

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 06/09/2021

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.

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, lático, 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 <i>S. pararoseus</i> 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 <i>P. terricola</i> 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 <i>S. pararoseus</i> 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 <i>P. terricola</i> 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 <i>S. pararoseus</i> U3 em cultura com compostos potencialmente tóxicos.....	50
Figura 6	Densidade óptica máxima atingida por <i>P. terricola</i> G20 em cultura com compostos potencialmente tóxicos.....	51
Figura 7	Teste de crescimento de <i>S. pararoseus</i> U3 em material tratado e hidrolisado: Máxima D.O. após 72 h de cultivo.....	52
Figura 8	Teste de crescimento de <i>P. terricola</i> 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 <i>M. koreensis</i> G18: D.O. em meio com xilose, arabinose e glicose, a 29 °C.....	69
Figura 5	Crescimento da <i>M. koreensis</i> 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 <i>M. koreensis</i> 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*

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. 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.

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.