (25 °C); potenciômetro (Radiometer Copenhagen PHM62) equipado com um amplificador de sinal eletrônico e eletrodo de pH acoplado ao reator; impressora registradora de sinal eletrônico (Hewlett-Packard Agilent) conectada ao potenciômetro.

As células utilizadas nas análises foram coletadas em momentos específicos dos cultivos em meios com diferentes açúcares. As culturas coletadas foram centrifugadas a 7000 x g por 5 min a 5 °C e lavadas duas vezes com água resfriada. A biomassa foi ressuspensa em água destilada, afim de obter uma D.O. (600 nm) entre 50 e 100 e mantida em repouso no gelo por no mínimo 1 h. Para cada ensaio eram adicionados no reator 4000 µL de água, 500 µL de suspensão de células, ajustado o pH entre 4-5 e adicionado 500 µL de solução de açúcar, após aproximadamente 1 min de registro 10 µL de HCl 10 mmol L⁻¹ eram adicionados como referência de quantidade de prótons captados (GÁRDONYI et al., 2003; VIANA et al., 2012).

Foram obtidas velocidades de transporte em diferentes concentrações de açúcar e para obtenção dos parâmetros cinéticos (K_M e V_{max}) os dados foram tratados aplicando o cálculo de regressão não linear de através da função de Michaelis-Menten (disponível no Origin® 9) para fitar a velocidade de transporte vs. concentração de substrato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Avaliação do transporte de glicose, xilose e arabinose pela membrana das leveduras P. terricola G20, S. pararoseus U3 e M. koreensis G18 cultivada em glicose, xilose, arabinose e mistura de xilose e glicose.*

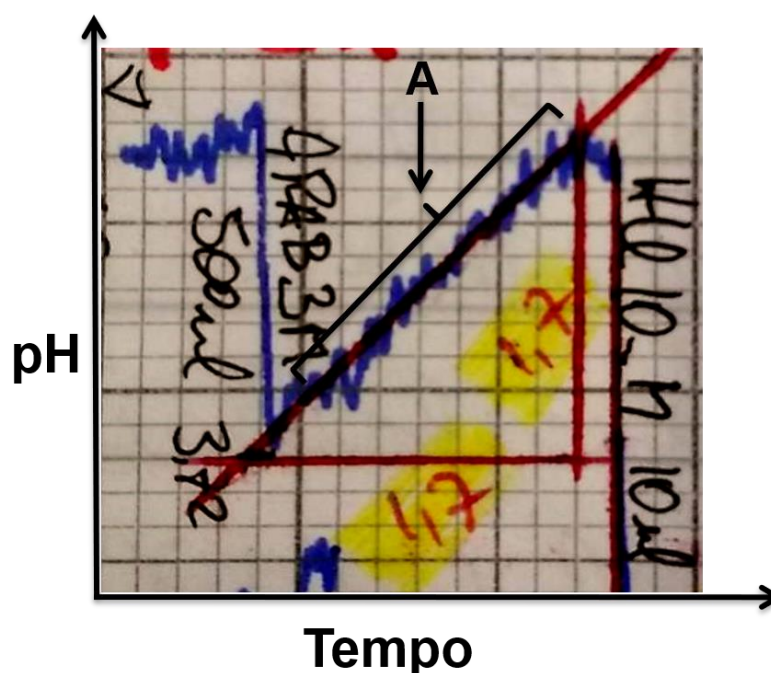
Inicialmente, para ter uma idéia da variedade dos sistemas de transporte presentes nas cepas *P. terricola* G20, *S. pararoseus* U3 e *M. koreensis* G18, foi necessário verificar quais sistemas de transporte são aplicados para os diferentes açúcares e selecionar em quais condições essas cepas empregavam o sistema de transporte do tipo simporte com prótons para as pentoses. Portanto, cultivos em diferentes fontes de carbono e análises do tipo de transporte em diferentes períodos do crescimento foram realizados.

As leveduras *P. terricola* G20 e *S. pararoseus* U3 foram utilizadas no exame de transporte de arabinose e a *M. koreensis* G18 utilizada no exame do transporte de xilose. Segundo Sharma et al. (2018a) normalmente transportadores específicos e eficientes de pentoses, como a xilose, possuem mecanismo simportador de prótons e a eficiência desse transporte depende de fatores, como, por exemplo, disponibilidade de açúcar e nível de estresse que estão as células.

Em muitas situações foi difícil realizar as medições da velocidade de transporte para todas as cepas, principalmente quando essas eram obtidas por cultivo utilizando as pentoses como fonte de carbono. Em muitos momentos de cultivo foram realizadas análises de velocidade, mas com os dados obtidos não era possível obter valores precisos de K_M e V_{max} por serem muito baixos ou ruidosos.

