

**PÂMELA CARVALHO LOBATO**

**ANÁLISE DA ASSIMILAÇÃO DE GLICOSE E XILOSE EM *Papiliotrema laurentii*  
UFV-1**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Wendel Batista da Silveira

Coorientadora: Rafaela Zandonade Ventorim

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L796a Lobato, Pâmela Carvalho, 1991-  
2022 Análise da assimilação de glicose e xilose em *Papiliotrema laurentii* UFV-1 / Pâmela Carvalho Lobato. – Viçosa, MG, 2022.  
1 dissertação eletrônica (61 f.): il.

Inclui apêndice.

Orientador: Wendel Batista da Silveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Microbiologia, 2022.

Referências bibliográficas: f. 47-53.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.306>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Leveduras. 2. Biocombustíveis. 3. 2-deoxiglicose.  
4. Metabolismo. I. Silveira, Wendel Batista da, 1979-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.563

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

PÂMELA CARVALHO LOBATO

ANÁLISE DA ASSIMILAÇÃO DE GLICOSE E XILOSE EM *Papiliotrema laurentii*  
UFV-1

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de fevereiro de 2022.

Assentimento:

Pâmela Carvalho Lobato  
Pâmela Carvalho Lobato  
Autora

Wendel Batista da Silveira  
Wendel Batista da Silveira  
Orientador

*Aos meus pais, Cida e Juarez Lobato, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus, aos meus pais por sempre terem me dado todo o suporte necessário. Ao meu irmão por ser exemplo no quesito estudos. À família Carvalho pelo exemplo de força e luta. À família Lobato pelo amor e carinho. Ao Túlio por sempre estar presente e disposto a ajudar. A Vívía por tudo que representa na minha vida.

A seguir quero agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica e desenvolvimento desse trabalho:

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação, ao Departamento de Microbiologia Agrícola por todas as contribuições e ensinamentos ao longo desses anos de estudo.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Wendel Batista da Silveira pela orientação, oportunidade, paciência, apoio e principalmente, por todo conhecimento compartilhado.

A Marisa Vieira de Queiroz pelas sugestões fornecidas ao projeto e contribuições para o desenvolvimento do procedimento de mutagênese.

A Rafaela Zandonade Ventorim pelas valiosas contribuições, por todo apoio, troca de aprendizados ao longo dos experimentos e correções do projeto.

Aos componentes da banca de defesa, Nívea Moreira Vieira e Robson de Assis Souza agradeço antecipadamente pela leitura, correções e orientações fornecidas ao trabalho.

A todos os professores que me inspiraram ao longo de todo o curso.

Aos membros do LabFis pelo convívio. Agradecimento especial a Nívea, técnica do laboratório pelo convívio e auxílios gentilmente prestados.

Aos amigos que fiz em Viçosa. Em especial a Bia pela valiosa ajuda em estatística; a Jéssica, Nataly, e Yan por compartilharem tantos momentos; as meninas da república pela

parceria; a Keyla pelo apoio e torcida; a Luana e o Allan aos quais tenho grande carinho e ao Diego uma das melhores pessoas que já conheci.

Por fim, agradeço a todos e todas que contribuíram de alguma forma para a conclusão desse trabalho. Meu mérito é tanto quanto de vocês.

Obrigada!

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

Chico Xavier.

## RESUMO

LOBATO, Pâmela Carvalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Análise da assimilação de glicose e xilose em *Papiliotrema laurentii* UFV-1.** Orientador: Wendel Batista da Silveira. Coorientadora: Rafaela Zandonade Ventorim.

A assimilação dos açúcares constituintes de biomassas lignocelulósicas é essencial para a produção de óleo por leveduras oleaginosas em biorrefinarias. Este óleo pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de biocombustíveis derivados de ácidos graxos, contribuindo para atender à crescente demanda por biocombustíveis. *P. laurentii* UFV-1 é uma levedura oleaginosa capaz de converter glicose e xilose, os principais açúcares constituintes de biomassas lignocelulósicas, em óleo. O consumo simultâneo desses açúcares é primordial para se alcançar uma alta produtividade volumétrica de lipídios em biorrefinarias. Portanto, este estudo objetivou: i) analisar o perfil de consumo de glicose e xilose em *P. laurentii* UFV-1, e ii) selecionar linhagens mutantes capazes de assimilar glicose e xilose simultaneamente. O cultivo da levedura em meio mínimo *Yeast Nitrogen Base* (YNB) contendo diferentes concentrações de glicose e xilose permitiu estimar os parâmetros cinéticos do modelo de Monod. Os valores da constante de saturação (Ks) foram similares para as duas fontes de carbono e energia. Apesar de apresentar afinidades similares por glicose e xilose, *P. laurentii* UFV-1 consome glicose preferencialmente quando cultivada na presença dos dois açúcares. Esta linhagem foi submetida à mutagênese por irradiação ultravioleta, e linhagens mutantes foram selecionadas em meio de cultura contendo 2-deoxiglicose (2DG), análogo da glicose que induz a repressão catabólica, mas não é metabolizado. Dentre as vinte e quatro linhagens mutantes selecionadas, a linhagem M17 destacou-se por ter atingido uma maior densidade populacional no cultivo contendo 4 mM de 2DG. Surpreendentemente, as linhagens M17 e selvagem apresentaram o mesmo perfil de consumo de glicose e xilose. Isto indica a sua susceptibilidade à repressão por glicose. Todavia, o consumo simultâneo de xilose e 2DG mostra que a linhagem mutante é insensível à repressão catabólica induzida por 2DG. Este resultado sugere que as alterações genéticas que ocorreram na linhagem mutante foram específicas para aliviar a repressão catabólica causada somente por 2DG. O mutante M17 apresentou perfis de produção de lipídios e de crescimento nas temperaturas de 30 °C e 37 °C similares aos da linhagem selvagem de *P. laurentii*. Em relação à linhagem selvagem, observou-se que nas primeiras 24 horas de cultivo, o consumo de xilose foi reprimido na presença de 2DG. Após este período, ocorreu a secreção de 2DG, a qual foi acompanhada pelo consumo de

xilose, indicando que a levedura apresenta um mecanismo tardio para contornar o efeito de repressão catabólica causado pelo análogo da glicose.

**Palavras-chave:** Leveduras oleaginosas. Biorrefinarias. Repressão catabólica. 2-deoxiglicose. Metabolismo.

## ABSTRACT

LOBATO, Pâmela Carvalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2022. **Analysis of glucose and xylose assimilation in *Papiliotrema laurentii* UFV-1.** Adviser: Wendel Batista da Silveira. Co-adviser: Rafaela Zandonade Ventorim

The assimilation of the constituent sugars of lignocellulosic biomasses is pivotal for the production of oil by oleaginous yeasts in biorefineries. This oil can be used as a raw material for the production of fatty acid-derived biofuels, contributing to meet the rising demand for biofuels. *P. laurentii* UFV-1 is an oleaginous yeast capable of converting glucose and xylose, the main constituent sugars of lignocellulosic biomass, into lipids. The simultaneous consumption of these sugars is essential to achieve a high volumetric productivity of lipids in biorefineries. Therefore, this study aimed to: i) analyze the glucose and xylose consumption profile in *P. laurentii* UFV-1, and ii) select mutant strains capable of assimilating glucose and xylose simultaneously. Yeast cultivation in minimal medium Yeast Nitrogen Base (YNB) containing different concentrations of xylose and glucose allowed to estimate the kinetic parameters of the Monod model. The values of the saturation constant (K<sub>s</sub>) were similar for the two sources of carbon and energy. Even though *P. laurentii* UFV-1 displays similar affinities for glucose and xylose, glucose is preferentially consumed when it is cultivated in the presence of both sugars. This strain was subjected to mutagenesis by ultraviolet irradiation, and mutant strains were selected in a culture medium containing 2-deoxyglucose (2DG), a glucose analogue that induces catabolic repression but is not metabolized. Among the 24 mutant strains selected, the M17 strain stood out due to its capacity to achieve a higher cell density in cultivation containing 4 mM of 2DG. Surprisingly, both M17 and wild-type strains presented the same profile of xylose and glucose consumption. This indicates its susceptibility to glucose repression. However, the simultaneous consumption of xylose and 2DG shows that the mutant strain is insensitive to the catabolic repression induced by 2DG. This result suggests that the genetic alterations that occurred in the mutant strain were specific to alleviate the catabolic repression caused only by 2DG. Both M17 and wild-type strains presented similar profiles of lipid production and growth at temperatures of 30 °C and 37 °C. Regarding the wild strain, it was observed that in the first 24 hours of cultivation, the consumption of xylose was repressed in the presence of 2DG. After this period, the secretion of 2DG occurred along with the consumption of xylose, indicating that the yeast has a late mechanism to circumvent the catabolic repression effect caused by the glucose analogue.

**Keywords:** Oleaginous yeasts. Biorefineries. Catabolic repression. 2-deoxyglucose. Metabolism.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1 - Regulação de genes transportadores de hexoses em resposta à concentração de glicose no meio.** Na ausência de glicose, Rgt1 reprime a transcrição de *HXT1-4*. Baixas concentrações de glicose no meio inibem a atividade repressora de Rgt1, processo desencadeado por Snf3 via ubiquitinação mediada por Grr1. Em altas concentrações de glicose, Rgt2 desencadeia a expressão de *HXT1*. Por outro lado, os genes *HXT2*, *HXT4*, *SNF3*, *HXT6* e *HXT7* são reprimidos por Mig1 através da via principal de repressão de glicose. Além disso, Snf3 está envolvido em uma segunda via que leva à repressão de *HXT6* induzida por altas concentrações de glicose (Fonte: Rolland *et al.*, 2002).....22

**Figura 2 - Parâmetros cinéticos de crescimento de *P. laurentii* UFV-1 cultivada em meio mínimo YNB: contendo glicose (A) ou xilose (B) com concentrações variando de 1 a 15 mM.**.....34

**Figura 3 - Perfil de crescimento e consumo de açúcares de *P. laurentii* UFV-1 cultivada em meio mínimo YNB acrescido de glicose e/ou xilose:** (A) xilose 100 mM; (B) glicose 102 mM; (C) glicose 27 mM; (D) glicose 78 mM e xilose 88 mM e (E) glicose 13 mM e xilose 91 mM. ○- Crescimento (ln DO<sub>600nm</sub>); ●- Concentração de xilose (mM); e ▲ - Concentração de glicose (mM). Os dados apresentados são médias e os respectivos desvios-padrão dos cultivos realizados em triplicatas.....37

**Figura 4 - Perfil de crescimento e consumo de açúcares de cada linhagem cultivada em meio mínimo YNB acrescido de 56 mM de glicose:** (A) *P. laurentii* UFV-1; (B) M17. ○- Crescimento (ln DO<sub>600nm</sub>) e ▲- Concentração de glicose (mM). Os dados apresentados são médias e os respectivos desvio-padrão dos cultivos realizados em triplicatas.....40

**Figura 5 - Perfil de crescimento e consumo de açúcares de cada linhagem cultivada em meio mínimo YNB acrescido de 67 mM de xilose:** (A) *P. laurentii* UFV-1; (B) M17. ○- Crescimento (ln DO<sub>600nm</sub>) e ●- Concentração de xilose (mM). Os dados apresentados são médias e os respectivos desvio-padrão dos cultivos realizados em triplicatas.....40

**Figura 6 - Perfil de crescimento e consumo de açúcares das linhagens selvagem e mutante cultivadas em meio mínimo YNB acrescido de 56 mM de glicose e 67 mM de xilose:** (A) *P. laurentii* UFV-1; (B) M17. ○- Crescimento (ln DO<sub>600nm</sub>); ●- Concentração de xilose (mM); e

▲ - Concentração de glicose (mM). Os dados apresentados são médias e os respectivos desvio-padrão dos cultivos realizados em triplicatas.....41

**Figura 7 - Perfil de crescimento e consumo de açúcares das linhagens selvagem e mutante cultivadas em meio mínimo YNB acrescido de 133 mM de xilose e 4 mM de 2DG: (A) *P. laurentii* UFV-1; (B) M17. ○- Crescimento ( $\ln DO_{600nm}$ ); ●- Concentração de xilose (mM); e ▲ - Concentração de 2-DG (mM). Os dados apresentados são médias e os respectivos desvio-padrão dos cultivos realizados em triplicatas.....42**

**Figura 8 - Avaliação do crescimento de *P. laurentii* UFV-1 e a linhagem M17 sob diferentes temperaturas: (A) cultivo em meio mínimo, acrescido de 111 mM de glicose e (B) 133 mM de xilose, a linhagem selvagem foi inoculada na parte superior das placas, seguida pela M17 na parte inferior de cada placa.....45**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Parâmetros de crescimento de *P. laurentii* UFV-1 cultivada em meio mínimo YNB contendo diferentes concentrações de glicose, xilose e uma mistura destes dois açúcares.....36
- Tabela 2** - Valores de densidade óptica das 14 linhagens selecionadas em 4,3 mM de 2DG. As linhagens mutantes e selvagem foram cultivadas em meio YNB suplementado por 133 mM de xilose e 4 mM de 2DG e incubadas a 30 °C e 200 rpm por 5 dias.....39
- Tabela 3** - Taxa específica de crescimento de cada linhagem de levedura em função de cultivo em meio YNB suplementado com 56 mM de glicose e/ou 67 mM de xilose, incubado a 30 °C a 200 rpm.....41
- Tabela 4** - Parâmetros de crescimento e de produção de lipídios da linhagem selvagem e mutante cultivadas em meio SS2 com alta razão carbono: nitrogênio (C/N = 100:1). A concentração de lipídios e o teor de lipídios foram quantificados no período de 48 h de cultivo.....44