Através da taxa de alcalinização do meio extracelular após adição de açúcares em diferentes concentrações (Figura 1), pode-se afirmar que a cepa *P. terricola* G20, cultivada em glicose e arabinose, realiza transporte do tipo simporte com prótons para glicose, xilose e arabinose e *S. pararoseus* U3, cultivada em glicose, realiza simporte para glicose e arabinose (Tabela 1).

Figura 1. Registro do pH (linha azul) durante o ensaio de transporte pela *S. pararoseus* U3 e alcalinização do meio extracelular (A) após adição de arabinose.



Fonte: autoria própria

Durante as primeiras 12 h de cultivo com arabinose como fonte de carbono não foi detectado o transporte de simporte para a glicose, xilose e arabinose para *P. terricola* G20 e na cepa *S. pararoseus* U3 também não foi detectado simporte em até 24 h de cultivo. Embora não foi detectado o simporte com prótons, foi registrado a redução do pH após alguns instantes à adição dos açúcares nas suspensões de células das leveduras o que indica atividade da ATPase de membrana e demonstra que os açúcares foram captados e metabolizados pelas células (RAMOS; SYCHROVÁ; KSCHISCHO, 2016). Portanto, durante o início do cultivo dessas leveduras, o principal tipo de transporte utilizado foi a difusão facilitada de baixa afinidade a pentoses, possivelmente empregando proteínas da família Hxt ou Gxf1 (SHARMA et al., 2018a).

Em 24 h de cultivo em arabinose a cepa *P. terricola* G20 passou a apresentar simporte para glicose e arabinose e em 72 h a xilose também foi transportada por simporte, ou seja, proteínas simportadoras são expressas em fases mais avançadas da cultura, como na fase exponencial de crescimento. Possivelmente, isso ocorre devido à necessidade das células em utilizar sistemas de transporte com maior

afinidade para compensar a constante redução de concentração da fonte de carbono causada pelo consumo das próprias células. Algo semelhante foi observado durante o cultivo dessa mesma levedura quando utilizado glicose como fonte de carbono. Como o consumo de glicose pelo organismo é mais eficiente, rapidamente a concentração desse açúcar foi reduzida e estimulando logo nas primeiras 12 h o simporte de glicose, diferente do cultivo em arabinose em que somente em 24 h de cultivo detectou-se simporte para glicose e arabinose simultaneamente. O simporte de arabinose pela *P. terricola* G20 cultivada em glicose foi detectado após 72 h de cultivo e não foi detectado simporte para xilose. A presença de proteínas simportadoras para xilose em cultivo com arabinose e a ausência no cultivo com glicose pode estar relacionado a indução de transportadores de pentoses causada por outras pentoses. Considerando as condições de cultivo e de ter sido registrado simporte para glicose não é possível afirmar que o simporte observado para xilose e arabinose pela *P. terricola* G20 sejam realizados por proteínas específicas, entretanto a mecanismos simportadores possuem afinidade maior a açúcares específicos.

A levedura *S. pararoseus* U3 foi cultivada por 24 h e apresentou simporte somente quando cultivada em glicose. Em 12 h de cultivo foi detectado transporte por simporte para glicose, xilose e arabinose e em 24 h somente o simporte de arabinose não foi mais detectado. A ausência de simporte no cultivo em arabinose e a presença de vários simportes logo nas primeiras horas de cultivo pode ter ocorrido porque essa cepa é pouco eficiente no consumo e crescimento e talvez ela precise de transportadores mais eficiente para captar açúcar. Mas, como o uso de pentoses é pouco eficiente, utilizando somente arabinose não fornece energia suficiente para aplicar em simportadores, pois esses para funcionar acoplam energia metabólica.

Ao comparar as leveduras testadas utilizando parâmetros cinéticos (K_M e V_{max}) como referência é possível afirmar que na *S. pararoseus* U3 encontra-se um conjunto de proteínas simportadoras na membrana mais eficiente. Valores baixos de K_M indica maior afinidade e V_{max} altos indica maior velocidade de captação. A *S. pararoseus* U3 possui K_M de $1,77 \text{ mmol L}^{-1}$ e V_{max} de $2,17 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}$ contra o K_M e V_{max} de $5,13 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,86 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}$, respectivamente, encontrado na *P. terricola* G20.

Tabela 1. Presença de transporte por simporte com prótons de glicose, xilose e Arabinose pela cepa *P. terricola* G20 e *S. pararoseus* U3 cultivadas em arabinose e glicose a 29 °C, 150 rpm e pH 6,5 por 12, 24 e 72 h

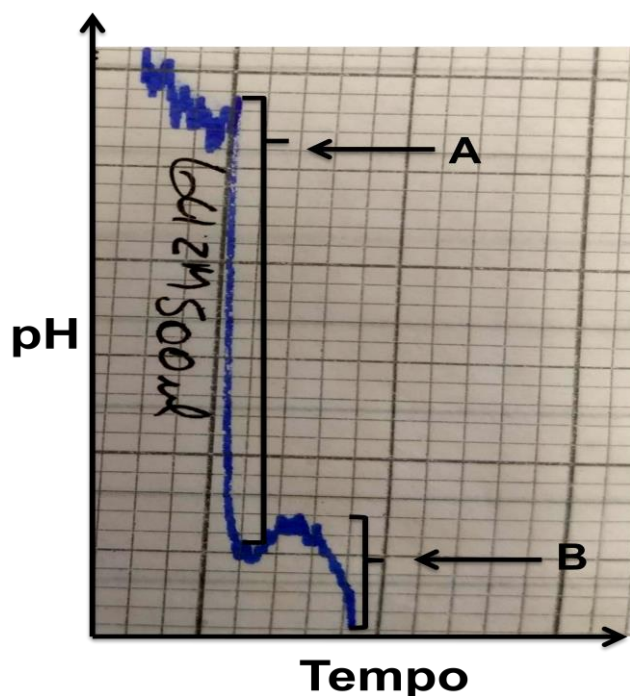
Cultivo		<i>P. terricola</i> G20			<i>S. pararoseus</i> U3		
		Simporte			Simporte		
Fonte de carbono	Horas	Glicose	Xilose	Arabinose	Glicose	Xilose	Arabinose
Arabinose	12	-	-	-	-	-	-
	24	+	-	+	-	-	-
	72	+	+	+	n.a.	n.a.	n.a.
Glicose	12	+	-	-	+	+	+
	24	+	-	-	+	+	-
	72	+	-	+	n.a.	n.a.	n.a.

n.a.: não foi realizado análise
 Fonte: autoria própria

Como já foi demonstrado em outras etapas deste trabalho, a cepa *M. koreensis* G18 é uma boa assimiladora de xilose e capaz de produzir alguns ácidos orgânicos utilizando esse açúcar. Essa levedura não é capaz de crescer utilizando arabinose como fonte de carbono e por isso foi analisada para buscar transportadores eficientes de xilose.

Em suspensão de células de *M. koreensis* G18 em meio não tamponado não houve alcalinização após adição de glicose e em alguns instantes houve a acidificação do meio extracelular (Figura 2), indicando que a glicose estava sendo metabolizada e que foi transportada para dentro da célula não por simporte de prótons, ou seja, através de difusão facilitada, provavelmente de proteínas facilitadoras da família Hxt (LEANDRO; FONSECA; GONÇALVES, 2009; REIDER APEL et al., 2016).

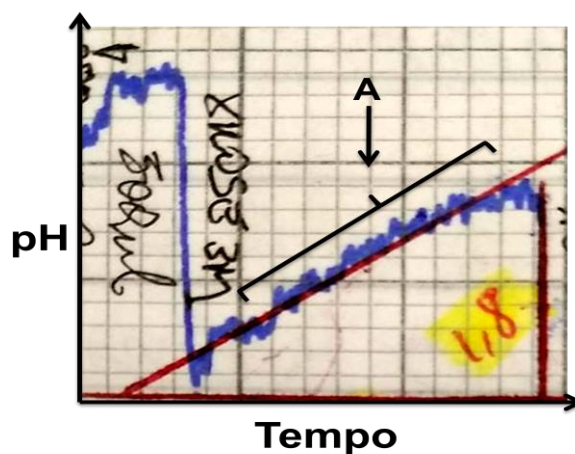
Figura 2. Registro do pH (linha azul) durante o ensaio de transporte pela *M. koreensis* G18, perturbação do sinal causado pela solução de glicose (A) e redução de pH do meio extracelular (B) após adição de glicose.



Fonte: autoria própria

Os resultados obtidos (Figura 3) demonstram que a *M. koreensis* G18 possui sistema de transporte do tipo simporte com prótons para xilose e que esses transportadores são expressos logo nas primeiras horas de cultivo utilizando glicose ou mistura de glicose e xilose (1:1). A ausência de simporte de glicose em suspensões de células de *M. koreensis* G18 cultivadas em glicose, xilose e mistura de glicose com xilose e a presença de simporte de xilose nas mesmas condições é uma evidência que pode haver simportadores específicos para xilose. Outro dado importante é que simportadores de xilose eram expressos pela *M. koreensis* G18 ainda que a glicose fosse a única fonte de carbono, sugerindo que essas proteínas transportadoras não sofrem inibição de expressão como são inibidos os genes das *hxt5* e *hxt7*, proteínas facilitadora seletivos a xilose, mas não específicos (GONÇALVES et al., 2014; SEDLAK; HO, 2004; SHARMA et al., 2018a).