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1.	Produção de óleo microbiano em biorrefinarias.....	18
2.2.	Características fisiológicas de leveduras oleaginosas e metabolismo de lipídios.....	19
2.3.	Transportes de glicose e xilose em leveduras.....	20
2.4.	Repressão catabólica em leveduras.....	23
2.5.	<i>Papiliotrema laurentii</i> .....	26
3.	OBJETIVOS	27
4.	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1.	Micro-organismo e manutenção.....	27
4.2.	Meios de cultura e preparo de inóculo.....	28
4.3.	Determinação da concentração mínima inibitória de 2DG.....	29
4.4.	Mutagênese.....	29
4.5.	Seleção de linhagens mutantes.....	30
4.6.	Estimação de parâmetros cinéticos do Modelo de Monod.....	31
4.7.	Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento da linhagem selvagem.....	31
4.8.	Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento das linhagens selvagem e mutante.....	31
4.9.	Análise do consumo de açúcares.....	32
4.10.	Efeito de 2DG sobre o metabolismo de xilose.....	32
4.11.	Influência da temperatura.....	32
4.12.	Determinação do teor de lipídios.....	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1.	Análise da repressão por glicose sobre o metabolismo de xilose em <i>P. laurentii</i> UFV-1.....	34
5.2.	Obtenção de linhagens mutantes capazes de crescer em meios de cultivo contendo xilose e 2-deoxiglicose.....	38
5.3.	Caracterização fisiológica do isolado M17 obtido após mutagênese.....	39
5.3.1	Determinação da velocidade específica de crescimento e análise do consumo de açúcares.....	39
5.3.2	Avaliação do efeito de 2DG no metabolismo de xilose.....	42

5.3.3	Comparação do teor de lipídios entre as linhagens selvagem e M17 de <i>P. laurentii</i> UFV-1.....	43
5.3.4	Avaliação do efeito da temperatura sobre o crescimento das linhagens selvagem e M17 de <i>P. laurentii</i> UFV-1.....	45
6	CONCLUSÕES	46
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
8	APÊNDICE	54

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de óleo por leveduras a partir de matérias-primas lignocelulósicas é de interesse em biorrefinarias, pois este óleo pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de biocombustíveis derivados de ácidos graxos, como por exemplo, o biodiesel. Nesse sentido, a co-fermentação de glicose e xilose, principais açúcares constituintes de biomassas lignocelulósicas, é importante para aumentar a produção de lipídios. Em geral, o consumo de xilose em leveduras inicia após o completo consumo de glicose, prolongando o tempo de produção de lipídios em meios de fermentação contendo glicose e xilose. A utilização preferencial de glicose pode estar relacionada ao fenômeno de repressão catabólica ou ocorrer em função do transporte preferencial de glicose.

A via de sinalização da repressão catabólica é bem caracterizada na levedura modelo *Saccharomyces cerevisiae*. Contudo, pouco se sabe sobre essa regulação em outras espécies de leveduras. Em *S. cerevisiae*, a proteína quinase Snf1 desempenha um papel central na via de sinalização da repressão catabólica. Além de Snf1, a proteína repressora Mig1, alvo da Snf1, destaca-se por atuar na repressão de genes associados à assimilação de fontes de carbono alternativas à glicose (Shashkova *et al.*, 2015). Na ausência de glicose, a Snf1 é ativada por fosforilação o que levará ao seu acúmulo no núcleo, onde promoverá a fosforilação da proteína Mig1. Como resultado, a Mig1 é translocada do núcleo para o citoplasma, aliviando a repressão de genes que codificam enzimas de vias de assimilação de fontes de carbono e energia. Por outro lado, a quinase Snf1 é inativada na presença de glicose, assim, a repressora Mig1 permanece no núcleo reprimindo a expressão gênica. Recentemente, foi demonstrado por Hua *et al.* (2019) que a deleção do gene que codifica a proteína Mig1 em *Kluyveromyces marxianus* não aliviou a repressão exercida por glicose sobre a utilização de xilose, indicando que há diferenças nas vias de sinalização entre leveduras.

As leveduras podem transportar uma variedade de açúcares através de transportadores de açúcares. A proteína transportadora também é capaz de transportar a pentose xilose. Em geral, o transporte de xilose de baixa afinidade em leveduras ocorre por difusão facilitada. Por outro lado, o transporte de xilose de alta afinidade ocorre por meio do mecanismo simporte, o qual é específico para xilose.

*Papiliotrema laurentii* UFV-1 é uma levedura oleaginosa capaz de assimilar xilose e alcançar um alto teor de lipídios (63,5% m/m) em meio contendo xilose em condições

otimizadas: razão C/N = 100:1, valor de pH = 7,0, DO<sub>600nm</sub> inicial = 0,8 e agitação = 300 rpm (Vieira *et al.*, 2020). Em outro trabalho, Vieira (2018) observou que o crescimento desta levedura foi inibido na presença de 2-deoxiglicose, análogo da glicose, e xilose, indicando a sua susceptibilidade à repressão por glicose, o que é indesejável para aumentar a produtividade volumétrica de lipídios. Portanto, faz-se necessário compreender como a glicose influencia o metabolismo de xilose nessa levedura, o que é importante para a sua aplicação em biorrefinarias lignocelulósicas. Sendo assim, o presente trabalho objetivou analisar o perfil de consumo de glicose e xilose em *P. laurentii* UFV-1 e selecionar linhagens mutantes de *P. laurentii* UFV-1 capazes de assimilar glicose e xilose simultaneamente.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Produção de óleo microbiano em biorrefinarias

Nas últimas décadas, atenção especial tem sido dada à produção de óleo por leveduras em biorrefinarias, que são unidades de processamento de biomassas vegetais abundantes, como as lignocelulósicas (Parsons *et al.*, 2020).

A estrutura lignocelulósica é organizada em um complexo estrutural composto por três polímeros: lignina, celulose e hemicelulose (Chen *et al.*, 2021). A lignina é formada por compostos fenólicos e confere resistência às biomassas lignocelulósicas contra degradação química ou biológica. As frações de celulose e hemicelulose são polissacarídeos, sendo o primeiro composto por longas cadeias de moléculas de glicose e o segundo por pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, glicose e galactose) (Fatehi *et al.*, 2013). Esses polissacarídeos podem ser hidrolisados e os açúcares liberados são utilizados como fonte de carbono e energia por micro-organismos em bioprocessos (Parsons *et al.*, 2020).

Devido à sua estrutura recalcitrante, biomassas lignocelulósicas são submetidas a uma etapa de pré-tratamento que visa tornar os seus constituintes mais acessíveis à ação de enzimas hidrolíticas (Chen *et al.*, 2021). Na etapa de sacarificação ocorre a hidrólise enzimática da celulose e/ou hemicelulose, liberando açúcares fermentáveis que são metabolizados por micro-organismos e convertidos em bioprodutos na etapa de fermentação (Fatehi *et al.*, 2013).

O processo de sacarificação e co-fermentação simultâneas de hexoses e pentoses (SSCF), açúcares provenientes da hidrólise da celulose e hemicelulose, é considerado promissor para o aproveitamento integral da biomassa lignocelulósica (Costa *et al.*, 2014). Neste processo, as etapas de sacarificação desses polissacarídeos e formação de bioprodutos ocorre simultaneamente. Os estudos envolvendo o processo SSCF para a produção de lipídios ainda são limitados quando comparados com a produção de etanol (Yu *et al.*, 2014).

Em geral, leveduras assimiladoras de xilose apresentam o fenômeno de repressão catabólica. Sendo assim, no cultivo dessas leveduras em meios contendo glicose e xilose, a xilose é consumida após o esgotamento da glicose, o que resulta em um processo longo e, portanto, com baixa taxa de produção de bioprodutos (Li *et al.*, 2016). Dessa forma, a obtenção de linhagens capazes de utilizar simultaneamente hexoses e pentoses é crucial para o desenvolvimento do processo SSCF em biorrefinarias (Costa *et al.*, 2014).

## 2.2. Características fisiológicas de leveduras oleaginosas e metabolismo de lipídios

São conhecidas mais de 1600 espécies de leveduras, das quais cerca de 5% apresentam o fenótipo oleaginoso (Kamineni & Shaw, 2020). Leveduras oleaginosas são micro-organismos capazes de acumular valores acima de 20% da sua massa seca na forma de lipídios (Klug & Daum, 2014). Estas leveduras pertencem ao filo Ascomycota: gêneros *Candida*, *Cyberlindnera*, *Geotrichum*, *Kodamaea*, *Lipomyces*, *Magnusiomyces*, *Metschnikowia*, *Trigonopsis*, *Wickerhamomyces* e *Yarrowia*; e Basidiomycota: gêneros *Cryptococcus*, *Guehomyces*, *Leucosporidiella*, *Pseudozyma*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* (Sitepu *et al.*, 2013).

O acúmulo de lipídios em leveduras é desencadeado pela elevada razão carbono:nitrogênio (Kamineni & Shaw, 2020), e se inicia nas fases de desaceleração ou estacionária de crescimento (Qiao *et al.*, 2015). Além da limitação de nitrogênio, a limitação de outros nutrientes tais como enxofre, oxigênio e fósforo favorecem o acúmulo de lipídios (Kamineni & Shaw, 2020).

A limitação por nitrogênio leva à diminuição de adenosina monofosfato (AMP) na célula, sendo convertida em inosina monofosfato (IMP) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). A diminuição da concentração de AMP inibe a ação da enzima isocitrato desidrogenase, levando ao acúmulo de citrato (Adrio, 2017), o qual é transportado da mitocôndria para o citosol, onde é clivado em oxaloacetato e acetil-CoA, na reação catalisada pela enzima ATP citrato-liase. Acetil-CoA é o composto precursor para a síntese de ácidos graxos. Por meio da enzima acetil-CoA carboxilase, acetil-CoA entra na via de síntese de ácidos graxos (Papanikolaou & Aggelis, 2011). Por ação da enzima málica, o oxaloacetato é reduzido a malato, o qual pode ser utilizado para produzir NADPH, poder redutor necessário para a síntese de ácidos graxos (Tiukova *et al.*, 2019). Em leveduras, a produção de ácidos graxos exige um fornecimento contínuo de acetil-CoA e NADPH, como doador de carbonos e agente redutor, respectivamente. Assim, acetil-CoA é convertido em malonil-CoA, em uma reação catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase. A partir do complexo ácido graxo sintase, malonil-CoA é convertido a acil-CoA, sendo transferido para um esqueleto de glicerol-3-fosfato e, posteriormente armazenado no interior dos corpos lipídicos como triacilglicerol (Beopoulos *et al.*, 2011).

As leveduras são capazes de assimilar diferentes fontes de carbono para a produção de lipídios tais como glicose, xilose, celobiose, acetato, melaço, glicerol, hidrolisado de amido de mandioca, resíduos orgânicos e hidrolisados lignocelulósicos (Poontawee *et al.*, 2017).

Algumas leveduras oleaginosas alcançaram teores de lipídios superiores a 20% do seu peso seco: correspondendo a 22% para *Rhodotorula glutinis* (Easterling *et al.*, 2009), 33% para *Cryptococcus albidus* (Hansson & Dostálek 1986), 37% para *Cryptococcus curvatus*, 42% para *Rhodotorula toruloides* (Wiebe *et al.*, 2012), 58% para *Trichosporon fermentans* (Zhu *et al.*, 2008) e 63,5% para *Papiliotrema laurentii* (Vieira *et al.*, 2020). O cultivo em meio contendo xilose em combinação com glicose também foi investigado em *Lipomyces starkeyi*. Esta levedura apresentou um teor de lipídios de 61% (p/p) (Zhao *et al.*, 2008). Estratégias de engenharia metabólica em *Yarrowia lipolytica* possibilitaram a assimilação de xilose, a partir da introdução de uma via heteróloga seguida de ativação e adaptação por limitação de nutriente. Essa levedura atingiu 29% de teor de lipídios a partir de xilose como única fonte de carbono (Li *et al.*, 2016). Além disso, o uso de fontes de carbono mistas derivadas de biomassa lignocelulósica para a produção de lipídios microbianos por *Rhodotorula graminis*, *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodospiridium fluviale*, *Trichosporon coremiiforme*, *Trichosporon cutaneum* e *Trichosporon dermatitis* também foram relatados (Poontawee *et al.*, 2017).

### 2.3. Transportes de glicose e xilose em leveduras

Os transportadores de açúcares são proteínas transmembranas ancoradas na membrana celular que possuem 12 segmentos transmembrana em  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas, conectados entre si por *loops* hidrofílicos atravessando a membrana em ziguezague, com sequências amino e carboxi-terminal longas e voltadas para o citoplasma da célula. Os transportadores podem apresentar diferentes especificidades pelo substrato devido à variação no conjunto de resíduos de aminoácidos presentes nos domínios de translocação e de ligação do substrato (Leandro *et al.*, 2009).