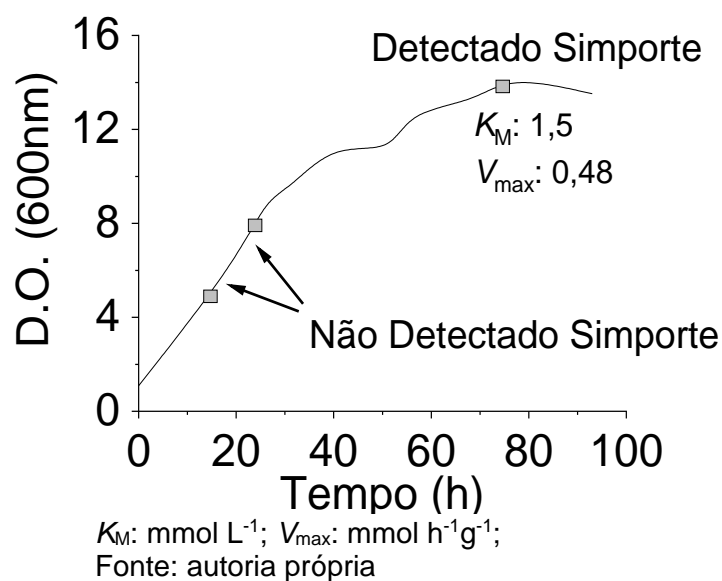
Figura 3. Registro do pH (linha azul) durante o ensaio de transporte pela *M. koreensis* G18 e alcalinização do meio extracelular (A) após adição de xilose.



Fonte: autoria própria

M. koreensis G18 expressa proteínas simportadoras de xilose quando a concentração de xilose é reduzida e mesmo quando não é disponível. Quando cultivada em xilose como única fonte de carbono não apresentou transporte de xilose por simporte em até 24 h (Figura 4). Apenas no início da fase estacionária do crescimento, em 72 h, foi detectado simporte para xilose com K_M de $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e V_{\max} de $0,48 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}$ e em 96 h ainda havia o simporte, entretanto não foi possível calculá-lo. Cultivos com glicose como única fonte de carbono e mistura de glicose e xilose (1:1), em 12 h de cultivo já havia simporte para xilose.

Figura 4. Curvas de crescimento da *M. koreensis* G18 utilizando xilose como única fonte de carbono com os momentos da análise dos parâmetros cinéticos.



A Tabela 2 traz os valores calculados dos parâmetros cinéticos do transporte de xilose pelas células de *M. koreensis* G18 cultivadas em diferentes fontes de carbono. Através dos valores de K_M obtidos vê-se que a afinidade dos transportadores é maior depois da fase exponencial do crescimento, assim como foi observado no transporte de arabinose em *P. terricola* G20 e *S. pararoseus* U3. Em cultivo com glicose o K_M em 12 h ($6,48 \text{ mmol L}^{-1}$) é aproximadamente 8 vezes maior que o K_M em 72 h ($0,76 \text{ mmol L}^{-1}$) indicando menor afinidade do sistema de transporte ao final do cultivo. Entretanto, o V_{\max} é melhor em 12 h ($0,77 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}$) (Figura 5 a). Em cultivo com mistura de glicose e xilose o V_{\max} foi aumentando até o final do cultivo, V_{\max} de $0,16 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}$ e $0,33 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}$ em 12 h e 96 h, respectivamente. E o K_M em 96 h ($2,22 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}$) pode ter sido superior ao de 72 h ($1,13 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}$) devido ao aumento de células mortas (Figura 5 b).