O sistema de captação de açúcares ocorre por dois sistemas distintos: difusão facilitada ou transporte ativo. No sistema de difusão facilitada, o transporte de substrato ocorre sem gasto de energia e a favor do gradiente de concentração. Por outro lado, no transporte dependente de energia o açúcar é transportado, acoplado ao movimento simultâneo de próton(s), contra um gradiente de concentração (Leandro *et al.*, 2009).

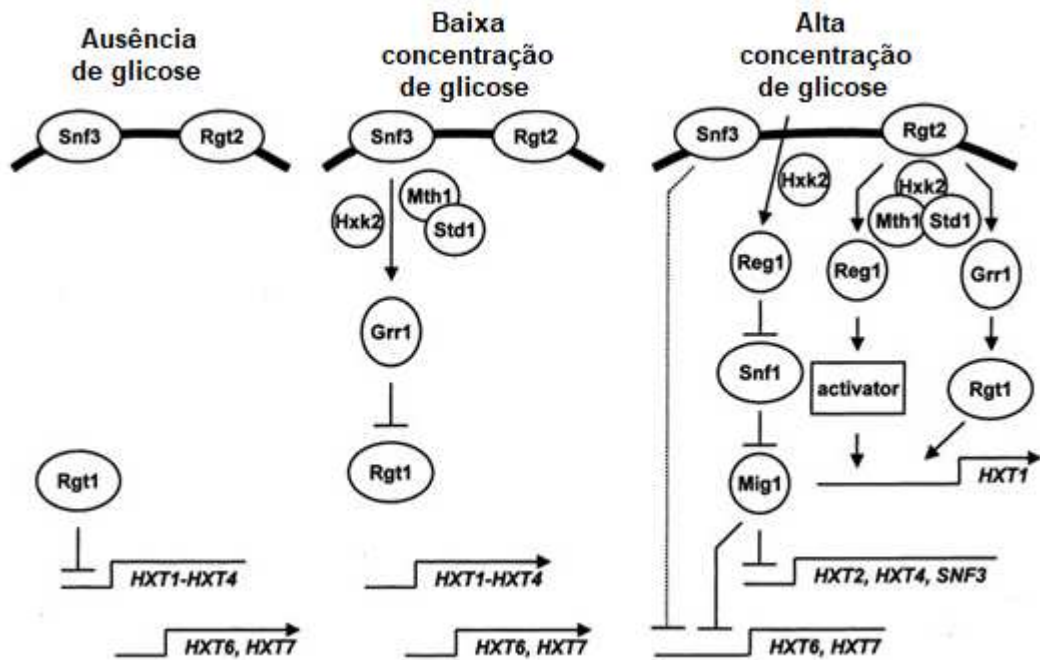
Em *Saccharomyces cerevisiae* o transporte de hexoses ocorre apenas por difusão facilitada. Esta levedura utiliza preferencialmente a glicose como fonte de energia, e em função disso, as funções celulares são reguladas pela glicose (Sharma *et al.*, 2018). Em altas

concentrações, geralmente esse açúcar é fermentado mesmo na presença de oxigênio. Porém, como a produção de ATP por fermentação é ineficiente, ocorre um aumento na absorção de glicose através de transportadores de hexoses (HXTs) visando atender as demandas energéticas (Kayikci & Nielsen, 2015). *S. cerevisiae* não possui um sistema de transporte específico para xilose. Essa levedura possui 17 transportadores de hexose (Hxt1–Hxt17) e uma galactose permease (Gal2) os quais transportam hexoses para o interior da célula. Eles são classificados em três tipos de transportadores de glicose de acordo com suas afinidades por este açúcar: transportadores de baixa, média e alta afinidade (Leandro *et al.*, 2009).

Em geral, sob condições de cultivo na presença de hexoses, somente 7 transportadores de hexoses (Hxt1-Hxt7) em *S. cerevisiae* são necessários para a captação de glicose. Os transportadores Hxt1 e Hxt3 são considerados de baixa afinidade. Embora a expressão de ambos seja induzida por glicose, Hxt3 é expresso constitutivamente. Por outro lado, o transportador Hxt1 somente é expresso em altas concentrações de glicose. Os transportadores Hxt2, Hxt4 e Hxt5 apresentam média afinidade por glicose. Os transportadores Hxt2 e Hxt4 são induzidos e reprimidos em baixas e altas concentrações de glicose, respectivamente. Diferentemente, o transportador Hxt5 tem a sua expressão induzida apenas quando a concentração de glicose no meio é limitante. Visto que os transportadores Hxt6 e Hxt7 possuem alta afinidade por glicose, a expressão de ambos é alta em baixas concentrações de glicose (Rolland *et al.*, 2002).

Como mencionado anteriormente, a expressão dos transportadores apropriados depende da concentração de glicose presente no meio (Figura 1). Assim, na ausência de glicose, os transportadores de média e baixa afinidade são reprimidos por Rgt1, uma proteína de ligação ao DNA que recruta o repressor Ssn6 para os promotores de genes específicos. Em baixas concentrações de glicose, a função repressora de Rgt1 é inibida, resultando na expressão de HXT de média e baixa afinidade. Os genes *HXT2* e *HXT4*, que codificam transportadores de média afinidade por glicose, são reprimidos pelo repressor Mig1, o qual participa da via de repressão por glicose. A repressão do transportador de alta afinidade também é mediada pela via de repressão por glicose. No entanto, a manutenção da repressão de *HXT6* é estritamente dependente de Snf3, um sensor de glicose transmembrana. A expressão do gene *HXT1* que codifica um transportador de baixa afinidade, envolve a via dependente de Grr1-Rgt1, a qual compartilha alguns componentes envolvidos com a via principal de repressão de glicose. Esta indução requer um ativador transcricional ou um mecanismo de repressão dependente da proteína repressora Ssn6 que é inativada por altos níveis de glicose. No entanto, em altas concentrações de glicose, a indução completa de *HXT1* requer ativação da proteína Rgt1. Além

da indução e repressão dependentes da concentração de glicose, o transporte de glicose também está sujeito a regulação pós-traducional (Rolland *et al.*, 2002).



**Figura 1 - Regulação de genes transportadores de hexoses em resposta à concentração de glicose no meio.** Na ausência de glicose, Rgt1 reprime a transcrição de *HXT1-4*. Baixas concentrações de glicose no meio inibem a atividade repressora de Rgt1, processo desencadeado por Snf3 via ubiquitinação mediada por Grr1. Em altas concentrações de glicose, Rgt2 desencadeia a expressão de *HXT1*. Por outro lado, os genes *HXT2*, *HXT4*, *SNF3*, *HXT6* e *HXT7* são reprimidos por Mig1 através da via principal de repressão de glicose. Além disso, Snf3 está envolvido em uma segunda via, induzida por altas concentrações de glicose, que leva à repressão de *HXT6* (Fonte: Rolland *et al.*, 2002).

Em leveduras que assimilam xilose, o transporte de xilose geralmente ocorre por dois mecanismos principais: um mecanismo de difusão facilitada, mediado por um transportador de baixa afinidade que também é capaz de transportar glicose (Hu *et al.*, 2011); ou, pelo mecanismo de simporte de prótons, mediado por um transportador de alta afinidade, permitindo o acúmulo intracelular do açúcar. A regulação deste mecanismo ocorre em função da concentração extracelular de xilose (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007).

A produtividade de processos fermentativos a partir de biomassas lignocelulósicas, depende que a assimilação de pentoses ocorra eficientemente (Parsons *et al.*, 2020). Algumas leveduras oleaginosas como *T. cutaneum*, *L. starkeyi* e *R. toruloides*, assimilam

simultaneamente diversos açúcares, principalmente glicose/celobiose e xilose. No entanto, o efeito repressor exercido pela glicose no transporte de pentoses dificulta a co-fermentação de açúcares lignocelulósicos (Chattopadhyay *et al.*, 2020). Assim, diversas estratégias de engenharia têm sido feitas na tentativa de minimizar o efeito repressor da glicose nessas leveduras, como mutações em proteínas transportadoras de hexoses para induzir a especificidade de substrato para a xilose, e assim reduzir o efeito de repressão catabólica. Chattopadhyay *et al.* (2020) identificaram dois transportadores - CtStp1 e CtStp2 - capazes de transportar xilose de forma eficiente em *Candida tropicalis*, resultando no consumo simultâneo de hexose e pentose. CtStp1 foi identificado como melhor transportador de xilose do que CtStp2, visto que exibiu menos efeito de repressão por glicose em cultivos de açúcares mistos (Chattopadhyay *et al.*, 2020). A identificação de transportadores capazes de co-transportar açúcares também foi relatada por Kuanyshev *et al.* (2021). Estudos de modelagem do transportador LST1\_205437 de *L. starkeyi* revelaram que o resíduo Ala335 no sítio de ligação do açúcar pode acomodar glicose e xilose, resultando em seu co-consumo (Kuanyshev *et al.*, 2021).

Portanto, a compreensão sobre o mecanismo de transporte de açúcares em leveduras oleaginosas pode auxiliar no melhoramento dessas ou outras espécies de leveduras industrialmente relevantes visando o consumo simultâneo de açúcares (Chattopadhyay *et al.*, 2020).

#### **2.4. Repressão catabólica em leveduras**

Como mencionado anteriormente, o desenvolvimento de bioprocessos visa à conversão eficaz dos principais açúcares que constituem a biomassa lignocelulósica - glicose e xilose - em combustíveis e metabólitos de interesse industrial (Martins *et al.*, 2018). Entretanto, o metabolismo de xilose é geralmente suscetível à repressão catabólica, isto é, a presença de glicose leva à repressão de genes que codificam proteínas do metabolismo de xilose, prolongando o tempo e reduzindo a produtividade de processos fermentativos em meios de cultivo contendo uma mistura desses dois açúcares. Após o consumo de glicose, a taxa de consumo de xilose pelos micro-organismos aumenta (Lane *et al.*, 2018).

A repressão catabólica é controlada principalmente pela atividade da proteína quinase Snf1. Essa proteína, inicialmente identificada em *S. cerevisiae*, uma levedura não oleaginosa, é responsável pela adaptação celular a diferentes condições de estresse ambiental e

disponibilidade de fontes de carbono (Hedbacker & Carlson, 2008). Essa enzima é uma serina/treonina-quinase amplamente conservada em eucariotos, necessária para a homeostase da energia celular. Em *S. cerevisiae*, esta quinase é uma molécula heterotrimérica composta pela subunidade catalítica Snf1 ( $\alpha$ ), subunidade reguladora Snf4 ( $\gamma$ ) e uma das três subunidades  $\beta$  (Sip1, Sip2 ou Gal83) (Kim *et al.*, 2013).

Em meios de cultivo contendo alta concentração de glicose, Snf1 e todas as três subunidades  $\beta$  são citoplasmáticas. Quando a glicose se torna limitante, a localização subcelular das subunidades  $\beta$  é alterada, conforme sua sequência N-terminal. Assim, Sip2 permanece citoplasmática, Sip1 é transportada para a membrana vacuolar e Gal83 se desloca para o núcleo (Hedbacker & Carlson, 2008).

Em *S. cerevisiae*, a proteína Snf1 desempenha um papel primordial na via de sinalização que regula a expressão de genes de fontes de carbono alternativas à glicose. Além da Snf1, a proteína repressora Mig1 também se destaca nesta via (Shashkova *et al.*, 2015). Na ausência de glicose, a Snf1 é ativada por fosforilação. Além disso, Snf1 interagindo com Gal83 (Snf1-Gal83) se acumula no núcleo e fosforila a proteína Mig1, a qual é translocada do núcleo para o citoplasma. Visto que a repressora Mig1 atua reprimindo a transcrição de genes, a sua translocação resulta na expressão de genes que codificam proteínas do metabolismo de fontes de carbono alternativas à glicose (Fakas, 2017). Por outro lado, a quinase Snf1 é inativada em alta concentração de glicose, porque ocorre a sua desfosforilação (Kayikci & Nielsen, 2015). Assim, a repressora Mig1 permanece no núcleo reprimindo a expressão de genes do metabolismo de fontes alternativas de carbono (Shashkova, *et al.*, 2015).

Genes homólogos da proteína Snf1 foram identificados nas leveduras *Kluyveromyces lactis* (Goffrini *et al.*, 1996), *Candida* spp. (Petter & Kwon-Chung 1996; Kanai *et al.*, 1999) e *Torulaspota delbruecki* (Hernández-López *et al.*, 2010), os quais têm sido alvo de estudos para identificar o papel de Snf1 na utilização de carbono e na repressão da glicose. Contudo, pouco se sabe sobre vias de sinalização responsáveis pela repressão catabólica em leveduras oleaginosas (Seip *et al.*, 2013).