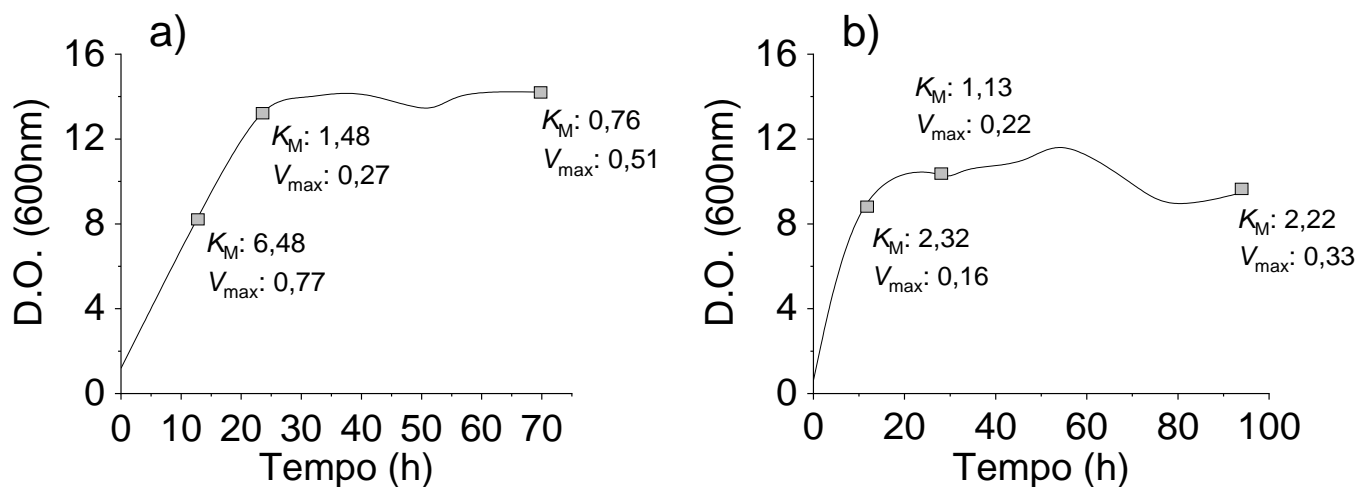
Tabela 2. Parâmetros cinéticos do transporte de xilose pela cepa *M. koreensis* G18 cultivadas em glicose, xilose e mistura de xilose e glicose a $29 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm e pH 6,5 por 12, 24, 72 e 96 h.

Horas	Simporte de Xilose					
	Cult. Glicose		Cult. Xilose		Cult. Xilose+Glicose	
	K_M	V_{\max}	K_M	V_{\max}	K_M	V_{\max}
12	6,48	0,77	n.s.	n.s.	2,32	0,16
24	1,48	0,27	n.s.	n.s.	n.a.	n.a.
72	0,76	0,51	1,5	0,48	1,13	0,22
96	n.a.	n.a.	n.c.	n.c.	2,22	0,33

K_M : mmol L^{-1} ; V_{\max} : $\text{mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}$; n.s.: não detectado simporte; n.a.: não foi realizado análise; n.c.: não foi possível calcular

Fonte: autoria própria

Figura 5. Curvas de crescimento da *M. koreensis* G18 utilizando glicose (a) como única fonte de carbono e mistura de glicose e xilose (b) com os momentos da análise dos parâmetros cinéticos.



K_M : mmol L⁻¹; V_{max} : mmol h⁻¹g⁻¹;

Fonte: autoria própria

Assume-se para todas as leveduras estudadas, os dados obtidos referem-se ao conjunto de proteínas simportadoras presentes na membrana das células atuando em conjunto. Embora os parâmetros cinéticos não representem a afinidade ou velocidades de transporte de proteínas específicas nas células, esses resultados oferecem um direcionamento preciso a quais situações de cultivos as cepas poderiam estar expressando transportadores específicos e eficientes. Outra informação importante que pode ser extraída desses resultados é que a levedura *M. koreensis* G18 pode ser a primeira levedura registrada a consumir simultaneamente pentoses e hexoses.

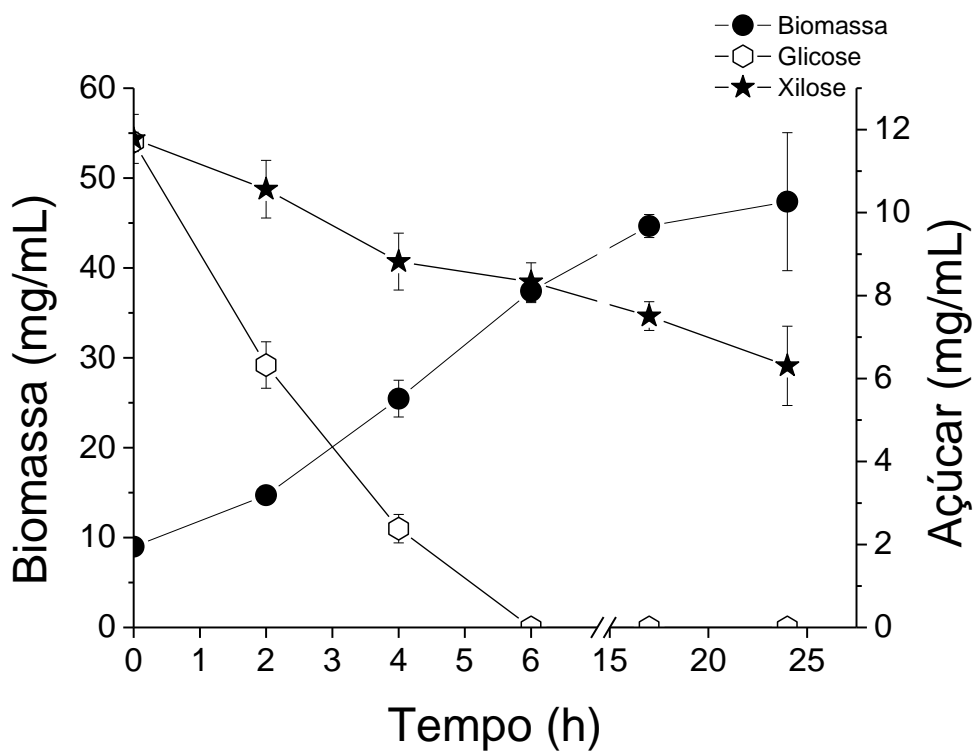
3.2. Avaliação do perfil de consumo de xilose e glicose da levedura *M. koreensis* G18 cultivada em xilose, glicose e mistura de xilose e glicose (1:1).