O fenótipo de repressão catabólica também é observado na levedura oleaginosa *R. toruloides* (Bommareddy *et al.*, 2017). Crescimento diáuxico é observado quando essa levedura é cultivada em mistura contendo glicose e glicerol. Como descrito anteriormente, o repressor Mig1 é importante na repressão catabólica em *S. cerevisiae*. No entanto, em *R. toruloides*, a expressão de Mig1 não altera entre as diferentes fases: crescimento diáuxico e limitação por

glicose, sugerindo que a repressão catabólica ocorre por meio de um mecanismo desconhecido nessa levedura (Bommareddy *et al.*, 2017). Embora os mecanismos de repressão permaneçam desconhecidos, sabe-se que a intensidade da repressão difere de acordo com a linhagem em *R. toruloides* (Yamada *et al.*, 2017).

O 2-deoxiglicose (2DG) é um composto análogo à glicose, não metabolizado pelas células, capaz de induzir os mecanismos de repressão catabólica (Schmidt & O'Donnell 2021) e, por esse motivo, tem sido comumente empregado em estudos relacionados à repressão catabólica (Kahar *et al.*, 2011).

Estudos desenvolvidos por Mikumo *et al.* (2009) com a levedura *S. cerevisiae*, resultaram na seleção de um mutante resistente ao 2DG. Sendo observada uma maior assimilação de maltose na presença de glicose, indicando o alívio da repressão nesse mutante (Mikumo *et al.*, 2009). Oda & Nakamura (2009) também empregaram com sucesso o 2DG como estratégia de seleção de mutantes resistentes à repressão catabólica em *Kluyveromyces marxianus*, possibilitando melhoria na produção de etanol a partir da mistura de melão de beterraba e soro de queijo.

Recentemente *Spathaspora passalidarum*, uma levedura não oleaginosa, foi avaliada quanto aos efeitos de repressão por glicose no metabolismo de xilose. Ribeiro *et al.* (2021) relataram que os genes que codificam as principais enzimas do metabolismo da xilose foram menos expressos em cultivos na presença de glicose. Assim, foi observada redução da atividade específica de xilose redutase, xilitol desidrogenase e xiluloquinase, o que pode ter influenciado no balanço redox do metabolismo desta pentose. Contudo, na presença de 2DG, esse perfil de inibição não foi observado. O que, segundo os autores, sugere que a interferência da glicose no metabolismo da xilose pode ocorrer em nível de repressão transcricional ou pela inativação de transportadores nessa levedura (Ribeiro *et al.*, 2021).

Rodrussamee *et al.* (2018) demonstraram em seus estudos com *S. passalidarum*, que o consumo de xilose apresentou um crescimento atrasado em cultivos contendo glicose e xilose, em comparação aos cultivos contendo apenas xilose. Enquanto que, quando cultivada em meio sólido contendo xilose e 2DG, o crescimento não foi comprometido. Assim, o consumo preferencial de glicose pode não ser devido à repressão por glicose no uso de xilose, mas sim devido às diferenças em relação à afinidade de transportadores. Segundo os autores,

provavelmente o transporte desses açúcares ocorre pelo mesmo transportador, que teria uma afinidade maior para a glicose e assim seu transporte ocorre antes da xilose.

### **2.5. *Papiliotrema laurentii***

*Papiliotrema laurentii* é uma levedura oleaginosa pertencente ao filo Basidiomycota, anteriormente descrita como *Cryptococcus laurentii* (Liu *et al.*, 2015), e tem sido isolada a partir de fragmentos de madeira em decomposição, excrementos aviários, rizosfera de tomate e amostras de solo. Frequentemente obtida a partir de solos, sendo capaz de assimilar pentoses, hexoses e ácidos orgânicos presentes em secreções radiculares (Sarkar *et al.*, 2019).

Suas aplicações podem incluir: degradação de biofilmes em revestimentos de polímero (Barlow *et al.*, 2020); biorremediação de metais pesados (Sarkar *et al.*, 2019); funções ecológicas em culturas agrícolas (Leguina *et al.*, 2019); e fonte de óleo microbiano para a produção de biodiesel a partir de subprodutos da indústria de laticínios (Carota *et al.*, 2017) e subprodutos agrícolas, como a xilose (Vieira *et al.*, 2020).

A levedura *P. laurentii* UFV-1 foi isolada a partir de amostras de solo coletadas da rizosfera, cerca de 20 cm de profundidade, no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, localizado no estado do Rio de Janeiro. Essa linhagem apresenta suscetibilidade à repressão catabólica. O acúmulo de lipídios intracelulares se inicia na fase de desaceleração do crescimento em meios de cultivo contendo glicose ou xilose como fontes de carbono e energia (Vieira *et al.*, 2020).

Recentemente foi publicada a primeira versão da reconstrução do modelo metabólico em escala genômica de *P. laurentii* UFV-1 (Ventorim *et al.*, 2022). Esse modelo contribuirá para o entendimento de suas características fisiológicas, uma vez que permite a integração de informações genéticas e fisiológicas e fornece uma visão sistêmica do metabolismo, que auxilia na identificação de alvos que podem ser explorados por engenharia metabólica visando melhorar suas propriedades biotecnológicas e explorar sua aplicação industrial.

*P. laurentii* UFV-1 é uma levedura oleaginosa capaz de assimilar glicose e xilose, como fontes de carbono e energia; contudo, não os assimila simultaneamente. Em cultivos realizados com essa levedura, Vieira *et al.* (2020) obteve o teor lipídico máximo de 43% (p/p) em meio contendo glicose como única fonte de carbono. Em cultivos contendo xilose e uma mistura de glicose e xilose, o conteúdo lipídico correspondeu a 30 e 37,4% (p/p), respectivamente. Em meio de cultivo contendo apenas xilose como fonte de carbono e energia, essa levedura atingiu

um alto teor de lipídios de 63,5% (m/m) sob condições otimizadas de cultivo (Vieira *et al.*, 2020). No entanto, os mecanismos de regulação ainda são pouco conhecidos em *P. laurentii*.

Apesar do potencial de acúmulo de lipídios a partir de uma mistura de xilose e glicose por *P. laurentii* UFV-1, o consumo preferencial de glicose torna a utilização do processo SSCF um gargalo que precisa ser contornado.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Analisar a assimilação de glicose e xilose em *P. laurentii* UFV-1 e selecionar linhagens mutantes desta levedura com capacidade de assimilar simultaneamente glicose e xilose.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Analisar o perfil de consumo de glicose e xilose em diferentes concentrações destes açúcares;
- Determinar a concentração do composto 2-deoxiglicose (análogo da glicose) que será utilizada no meio de seleção de linhagens mutantes de *P. laurentii* UFV-1;
- Submeter suspensões de células de *P. laurentii* UFV-1 à radiação ultravioleta visando a obtenção de linhagens mutantes;
- Selecionar, dentre as linhagens mutantes, aquelas insensíveis à repressão catabólica, ou seja, capazes de assimilar glicose e xilose simultaneamente e manter a capacidade de produzir altos teores de lipídios;
- Avaliar o consumo de xilose e a produção de lipídios em linhagens mutantes de *P. laurentii* UFV-1 cultivadas em meio contendo xilose.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1. Micro-organismo e manutenção

A linhagem *Papiliotrema laurentii* UFV-1 utilizada neste trabalho pertence à coleção de culturas do Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO).

As células da levedura foram mantidas em meio *Yeast Peptone* (YP) contendo: 10 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 20 g.L<sup>-1</sup> de peptona, com glicerol 40% (v/v) a -80 °C.

#### 4.2. Meios de cultura e preparo de inóculo

Os cultivos para obtenção de pré-inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio mínimo líquido *Yeast Nitrogen Base* (YNB sem aminoácidos e com sulfato de amônio, Sigma Chemical Co., MO, EUA)  $6,7 \text{ g.L}^{-1}$  sob agitação de 200 rpm a 30 °C. As culturas de leveduras foram incubadas em incubador rotatório (New Brunswick Scientific 25D, NJ, EUA) por aproximadamente 18 h. Posteriormente, as células foram centrifugadas a  $5.000 \times g$  por 5 min a 4 °C, lavadas 2 vezes em água peptonada 0,1% (m/v) e o inóculo foi ajustado para densidade ótica inicial a 600 nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) de aproximadamente 0,1. As células foram inoculadas em novo meio de cultura para o preparo das suspensões de células para as etapas de determinação da concentração mínima inibitória de 2-deoxiglicose (2DG, Sigma), construção da curva de sobrevivência, mutagênese e cultivos para determinação do consumo de açúcares e acúmulo lipídico.

A concentração mínima inibitória de 2DG foi determinada por meio da avaliação do crescimento da levedura em meio ágar YNB contendo 133 mM de xilose (YNBX), acrescido de diferentes concentrações de 2DG (1,2 – 4,6 mM). O meio ágar YNBX contendo a concentração inibitória mínima 4 mM de 2DG foi referido como YNBX2DG.

Para a construção da curva de sobrevivência, *P. laurentii* UFV-1 foi exposta à luz ultravioleta (UV) conforme descrito no item 4.4. Aliquotas de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de células da levedura foram inoculadas em meio ágar YNBX.

A seleção de mutantes foi realizada a partir do espalhamento em superfície em meio YNBX2DG, como descrito no tópico 4.5. Os mutantes resistentes à concentração mínima inibitória foram cultivados em meio ágar YNBX acrescidos de 4,3 mM de 2DG. Em seguida, os mutantes selecionados em placa foram transferidos para meio líquido YNBX2DG.

Para estimar os parâmetros cinéticos do modelo de Monod, *P. laurentii* UFV-1 foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YNB acrescido de glicose ou xilose. Para ambos açúcares, a concentração variou de 1 a 15 mM.

Para estimar os parâmetros cinéticos de crescimento e analisar o consumo de açúcares, *P. laurentii* UFV-1 foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YNB acrescido de 100 mM de xilose (YNBX1); 102 mM de glicose (YNBG1); 27 mM de glicose (YNBG2); 78 mM de glicose e 88 mM de xilose (YNBGX1) e 13 mM de glicose e 91 mM de xilose (YNBGX2), conforme descrito no tópico 4.7.

Na etapa de caracterização das linhagens selecionadas após o procedimento de mutagênese, *P. laurentii* UFV-1 e a linhagem mutante foram inicialmente cultivadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YNB acrescido de glicose e/ou xilose a 56 mM e 67 mM, respectivamente, para determinar a velocidade específica de crescimento e o consumo de açúcares.

Para avaliar o efeito de 2DG no metabolismo de xilose, *P. laurentii* UFV-1 e o mutante selecionado foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio YNBX2DG, conforme descrito no tópico 4.10.

O cultivo para avaliar o acúmulo de lipídios foi realizado em meio líquido SS2 acrescido de xilose 30 g.L<sup>-1</sup>, sulfato de amônio 0,1 g.L<sup>-1</sup>, sulfato de magnésio 0,5 g.L<sup>-1</sup>, cloreto de sódio 0,1 g.L<sup>-1</sup>, cloreto de cálcio 0,1 g.L<sup>-1</sup> (Tanimura *et al.*, 2014) e extrato de levedura 1 g.L<sup>-1</sup> (Vieira *et al.*, 2020) (Difco, Detroit, MI, USA).

Para avaliar o efeito da temperatura sobre o crescimento celular, *P. laurentii* UFV-1 e a linhagem mutante selecionada foram cultivadas em meio ágar YNB contendo 111 mM de glicose (YNBG), e em meio contendo 133 mM de xilose (YNBX).

### **4.3. Determinação da concentração mínima inibitória de 2DG**

Para a determinação da concentração mínima inibitória de 2DG, alíquotas de 100 µL do pré-inóculo da linhagem selvagem de *P. laurentii* UFV-1 foram lavadas 2 vezes com água peptonada 0,1% (m/v) e coradas com 100 µL de azul de metileno. As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas para 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup> e diluídas serialmente para atingir entre 30 a 300 colônias. Em seguida, um volume de cinquenta microlitros de cada diluição foi inoculado pela técnica de espalhamento em superfície em meio ágar YNBX, acrescido de diferentes concentrações de 2DG conforme descrito no tópico 4.2, e incubadas a 30 °C por 72 h.

### **4.4. Mutagênese**

A curva de sobrevivência da linhagem selvagem de *P. laurentii* UFV-1 foi construída por meio de sua exposição à luz UV. A concentração celular foi padronizada conforme descrito no tópico 4.3. Alíquotas de 50 µL de cada diluição foram inoculadas pela técnica de espalhamento em superfície em meio ágar YNBX e irradiadas utilizando lâmpada UV a 4 W Mineralight®

modelo UVS-11 em condição asséptica em fluxo laminar. As placas de Petri contendo a suspensão celular foram irradiadas em intervalos de 1 a 10 minutos, a uma distância de 13 e 10 cm entre a lâmpada UV e a superfície da placa, para determinar o tempo e a distância que corresponde a uma taxa de mortalidade de aproximadamente 99% da população de células de acordo com o método proposto por Winston (2008). O procedimento de mutagênese foi realizado no escuro para se evitar o mecanismo de fotorreativação enzimática. As placas foram incubadas a 30 °C por 72 h. Posteriormente, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) para a determinação da sobrevivência celular. As linhagens mutantes obtidas foram armazenadas em tubos de microcentrífuga contendo meio YP acrescido 40% (v/v) de glicerol a -80 °C.

#### **4.5. Seleção de linhagens mutantes**

A seleção de mutantes foi realizada conforme o método utilizado por Mikumo (2009), com modificações. Alíquotas de 50 µL do pré-inóculo de cada linhagem foram lavadas 2 vezes com água peptonada 0,1% (m/v) e inoculadas pela técnica de espalhamento em superfície em meio YNBX2DG, seguido por incubação em estufa a 30 °C por 4 dias.

Para reduzir a quantidade de isolados e obter aqueles mais resistentes ao análogo de glicose 2DG, as colônias formadas foram cultivadas em meio líquido YNBX para obtenção de pré-inóculos, sendo posteriormente lavados 2 vezes com água peptonada 0,1% (m/v), padronizados para uma  $DO_{600nm}$  inicial de aproximadamente 0,5 e diluídas serialmente. Em seguida, um volume de 4 µL de cada diluição foi inoculado em meio ágar YNBX contendo 4,3 mM de 2DG e incubados a 30 °C por 4 dias.

Os isolados que apresentaram crescimento foram, em seguida, cultivados em meio líquido YNBX2DG. Os cultivos foram conduzidos a partir do inóculo de uma colônia isolada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio e mantidos sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 5 dias ou turvação do meio de cultivo. O mutante que apresentou crescimento mais pronunciado em meio líquido pela análise da  $DO_{600nm}$  utilizando o espectrofotômetro (Beckman Série DU 600, Indianapolis, USA) foi selecionado.

O isolado mais promissor foi cultivado em meio YNB contendo uma mistura de glicose e xilose, com 56 e 67 mM, respectivamente, para a avaliação do perfil de consumo destes açúcares e do acúmulo de lipídios.

O acúmulo de lipídios foi avaliado em meio SS2 sob limitação de nitrogênio, na razão C/N de 100:1. *P. laurentii* UFV-1 e a linhagem mutante selecionada foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio SS2, sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 48 h. O inóculo foi ajustado para uma  $DO_{600nm}$  inicial de aproximadamente 0,1. A determinação da concentração de lipídios foi avaliada pelo método gravimétrico, conforme descrito no tópico 4.12.

#### **4.6. Estimação de parâmetros cinéticos do Modelo de Monod**

Para avaliar a afinidade de *P. laurentii* UFV-1 por glicose e xilose. O inóculo foi padronizado para uma  $DO_{600nm}$  inicial próxima de 0,1. As concentrações dos açúcares (1 a 15 mM) foram preparadas em balões volumétricos de 50 mL, seguidas por filtração em membrana de 25 mm e 0,22  $\mu m$  (Millipore). Os cultivos foram realizados sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 48 h. O crescimento das células foi monitorado de 30 em 30 minutos por 12 h e nos tempos de 24 e 54 h, pela análise da  $DO_{600nm}$  utilizando o espectrofotômetro (Beckman Série DU 600, Indianapolis, USA).

#### **4.7. Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento da linhagem selvagem**

Para estimar os parâmetros cinéticos de crescimento, *P. laurentii* UFV-1 foi cultivada em meio YNBX1; YNBG1; YNBG2; YNBGX1 e YNBGX2. O inóculo foi padronizado para uma  $DO_{600nm}$  inicial próxima de 0,1. O crescimento das células foi monitorado de 1 em 1 hora nas primeiras 12 h e nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h, pela análise da  $DO_{600nm}$  como mencionado no tópico 4.6. A velocidade específica de crescimento foi determinada pelo coeficiente angular da regressão linear do gráfico de  $\ln$  da  $DO_{600nm}$  ( $\ln DO_{600nm}$ ) *versus* tempo (h) na fase de crescimento exponencial.

#### **4.8. Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento das linhagens selvagem e mutante**

Para determinar os parâmetros cinéticos de crescimento, *P. laurentii* UFV-1 e a linhagem mutante selecionada foram cultivadas em meio YNB acrescido de glicose 56 mM e/ou xilose 67 mM, sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 48 h. O inóculo foi padronizado para uma  $DO_{600nm}$  inicial de aproximadamente 0,1. O crescimento das células foi monitorado de 4 em 4 horas nas

primeiras 24 h e nos tempos de 30 e 48 h, pela análise da  $DO_{600nm}$  conforme descrito no tópico 4.6. O rendimento de biomassa celular ( $Y_{X/S}$ ) foi determinado pela inclinação de regressão linear do gráfico de biomassa ( $g.L^{-1}$ ) versus concentração de glicose ou xilose ( $g.L^{-1}$ ). Os valores de biomassa total produzida ao final dos cultivos foram determinados pela diferença entre biomassa seca final e inicial, expressos em  $g.L^{-1}$ .

#### **4.9. Análise do consumo de açúcares**

O consumo de açúcares de *P. laurentii* UFV-1 e do mutante selecionado foram avaliados a partir dos cultivos descritos nos tópicos 4.7, 4.8 e 4.10. O sobrenadante da cultura foi coletado por centrifugação a 4 °C, 10.000 x g por 10 min, seguido por filtração em membrana de 13 mm e 0,22  $\mu m$  (Allcrom, Brasil). As concentrações de glicose e xilose foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance HPLC (LC20-20AT, Shimadzu, Japão), equipado com detector por índice de refração (RID-20A) e coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), temperatura da coluna a 45 °C. Ácido sulfúrico 5 mM foi utilizado como fase móvel com fluxo de 0,7 mL/min. As concentrações de 2DG e xilose foram determinadas em coluna de monossacarídeos Phenomenex Rezex (Bio-rad), mantida a 80 °C. Água ultrapura foi utilizada como fase móvel com fluxo de 0,5 mL/min. A quantificação dos açúcares foi obtida por curvas de calibração usando padrões externos de glicose, xilose e 2DG (Sigma).

#### **4.10. Efeito de 2DG sobre o metabolismo de xilose**

Para avaliar o efeito de 2DG sobre o metabolismo de xilose, *P. laurentii* UFV-1 e o mutante selecionado foram cultivados em meio YNBX2DG, sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 76 h. O inóculo foi padronizado para uma  $DO_{600nm}$  inicial de aproximadamente 0,5. O crescimento celular foi monitorado pela análise da  $DO_{600nm}$ . O consumo de 2DG e xilose foram determinados conforme descrito no tópico 4.9.

#### **4.11. Influência da temperatura**

Para a determinação do efeito da temperatura sobre o crescimento celular, os inóculos de *P. laurentii* UFV-1 e da linhagem mutante foram lavados 2 vezes com água peptonada 0,1% (m/v), padronizados para uma  $DO_{600nm}$  inicial de aproximadamente 0,5 e diluídas serialmente. Em seguida, um volume de 4  $\mu L$  de cada diluição foi inoculado em meio ágar YNBG e YNBX a 30 e 37 °C por 48 h.

#### 4.12. Determinação do teor de lipídios

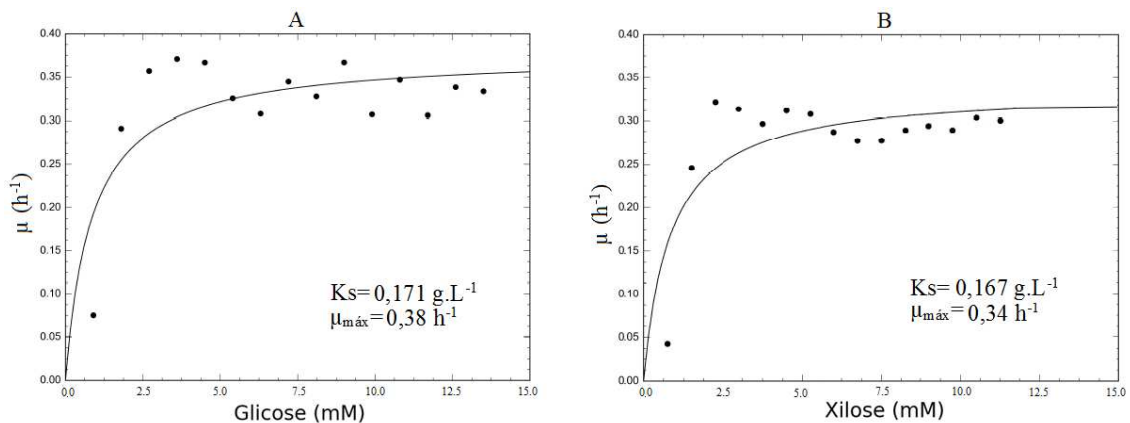
A quantificação de lipídios foi realizada por gravimetria baseada no método descrito por Bligh e Dyer (1959) com modificações. A extração de lipídios foi realizada utilizando 50 mg de biomassa liofilizada e adicionando 1 mL de solução composta por solução de metanol e clorofórmio na proporção de 2:1 (v/v). A suspensão foi homogeneizada por 5 min usando o equipamento TissueLyser II (Qiagen) a uma frequência de 30 batidas por segundo. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 3 vezes a 12.000 x g por 5 min para garantir a extração total dos lipídios. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em tubos de centrífuga de vidro com volume de 15 mL, aos quais foram adicionados 3 mL de clorofórmio, sendo posteriormente homogeneizados. Para gerar um sistema líquido bifásico, foram adicionados 2 mL de solução salina a 1% (p/v) à mistura, seguido por homogeneização da solução. A fase líquida foi separada por centrifugação a 3000 x g por 20 min em centrífuga (Sorval RC5C). Os sobrenadantes foram coletados para a separação da fase aquosa. A fase orgânica foi transferida para microtubos previamente pesados. As amostras foram evaporadas em incubadora de banho seco (Fisher Scientific) a 60 °C por 24 h. A concentração de lipídios foi calculada multiplicando-se os valores de teor de lipídios (%) por sua biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) no tempo em que houve a maior produção de lipídios (48 h), dividido por 100.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análise da repressão por glicose sobre o metabolismo de xilose em *Papiliotrema laurentii* UFV-1

*P. laurentii* UFV-1 é capaz de assimilar glicose e xilose como fontes de carbono e energia e acumular lipídios quando cultivada sob estresse por nitrogênio (Vieira *et al.*, 2020), o que é fundamental para a sua utilização em biorrefinarias lignocelulósicas. A assimilação simultânea desses dois açúcares é desejável, pois permite reduzir o tempo requerido para alcançar o máximo de acúmulo de lipídios, isto é, a produtividade volumétrica. Para avaliar a afinidade de *P. laurentii* UFV-1 por glicose e xilose, a levedura foi cultivada em diferentes concentrações desses açúcares e a velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e a constante de saturação ( $K_s$ ) foram estimadas (Figura 2).

Os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  de *P. laurentii* UFV-1 em glicose e xilose foram similares, isto é, 0,38 e 0,34  $\text{h}^{-1}$ , respectivamente. A  $K_s$  refere-se à concentração de substrato que atinge metade da velocidade máxima de crescimento da levedura. Em glicose, o valor da  $K_s$  foi de 0,171 ( $\text{g.L}^{-1}$ ), enquanto em xilose foi de 0,167 ( $\text{g.L}^{-1}$ ). Os valores similares de  $K_s$  indicam que a levedura apresenta afinidades similares pelas duas fontes de carbono e energia.



**Figura 2 - Parâmetros cinéticos de crescimento de *P. laurentii* UFV-1 cultivada em meio mínimo YNB: contendo glicose (A) ou xilose (B) com concentrações variando de 1 a 15 mM.**

Visto que a levedura apresenta afinidades similares por glicose e xilose, os parâmetros de crescimento (Tabela 1) e o consumo destes açúcares (Figura 3) foram determinados a partir de cultivos conduzidos em meio mínimo YNB acrescido de diferentes concentrações de glicose, xilose e uma mistura de ambos açúcares.

As velocidades específicas de crescimento determinadas nas diferentes condições de cultivo não foram estatisticamente diferentes (Tabela 1). Contudo, o rendimento de biomassa foi maior quando a levedura foi cultivada em meio contendo 13 mM de glicose e 91 mM de xilose. Nesta condição, a biomassa formada e o rendimento de biomassa foram 6,036 g.L<sup>-1</sup> e 0,341 g.g<sup>-1</sup>, respectivamente. A formação de biomassa (6,337 g.L<sup>-1</sup>) em meio contendo 102 mM de glicose e 88 mM de xilose não foi estatisticamente diferente da obtida na condição mencionada acima, porém o rendimento de biomassa (0,223 g.g<sup>-1</sup>) foi mais baixo. Portanto, os maiores valores de biomassa foram obtidos em cultivos contendo os dois açúcares. De forma geral, esses resultados reforçam a importância do aproveitamento integral da biomassa lignocelulósica para aumentar a formação de biomassa microbiana e, no caso de leveduras oleaginosas, de produção de lipídios. Nos cultivos contendo apenas uma das fontes de carbono (glicose ou xilose), nas concentrações de 102 e 91 mM, respectivamente, observou-se o consumo completo de ambos no período de 48 h (Figura 3A e B). Nestas condições, a glicose foi consumida mais rapidamente do que a xilose. No cultivo contendo ambos os açúcares nas concentrações de 102 mM de glicose e 100 mM de xilose, a levedura consumiu preferencialmente a glicose. Contudo, ao final de 98 h de cultivo ainda havia ambos açúcares presentes no meio. Em relação ao consumo de xilose e glicose, verificou-se que nos cultivos realizados com 13 mM de glicose e pela mistura de xilose 100 mM e glicose 13 mM, a glicose foi totalmente consumida em 25 h de cultivo. A xilose foi completamente consumida após 48 h, indicando que o consumo de açúcar foi mais rápido no cultivo contendo apenas 13 mM de glicose. Assim, observa-se que, independente da concentração da fonte de carbono utilizada, a glicose é o açúcar preferencialmente consumido. Esta preferência pode estar relacionada à repressão exercida por glicose sobre o metabolismo de xilose ou ao transporte preferencial de glicose.