Em trabalhos que buscavam proteínas transportadoras específicas de xilose relataram que quando as leveduras eram cultivadas em glicose não era observado transporte de alta especificidade a xilose (LEANDRO et al., 2006; SHARMA et al., 2018a). Na literatura não há relato de captação simultânea de xilose e glicose e há trabalhos que explicam que isso não ocorre devido às inibições (competitiva e de expressão) que a glicose causa sobre as proteínas transportadoras de xilose (BOLES; HOLLENBERG, 1997; GANCEDO, 1998; KIM et al., 2012). Portanto, a incomum presença de um sistema de transporte de xilose de alta especificidade (K_M

de $0,76 \text{ mmol L}^{-1}$, Tabela 2) apresentado pela cepa *M. koreensis* G18 cultivada em glicose permite a hipótese de que essa levedura consome simultaneamente glicose e xilose (KIM et al., 2012).

A hipótese foi confirmada através de ensaios de cultivos da *M. koreensis* G18 em meios de cultura com ambos os açúcares como fonte de carbono. Foi registrado (Figura 6) a redução da concentração de xilose residual no meio de cultivo no mesmo período em que a concentração de glicose também diminuiu nas primeiras 5 h de cultivo.

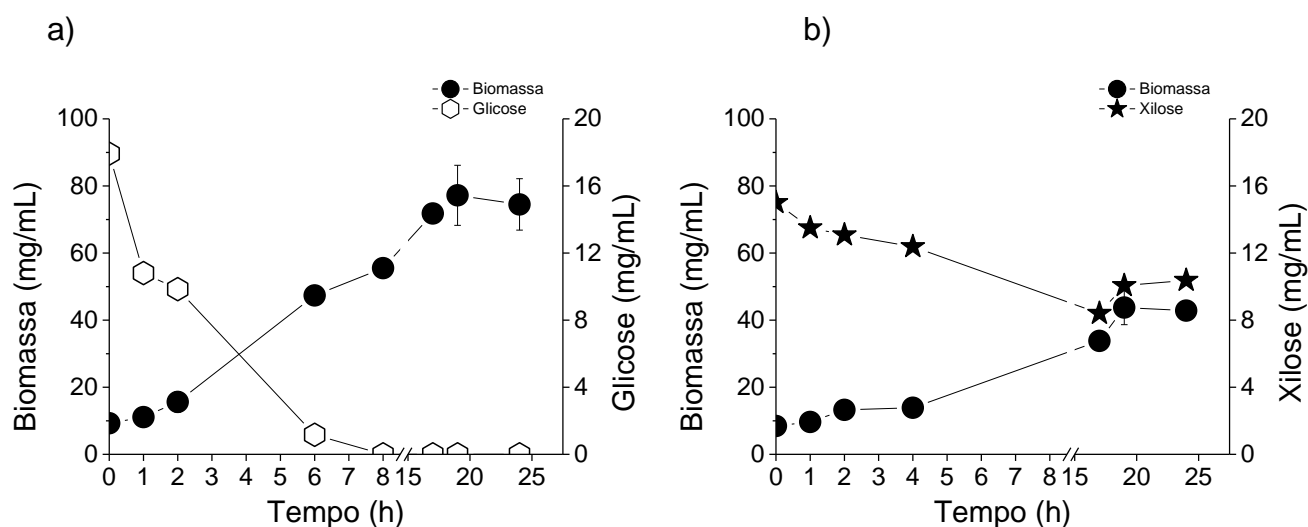
Figura 6. Crescimento e concentração de xilose e glicose durante o cultivo da *M. koreensis* G18 em meio com mistura de xilose e glicose (1:1).