Não há relatos na literatura acerca da repressão por glicose em *P. laurentii*. Em outras leveduras que assimilam xilose, a compreensão da repressão catabólica também é limitada. Recentemente, a deleção do gene *MIG1* em *K. marxianus* não resultou no alívio da repressão por glicose sobre o metabolismo de xilose. Portanto, há nesta levedura outra via de sinalização por glicose relacionada à repressão catabólica (Hua *et al.*, 2019). Ribeiro *et al.* (2021) observaram o efeito de repressão catabólica no cultivo de *S. passalidarum* em meio de cultivo contendo glicose e xilose, contudo, este efeito não foi observado no cultivo em 2-deoxiglicose (análogo de glicose) e xilose. Esses autores hipotetizaram que essa levedura tem uma via de sinalização por glicose diferente daquela descrita para *S. cerevisiae*.

Para o nosso conhecimento, não há informações disponíveis acerca de transportadores de açúcares em *P. laurentii*. Considerando outras leveduras que assimilam xilose, sabe-se que a xilose pode ser transportada tanto através de transportadores específicos como por transportadores de hexose. Essas leveduras apresentam sistemas de transporte de alta e baixa afinidade por glicose (Leandro *et al.*, 2009). Sistemas de transporte de xilose de alta afinidade foram relatados nas leveduras *S. stipitis* e *C. intermedia* (Runquist *et al.*, 2009). Em *S. stipitis*, o sistema de baixa afinidade transporta os dois açúcares, enquanto o sistema de alta afinidade transporta apenas xilose e é inibido na presença de glicose (Kilian & Uden 1998). Nessa levedura, o transporte de glicose ocorre de forma mais eficiente do que o de xilose (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

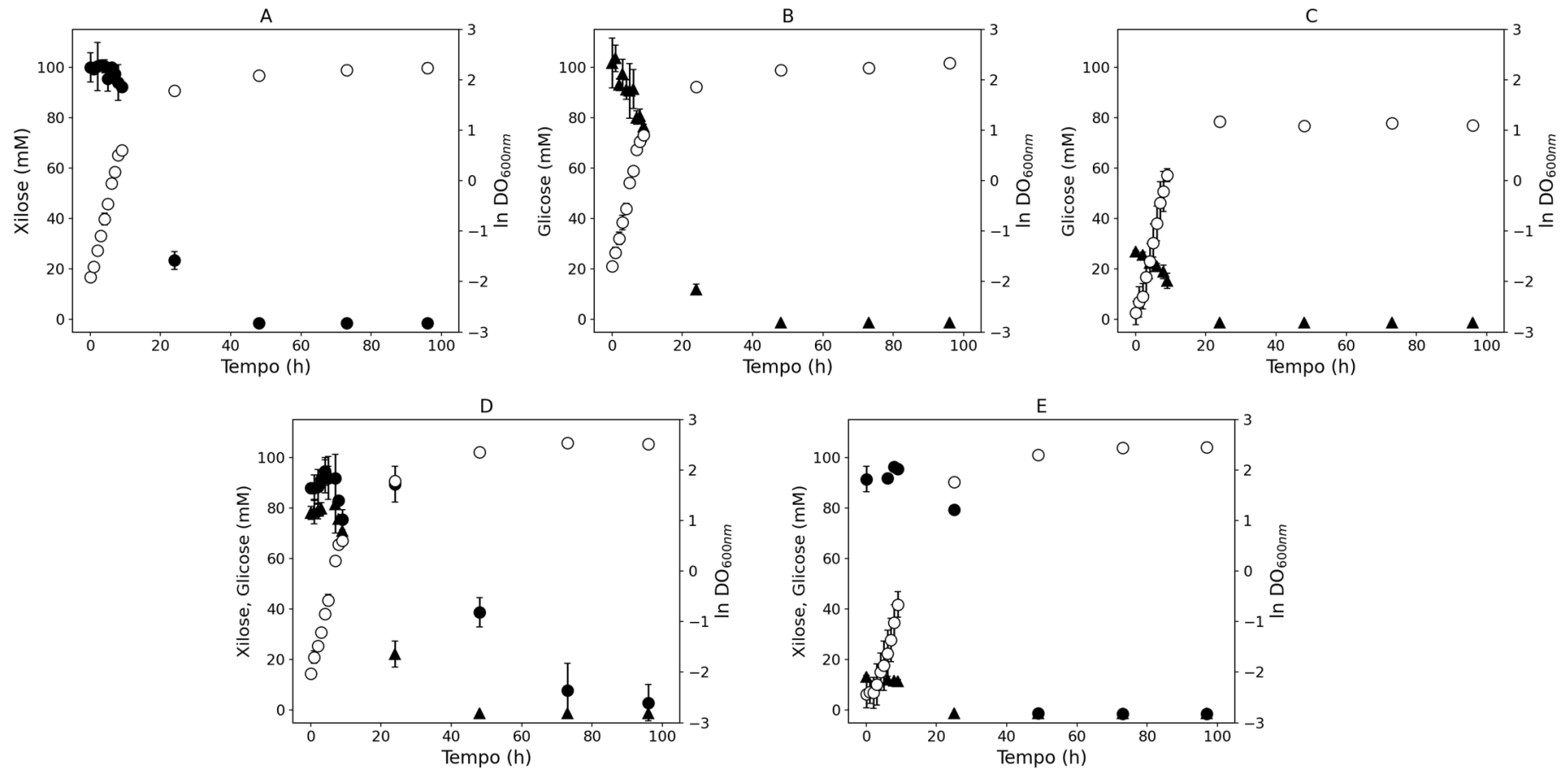
**Tabela 1.** Parâmetros de crescimento de *P. laurentii* UFV-1 cultivada em meio mínimo YNB contendo diferentes concentrações de glicose, xilose e uma mistura destes dois açúcares.

Fonte de carbono e energia	Concentração (mM)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )* <sup>1</sup>	Biomassa (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	Rendimento de biomassa (g.g <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>
Glicose	27	0,334±0,027	1,628±0,083 <i>d</i>	0,096±0,006 <i>e</i>
Glicose	102	0,327±0,035	5,302±0,062 <i>c</i>	0,303±0,005 <i>b</i>
Xilose	100	0,318±0,005	4,834±0,489 <i>bc</i>	0,271±0,003 <i>c</i>
Glicose e Xilose	13 e 91	0,296±0,033	6,036±0,571 <i>ab</i>	0,341±0,017 <i>a</i>
Glicose e Xilose	78 e 88	0,330±0,002	6,337±0,220 <i>a</i>	0,223±0,015 <i>d</i>

\* A velocidade específica de crescimento foi determinada na fase exponencial.

<sup>1</sup> Os valores de  $\mu$  não são significativamente diferentes de acordo com o teste F em nível de 5 % de probabilidade.

<sup>2</sup> Os valores de biomassa e rendimento de biomassa diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.



**Figura 3 - Perfil de crescimento e consumo de açúcares de *P. laurentii* UFV-1 cultivada em meio mínimo YNB acrescido de glicose e/ou xilose:** (A) xilose 100 mM; (B) glicose 102 mM; (C) glicose 27 mM; (D) glicose 78 mM e xilose 88 mM e (E) glicose 13 mM e xilose 91 mM. ○ - Crescimento ( $\ln DO_{600nm}$ ); ● - Concentração de xilose (mM); e ▲ - Concentração de glicose (mM). Os dados apresentados são médias e os respectivos desvios-padrão dos cultivos realizados em triplicatas.

## 5.2. Obtenção de linhagens mutantes capazes de crescer em meios de cultivo contendo xilose e 2-deoxiglicose

Como mencionado anteriormente, não há informações acerca da via de repressão catabólica em *P. laurentii*. Portanto, a seleção e caracterização de mutantes insensíveis à repressão catabólica podem ajudar a compreender melhor este fenômeno em *P. laurentii*. Além disso, a obtenção desses mutantes é de interesse biotecnológico, pois apresentam potencial de aplicação em biorrefinarias lignocelulósicas.

O composto 2DG, análogo da glicose, tem sido comumente empregado em estudos relacionados à repressão catabólica em *S. cerevisiae* (Kahar *et al.*, 2011). Isto ocorre porque esse análogo não é metabolizado pela levedura, fato que inviabiliza o crescimento. Inicialmente, o 2DG é fosforilado a 2-deoxiglicose-6-fosfato (2DG-6P) na reação catalisada pela hexoquinase. Entretanto, a ausência do grupo hidroxila (OH) no carbono 2 da 2DG, impede a utilização de 2DG-6P como substrato, pela fosfoglicose isomerase. Isso gera um acúmulo de 2DG-6P no meio intracelular, ativando as vias de sinalização de repressão por glicose, que por sua vez, reprimem a expressão de genes envolvidos na assimilação de outras fontes de carbono (Schmidt & O'Donnell 2021). De fato, linhagens mutantes de *S. cerevisiae* insensíveis à repressão catabólica foram selecionadas em meios de cultivo contendo o análogo 2DG e uma fonte de carbono alternativa à glicose. Visando a obtenção de linhagens de *P. laurentii* UFV-1 insensíveis ao efeito de repressão catabólica, a concentração mínima de 2DG capaz de inibir o crescimento de *P. laurentii* UFV-1 foi determinada (Figuras A1 e A2). Em seguida, a linhagem selvagem foi submetida à mutagênese por irradiação ultravioleta em diferentes tempos e distâncias entre a lâmpada UV e a superfície da placa (Figuras A3 e A4). O tempo de 9 minutos e 15 segundos, a uma distância de 10 cm, resultou em uma taxa de mortalidade de aproximadamente 99 % da população de células (Figura A5, Tabela A1). A partir desse procedimento, 30 linhagens possivelmente mutantes foram isoladas da placa irradiada. Os isolados foram identificados pela letra M seguido por números de 1 a 30.

Na etapa de seleção, um total de 24 isolados foi capaz de crescer em meio contendo a concentração mínima inibitória de 2DG, isto é, 4 mM (Figura A6). Uma segunda triagem foi realizada por meio do cultivo das 24 linhagens previamente selecionadas em meio contendo 4,3 mM de 2DG, resultando na seleção de 14 isolados (Figura A7). Estes foram cultivados em meio líquido contendo 4 mM de 2DG no intuito de selecionar os mais promissores em função do maior crescimento na presença do análogo de glicose (Figura A8). Apenas a linhagem M17 foi selecionada por apresentar o maior valor de densidade óptica (Tabela 2).

**Tabela 2.** Valores de densidade óptica das 14 linhagens selecionadas em 4,3 mM de 2DG. As linhagens mutantes e selvagem foram cultivadas em meio YNB suplementado por 133 mM de xilose e 4 mM de 2DG e incubadas a 30 °C e 200 rpm por 5 dias.