Fonte: autoria própria

Comparando os cultivos da *M. koreensis* G18 em meio contendo somente glicose (Figura 7 a) ou xilose (Figura 7 b) com o meio misto (Figura 6) pode verificar a influência na taxa de consumo que os açúcares causam entres eles. Os dados da Tabela 3 mostram que há um efeito negativo na taxa de consumo tanto na glicose quanto na xilose quando esses açúcares estão disponíveis juntos.

Figura 7. Crescimento e concentração de xilose glicose durante o cultivo da *M. koreensis* G18 em meio com glicose (a) e xilose (b).



Fonte: autoria própria

Tabela 3. Biomassa, açúcar consumido e taxa de consumo nas primeiras 2 horas de cultivo da *M. koreensis* G18 em meios com glicose, xilose e mistura de glicose e xilose (1:1).

Fonte de Carbono	Rendimento	Açúcar Consumido	Taxa de Cons. Glicose	Taxa de Cons. Xilose	Taxa de Cons. Açúcar
Glicose	0,8	8,1	4,1		4,1
Xilose	2,5	1,9		1,4	1,4
Glic. e Xil.	0,9	6,6	0,5	0,1	0,6

Rendimento em mg de biomassa/mg de açúcar consumido; Açúcar consumido em mg/mL; Taxa de consumo em mg de açúcar/mg de biomassa/h

Fonte: autoria própria

Foi avaliado as primeiras horas de cultivo de todos os cultivos, pois é o período em que há maior semelhança na disponibilidade de açúcar no meio. A taxa de consumo de açúcar é menor quando há mistura de xilose e glicose. Em glicose, xilose e glicose e xilose (1:1) a taxa de consumo atinge 4,1, 1,4 e 0,6 mg/mg/h, respectivamente. Há uma queda de aproximadamente 8 vezes na taxa de consumo de glicose e 14 vezes a taxa de consumo de xilose.

Quanto a xilose, era previsível o impacto negativo a sua captação na presença de glicose, mas não o oposto, pois é conhecido os mecanismos de inibição causado pelas hexoses (GÁRDONYI et al., 2003; LEANDRO et al., 2006; SHARMA et al., 2018b) e foi observado o menor V_{\max} no cultivo em mistura de glicose e xilose ($0,16 \text{ mmol h}^{-1}\text{g}^{-1}$, Tabela 2). Contudo, ainda que a glicose comprometeu a captação de xilose, não causou a inibição completa o que sugere a presença de proteínas de transporte especiais. Os resultados permitem afirmar que a *M. koreensis* G18 é primeira levedura não modificada geneticamente registrada com consumo de uma pentose simultâneo ao de uma hexose.

4. CONCLUSÕES

Utilizar glicose como única fonte de carbono resulta em sistema de transporte mais eficientes e não impede a expressão de transportadores de pentoses do tipo simporte com prótons.

P. terricola G20, *S. pararoseus* U3 transporta arabinose por proteínas do tipo simporte de prótons.

S. pararoseus U3 possui um sistema de transporte de mais afinidade que *P. terricola* G20.

Durante a fase estacionária do crescimento encontra-se os menores valores de K_M no transporte de xilose.

M. koreensis G18 utiliza proteínas simportadoras de prótons para transportar xilose enquanto que não utiliza para glicose.

M. koreensis G18 pode possuir transportadores de membrana específicos para xilose que não é inibido pela glicose.

M. koreensis G18 por expressar transportadores de membrana de xilose na presença de glicose é capaz de consumir simultaneamente xilose e glicose.

REFERÊNCIAS

- BOLES, E.; HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 85–111, 1997. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00346.x>>. Acesso em: 15 nov. 2016.
- DE SALES, B. B.; SCHEID, B.; GONÇALVES, D. L.; KNYCHALA, M. M.; MATSUSHIKA, A.; BON, E. P. S.; STAMBUK, B. U. Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing d-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 1973–1982, 2015.
- DU PREEZ, J. C.; PRIOR, B. A. A quantitative screening of some xylose-fermenting yeast isolates. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 241–246, 1985.
- FONSECA, C.; OLOFSSON, K.; FERREIRA, C.; RUNQUIST, D.; FONSECA, L. L.; HAHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G. The glucose/xylose facilitator Gxf1 from *Candida intermedia* expressed in a xylose-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* increases xylose uptake in SSCF of wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 48, n. 6–7, p. 518–525, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022911000378>>. Acesso em: 17 fev. 2017.
- GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 334–61, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98918&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 nov. 2015.
- GÁRDONYI, M. A.; ÖSTERBERG, M. A.; RODRIGUES, C.; SPENCER-MARTINS, I.; HAHN-HÄGERDAL, B. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 45–52, 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713560200137X>>. Acesso em: 15 nov. 2016.
- GONÇALVES, D.; MATSUSHIKA, A.; DE SALES, B.; LAGOS, M.; GOSHIMA, T.; STAMBUK, B. Influence of individual HXT transporters in xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. **BMC Proceedings**, [s. l.], v. 8, n. Suppl 4, p. P209, 2014.
- KIM, S. R.; HA, S. J.; WEI, N.; OH, E. J.; JIN, Y. S. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: A promising strategy for producing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 274–282, 2012.
- KIM, S. R.; PARK, Y.-C.; JIN, Y.-S.; SEO, J.-H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 851–861, 2013.
- KWAK, S.; JO, J. H.; YUN, E. J.; JIN, Y. S.; SEO, J. H. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 271–283, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975018302015>>. Acesso em: 23 set. 2019.
- LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: An overview. **FEMS Yeast Research**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 511–525, 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567->

1364.2009.00509.x>. Acesso em: 11 jun. 2019.

LEANDRO, M. J.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 395, n. 3, p. 543–549, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16402921>>. Acesso em: 22 mar. 2019.

MARTINS, G. M. **Estudo do comportamento fisiológico de cepas de leveduras frente às condições do meio de cultivo visando processos de fermentação alcoólica**. 2015. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, [s. l.], 2015.

MARTINS, G. M.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; BEZZERRA-BUSSOLI, C.; PAGNOCCA, F. C.; BOSCOLO, M.; MONTEIRO, D. A.; SILVA, R. Da; GOMES, E. The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 162–168, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838216303653?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 set. 2018.

PEREIRA, I.; MADEIRA, A.; PRISTA, C.; LOUREIRO-DIAS, M. C.; LEANDRO, M. J. Characterization of new polyol/H⁺ symporters in *Debaryomyces hansenii*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. e88180, 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0088180>>

RAMOS, J.; SYCHROVÁ, H.; KSCHISCHO, M. **Yeast Membrane Transport**. Cham Heidelberg New York Dordrecht London: Springer International Publishing, 2016. v. 892. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-25304-6>>. Acesso em: 3 out. 2018.

REIDER APEL, A.; OUELLET, M.; SZMIDT-MIDDLETON, H.; KEASLING, J. D.; MUKHOPADHYAY, A. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 19512, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep19512>>. Acesso em: 6 out. 2017.

REIS, T. F. Dos; MENINO, J. F.; BOM, V. L. P.; BROWN, N. A.; COLABARDINI, A. C.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H. S.; RODRIGUES, F.; GOLDMAN, G. H. Identification of glucose transporters in *Aspergillus nidulans*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1–15, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0081412>>. Acesso em: 27 nov. 2015.

RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RÅDSTRÖM, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, [s. l.], v. 3, p. 5, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2851583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 nov. 2015.

SEDLAK, M.; HO, N. W. Y. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. **Yeast**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 671–684, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/yea.1060>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

SHARMA, N. K.; BEHERA, S.; ARORA, R.; KUMAR, S.; SANI, R. K. Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 125, n. 3, p. 346–352, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172317305431?via%3Dihub>>. Acesso em: 3 out. 2018.

SHARMA, S.; VARGHESE, E.; ARORA, A.; SINGH, K. N.; SINGH, S.; NAIN, L.; PAUL, D.

Augmenting pentose utilization and ethanol production of native *Saccharomyces cerevisiae* LN using medium engineering and response surface methodology. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 6, n. SEP, 2018. b.

VIANA, T.; LOUREIRO-DIAS, M. C.; LOUREIRO, V.; PRISTA, C. Peculiar H⁺ homeostasis of *saccharomyces cerevisiae* during the late stages of wine fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 78, n. 17, p. 6302–6308, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752170>>. Acesso em: 12 abr. 2019.

WANG, C.; BAO, X.; LI, Y.; JIAO, C.; HOU, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; LIU, W.; SHEN, Y. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 30, p. 79–88, 2015.

WANG, C.; SHEN, Y.; HOU, J.; SUO, F.; BAO, X. An assay for functional xylose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 442, n. 2, p. 241–248, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326971300359X>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

WEIERSTALL, T.; HOLLENBERG, C. P.; BOLES, E. Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 871–883, 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.1999.01224.x>>. Acesso em: 9 fev. 2017.

YOUNG, E. M.; COMER, A. D.; HUANG, H.; ALPER, H. S. A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 401–411, 2012. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717612000298>>. Acesso em: 15 nov. 2016.