<b>Linhagens</b>	<b>DO (600nm)</b>
<i>P. laurentii</i> UFV-1	Não houve crescimento
M1	Não houve crescimento
M2	Não houve crescimento
M4	Não houve crescimento
M5	Não houve crescimento
M6	Não houve crescimento
M9	0,2120
M15	0,2000
M16	Não houve crescimento
M17	1,1915
M20	Não houve crescimento
M23	Não houve crescimento
M26	Não houve crescimento
M27	Não houve crescimento
M30	Não houve crescimento

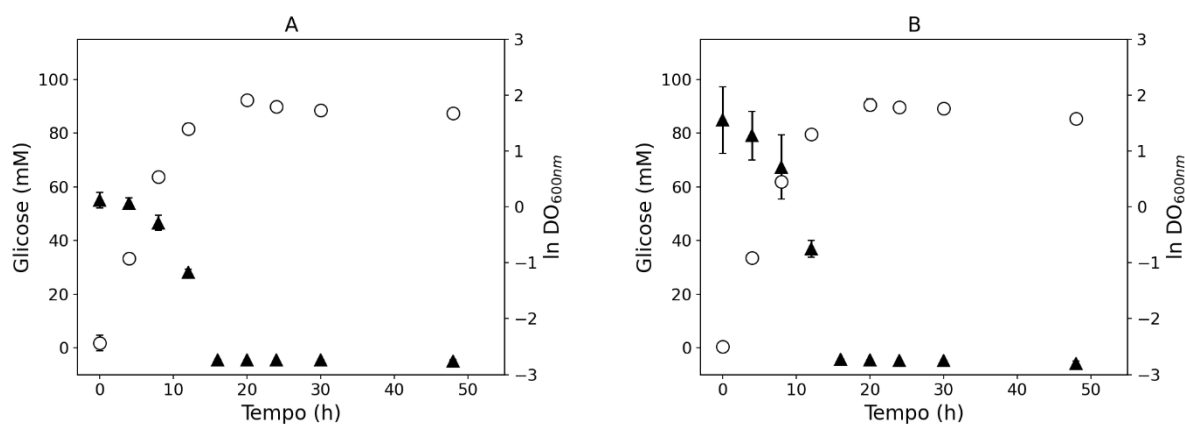
### 5.3. Caracterização fisiológica do isolado M17 obtido após mutagênese

#### 5.3.1 Determinação da velocidade específica de crescimento e análise do consumo de açúcares

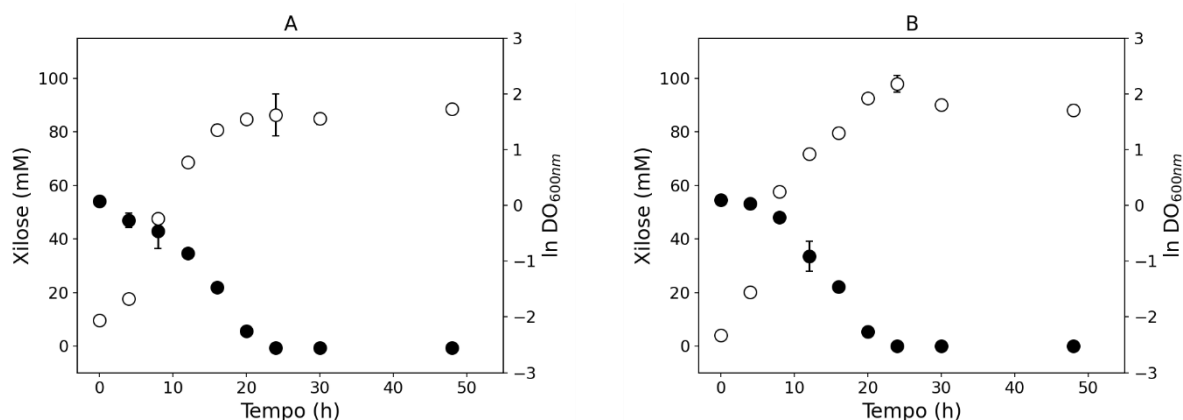
O isolado selecionado, M17, assim como a linhagem selvagem, foram caracterizados fisiologicamente. Para a determinação da velocidade específica de crescimento, *P. laurentii* UFV-1 e M17 foram cultivadas em meio contendo 56 mM de glicose ou 67 mM de xilose como fontes de carbono.

*P. laurentii* UFV-1 e a linhagem M17 não apresentaram diferenças significativas quanto às velocidades específicas de crescimento nos cultivos contendo glicose (Tabela 3). Porém, no

cultivo com xilose, M17 se destacou quanto a velocidade de crescimento ( $0,289 \text{ h}^{-1}$ ) comparado à linhagem selvagem, com  $0,249 \text{ h}^{-1}$ .

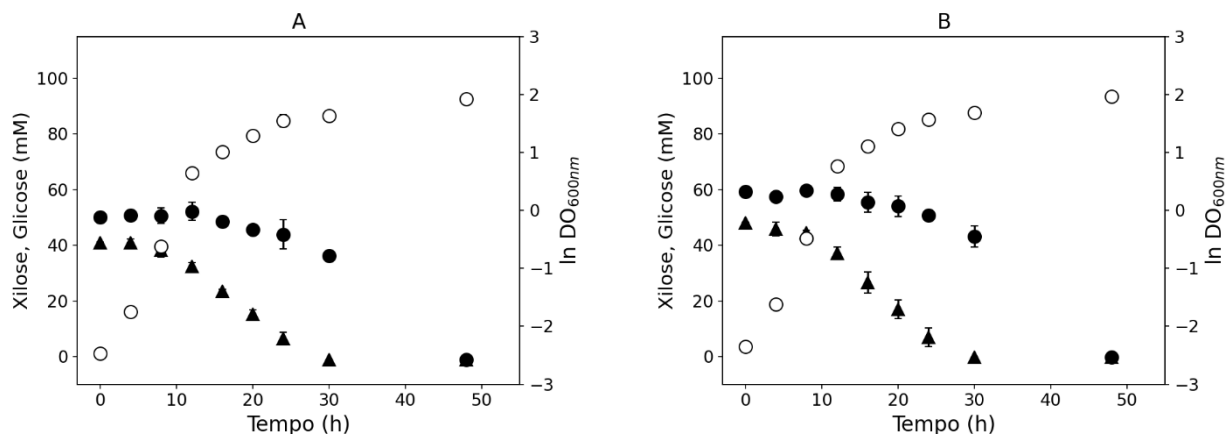


**Figura 4 - Perfil de crescimento e consumo de açúcares de cada linhagem cultivada em meio mínimo YNB acrescido de 56 mM de glicose:** (A) *P. laurentii* UFV-1; (B) M17. ○- Crescimento ( $\ln \text{DO}_{600\text{nm}}$ ) e ▲- Concentração de glicose (mM). Os dados apresentados são médias e os respectivos desvio-padrão dos cultivos realizados em triplicatas.



**Figura 5 - Perfil de crescimento e consumo de açúcares de cada linhagem cultivada em meio mínimo YNB acrescido de 67 mM de xilose:** (A) *P. laurentii* UFV-1; (B) M17. ○- Crescimento ( $\ln \text{DO}_{600\text{nm}}$ ) e ●- Concentração de xilose (mM). Os dados apresentados são médias e os respectivos desvio-padrão dos cultivos realizados em triplicatas.

Com relação ao perfil de consumo de açúcares, verificou-se que o perfil de consumo de glicose e xilose foram similares entre as linhagens selvagem e M17. Nas duas linhagens, a glicose foi totalmente consumida em torno de 20 h de cultivo (Figura 4), enquanto a xilose foi consumida completamente após 24 h de cultivo (Figura 5).



**Figura 6 - Perfil de crescimento e consumo de açúcares das linhagens selvagem e mutante cultivadas em meio mínimo YNB acrescido de 56 mM de glicose e 67 mM de xilose: (A) *P. laurentii* UFV-1; (B) M17. ○- Crescimento ( $\ln DO_{600nm}$ ); ●- Concentração de xilose (mM); e ▲- Concentração de glicose (mM). Os dados apresentados são médias e os respectivos desvio-padrão dos cultivos realizados em triplicatas.**

**Tabela 3.** Taxa específica de crescimento de cada linhagem de levedura em função de cultivo em meio YNB suplementado com 56 mM de glicose e/ou 67 mM de xilose, incubado a 30 °C a 200 rpm.

Levedura	Glicose (56 mM)	Xilose (67 mM)	Glicose e Xilose (56 e 67 mM)
	$\mu^{*2}$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu^{*1}$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu^{*2}$ (h <sup>-1</sup> )
<i>P. laurentii</i> UFV-1	0,324±0,018	0,249±0,003 <i>b</i>	0,262±0,001
M-17	0,319±0,004	0,289±0,010 <i>a</i>	0,262±0,003

\* A velocidade específica de crescimento foi determinada na fase exponencial do crescimento.

<sup>1</sup> Valores de  $\mu$  diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5 % de probabilidade.

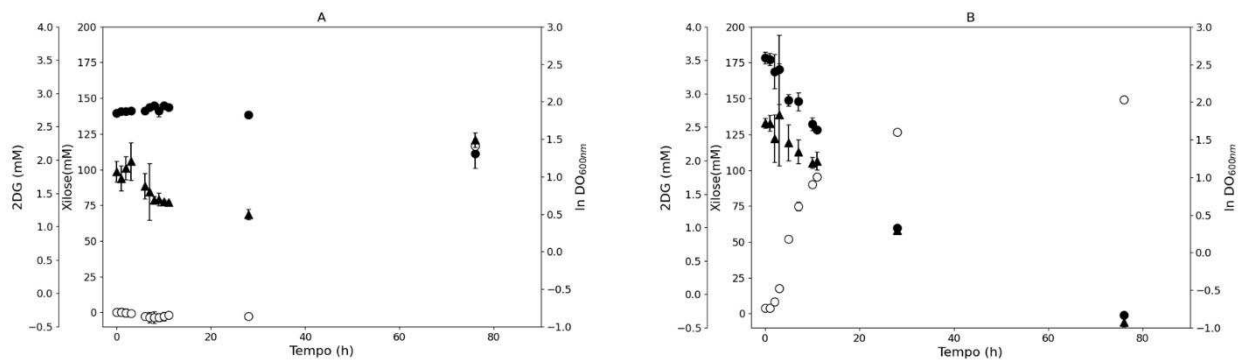
<sup>2</sup> Os valores de  $\mu$  não são significativamente diferentes de acordo com o teste F em nível de 5 % de probabilidade.

As velocidades específicas de crescimento das linhagens selvagem e mutante não diferem estatisticamente em cultivos contendo uma mistura de glicose e xilose (Tabela 3). Além disso, as duas linhagens apresentaram o mesmo perfil de consumo de xilose e glicose, no qual a glicose é consumida antes da xilose (Figura 6). Verificou-se ainda que a taxa de consumo de xilose aumenta à medida que a glicose é consumida. Portanto, o isolado obtido e selecionado após a

mutagênese manteve o fenótipo de repressão catabólica. Estes resultados indicam que a estratégia de seleção baseada na utilização do açúcar 2DG, análogo de glicose, não foi eficiente para a seleção de mutantes capazes de assimilar simultaneamente glicose e xilose.

### 5.3.2 Avaliação do efeito de 2DG no metabolismo de xilose

Apesar da linhagem M17 crescer na concentração de 2DG de 4 mM que inibe a linhagem selvagem, não houve diferença em relação à preferência por glicose, ou seja, este açúcar é consumido primeiro do que a xilose. Nós hipotetizamos que isto pode ter ocorrido em função do análogo 2DG não induzir a repressão por glicose na linhagem M17 ou, por ter adquirido a capacidade de não assimilar este análogo, evitando dessa forma a sinalização intracelular requerida para a ocorrência da repressão catabólica. Sendo assim, as linhagens selvagem e M17 foram cultivadas em meio contendo xilose e 2DG no intuito de avaliar se 2DG é consumido ao longo do tempo (Figura 7).



**Figura 7 - Perfil de crescimento e consumo de açúcares das linhagens selvagem e mutante cultivadas em meio mínimo YNB acrescido de 133 mM de xilose e 4 mM de 2DG: (A) *P. laurentii* UFV-1; (B) M17. ○- Crescimento (ln DO<sub>600nm</sub>); ●- Concentração de xilose (mM); ▲- Concentração de 2-DG (mM). Os dados apresentados são médias e os respectivos desvio-padrão dos cultivos realizados em triplicatas.**

Na presença de xilose e 2DG, o crescimento celular e o consumo de xilose por *P. laurentii* UFV-1 não ocorreram até 24 h de cultivo, indicando que esse composto induziu as vias que sinalizam a repressão catabólica na linhagem selvagem (Figura 7A). Contudo, após 24 h de cultivo ocorreu o consumo de xilose o qual foi acompanhado pelo aumento da concentração de

2DG no meio, indicando que *P. laurentii* UFV-1 apresentou um mecanismo capaz de aliviar a repressão exercida por 2DG sobre o metabolismo de xilose. Aparentemente, todo o composto deve ter sido liberado do meio intracelular, visto que a concentração de 2DG é similar à presente no meio de cultura, antes do início do cultivo. Diferente da linhagem selvagem, a linhagem M17 cresceu desde o início do cultivo e consumiu simultaneamente a xilose e 2DG (Figura 7B). Portanto, 2DG não induziu a repressão catabólica nessa linhagem. Sendo assim, a hipótese de que o crescimento da M17 pudesse ter ocorrido em função da não assimilação de 2DG pela levedura e, conseqüentemente, a não sinalização intracelular da repressão catabólica foi refutada. Esses resultados indicam que ocorreram alterações genótípicas na linhagem M17 que levaram a uma resposta específica para o composto 2DG, ou seja, que não foram capazes de aliviar a repressão do metabolismo de xilose causada por glicose. A levedura *S. passalidarum* apresenta uma resposta ao análogo 2DG semelhante à da linhagem mutante M17 e diferente da linhagem selvagem de *P. laurentii* UFV-1. Nos estudos de Ribeiro *et al.* (2021), a repressão do metabolismo de xilose por glicose é observada, mas não foi observada em cultivos com 2DG e xilose. Além disso, o uso de 2DG não inibiu o crescimento desta levedura. Esses autores sugeriram que a *S. passalidarum* não está sob o controle da via clássica de repressão por glicose.

### **5.3.3 Comparação do teor de lipídios entre as linhagens selvagem e M17 de *P. laurentii* UFV-1**

Visto que o procedimento de mutagênese por irradiação ultravioleta pode levar à alterações fenotípicas não necessariamente relacionadas à alteração alvo, foi avaliada a produção e o teor de lipídios da M17 em comparação à linhagem selvagem. Os cultivos foram realizados em meio SS2 com razão carbono: nitrogênio (C/N = 100:1), pois o acúmulo de lipídios em leveduras oleaginosas é favorecido em condições de limitação de nitrogênio e pelo excesso de carbono.

Apesar de não haver diferença estatística no que diz respeito à formação de biomassa e rendimento de biomassa entre as linhagens selvagem e M17, a velocidade específica de crescimento no meio SS2 foi mais baixa na linhagem M17 do que na selvagem (Tabela 4).

**Tabela 4.** Parâmetros de crescimento e de produção de lipídios da linhagem selvagem e mutante cultivadas em meio SS2 com alta razão carbono: nitrogênio (C/N = 100:1). A concentração de lipídios e o teor de lipídios foram quantificados no período de 48 h de cultivo.

Linhagem	$\mu$ <sup>*1</sup> (h <sup>-1</sup> )	Biomassa <sup>2</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Teor de lipídios <sup>2</sup> (%)	Lipídio <sup>2</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento de biomassa (g.g <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>
<i>P. laurentii</i> UFV-1	<b>0,227 ± 0,003</b> a	<b>5,085 ± 0,317</b>	<b>40,72 ± 3,01</b>	<b>2,14 ± 0,15</b>	<b>0,23 ± 0,02</b>
M17	<b>0,210 ± 0,002</b> b	<b>4,603 ± 1,394</b>	<b>38,59 ± 0,86</b>	<b>1,77 ± 0,51</b>	<b>0,30 ± 0,04</b>

\* A velocidade específica de crescimento foi determinada na fase exponencial.

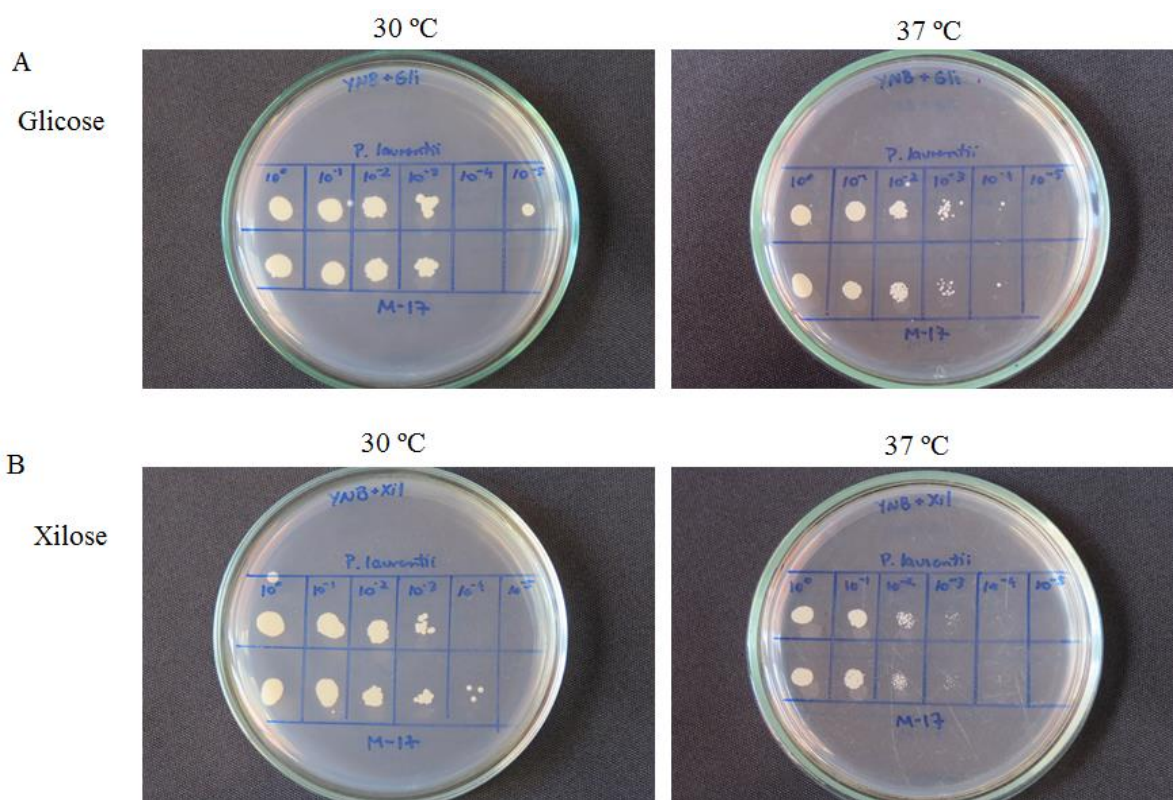
<sup>1</sup> Os valores de  $\mu$  diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Os valores de biomassa, teor de lipídios, concentração de lipídio e rendimento de biomassa não são significativamente diferentes de acordo com o teste F em nível de 5 % de probabilidade.

Observou-se também que não houve diferenças significativas em relação ao teor e concentração de lipídios entre as linhagens selvagem e M17. Portanto, observa-se que a linhagem selecionada não apresentou diferença em relação ao fenótipo oleaginoso.

#### 5.3.4 Avaliação do efeito da temperatura sobre o crescimento das linhagens selvagem e M17 de *P. laurentii* UFV-1

O fenótipo de termotolerância de leveduras é desejável em processos de sacarificação e fermentação simultâneas empregados em biorrefinarias lignocelulósicas. Isto ocorre porque as enzimas hidrolíticas que atuam na sacarificação dos polímeros de biomassas lignocelulósicas apresentam temperaturas ótimas em torno de 50 °C. *P. laurentii* não é uma levedura termotolerante. Como mencionado anteriormente, as mutações geradas por irradiação ultravioleta são aleatórias e podem alterar diferentes fenótipos. No intuito de avaliar possíveis mudanças em relação ao crescimento em temperaturas mais elevadas, as linhagens selvagem e M17 foram cultivadas em meio ágar YNB acrescido de 111 mM de glicose ou 133 mM de xilose. As temperaturas de 30 e 37 °C foram avaliadas.



**Figura 8- Avaliação do crescimento de *P. laurentii* UFV-1 e a linhagem M17 sob diferentes temperaturas:** (A) cultivo em meio mínimo, acrescido de 111 mM de glicose e (B) 133 mM de xilose, a linhagem selvagem foi inoculada na parte superior das placas, seguida pela M17 na parte inferior de cada placa.

O crescimento das linhagens é favorecido a 30 °C independente da fonte de carbono avaliada. Observou-se também que a 37 °C o crescimento em glicose foi maior do que em xilose (Figura 8). Portanto, a linhagem M17 selecionada neste trabalho não aparenta ter adquirido fenótipo de termotolerância após o procedimento de mutagênese, uma vez que a 37°C o crescimento foi prejudicado.

## 6 CONCLUSÕES

Apesar de *P. laurentii* UFV-1 apresentar afinidades similares por glicose e xilose, a glicose é consumida primeiro do que a xilose em cultivos conduzidos em meios contendo os dois açúcares.

Linhagens mutantes capazes de crescer na presença de 2DG e xilose foram selecionadas neste estudo. A linhagem M17, selecionada em função do maior crescimento na presença de 2DG, apresenta o fenômeno de repressão catabólica induzido por glicose. Contudo, o mutante M17 foi insensível ao composto 2DG, isto é, a repressão catabólica não foi induzida por este composto. Estudos futuros devem ser realizados para sequenciar o genoma da linhagem M17 para identificar as alterações que conferiram uma resposta específica ao análogo 2DG.

A linhagem selvagem de *P. laurentii* UFV-1 foi capaz de secretar o análogo 2DG no meio de cultivo após 24 horas de cultivo, o que a permitiu crescer em função do consumo de xilose.

O acúmulo de lipídios e o crescimento nas temperaturas de 30 °C e 37 °C foram similares entre as linhagens selvagem e M17.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adrio, J. L. (2017). Oleaginous yeasts: promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, 114(9), 1915-1920.

Barlow, D. E., Biffinger, J. C., Estrella, L., Lu, Q., Hung, C. S., Nadeau, L. J., & Crookes-Goodson, W. J. (2020). Edge-localized biodeterioration and secondary microplastic formation by *Papiliotrema laurentii* unsaturated biofilm cells on polyurethane films. **Langmuir**, 36(6), 1596-1607.

Beopoulos, A., Nicaud, J. M., & Gaillardin, C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 90(4), 1193-1206.

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, 37(8), 911-917.

Bommareddy, R. R., Sabra, W., & Zeng, A. P. (2017). Glucose-mediated regulation of glycerol uptake in *Rhodospiridium toruloides*: Insights through transcriptomic analysis on dual substrate fermentation. **Engineering in Life Sciences**, 17(3), 282-291.

Carota, E., Crognale, S., D'Annibale, A., Gallo, A. M., Stazi, S. R., & Petruccioli, M. (2017). A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. **Science of the Total Environment**, 584, 554-560.

Chattopadhyay, A., Singh, R., Das, A. K., & Maiti, M. K. (2020). Characterization of two sugar transporters responsible for efficient xylose uptake in an oleaginous yeast *Candida tropicalis* SY005. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 695, 108645.

Chen, J., Wang, X., Zhang, B., Yang, Y., Song, Y., Zhang, F., & Lü, X. (2021). Integrating enzymatic hydrolysis into subcritical water pretreatment optimization for bioethanol production from wheat straw. **Science of The Total Environment**, 770, 145321.

Costa, D. A., de Souza, C. J., Costa, P. S., Rodrigues, M. Q., dos Santos, A. F., Lopes, M. R., & Fietto, L. G. (2014). Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98(8), 3829-3840.

- Easterling, E. R., French, W. T., Hernandez, R., & Licha, M. (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresource Technology**, 100(1), 356-361.
- Fakas, S. (2017). Lipid biosynthesis in yeasts: A comparison of the lipid biosynthetic pathway between the model nonoleaginous yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the model oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Engineering in Life Sciences**, 17(3), 292-302.
- Fatehi, P. (2013). Production of biofuels from cellulose of woody biomass. In Cellulose-Biomass Conversion. **InTechOpen**.
- Goffrini, P., Ficarelli, A., Donnini, C., Lodi, T., Puglisi, P. P., & Ferrero, I. (1996). FOG1 and FOG2 genes, required for the transcriptional activation of glucose-repressible genes of *Kluyveromyces lactis*, are homologous to GAL83 and SNF1 of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current genetics**, 29(4), 316-326.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74(5), 937-953.
- Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K., & Prior, B. A. (1994). Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, 16(11), 933-943.
- Hansson, L., & Dostálek, M. (1986). Influence of cultivation conditions on lipid production by *Cryptococcus albidus*. **Applied microbiology and biotechnology**, 24(1), 12-18.
- Hedbacker, K., & Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. **Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library**, 13, 2408.
- Hernández-López, M. J., Prieto, J. A., & Randez-Gil, F. (2010). Isolation and characterization of the carbon catabolite-derepressing protein kinase Snf1 from the stress tolerant yeast *Torulaspora delbrueckii*. **Yeast**, 27(12), 1061-1069.
- Hua, Y., Wang, J., Zhu, Y., Zhang, B., Kong, X., Li, W., & Hong, J. (2019). Release of glucose repression on xylose utilization in *Kluyveromyces marxianus* to enhance glucose-xylose co-utilization and xylitol production from corncob hydrolysate. **Microbial cell factories**, 18(1), 1-18.

- Hu, C., Wu, S., Wang, Q., Jin, G., Shen, H., & Zhao, Z. K. (2011). Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*. **Biotechnology for Biofuels**, 4(1), 25.
- Kahar, P., Taku, K., & Tanaka, S. (2011). Enhancement of xylose uptake in 2-deoxyglucose tolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, 111(5), 557-563.
- Kamineni, A., & Shaw, J. (2020). Engineering triacylglycerol production from sugars in oleaginous yeasts. **Current Opinion in Biotechnology**, 62, 239-247.
- Kanai, T., Ogawa, K., Ueda, M., & Tanaka, A. (1999). Expression of the SNF1 gene from *Candida tropicalis* is required for growth on various carbon sources, including glucose. **Archives of microbiology**, 172(4), 256-263.
- Kayikci, Ö. & Nielsen, J. (2015). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, 15(6), fov068.
- Kilian, S. G., & Van Uden, N. (1988). Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 27(5), 545-548.
- Kim, J. H., Roy, A., Jouandot II, D., & Cho, K. H. (2013). The glucose signaling network in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, 1830(11), 5204-5210.
- Klug, L., & Daum, G. (2014). Yeast lipid metabolism at a glance. **FEMS Yeast Research**, 14(3), 369-388.
- Kuanyshev, N., Deewan, A., Jagtap, S. S., Liu, J., Selvam, B., Chen, L. Q., ... & Jin, Y. S. (2021). Identification and analysis of sugar transporters capable of co-transporting glucose and xylose simultaneously. **Biotechnology journal**, 16(11), 2100238.
- Lane, S., Xu, H., Oh, E. J., Kim, H., Lesmana, A., Jeong, D. & Kim, S. R. (2018). Glucose repression can be alleviated by reducing glucose phosphorylation rate in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, 8(1), 1-12.
- Leandro, M. J., Fonseca, C., & Gonçalves, P. (2009). Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS Yeast Research**, 9(4), 511-525.

- Leguina, A. C. D. V., Barrios, A. C., Soro, M. D. M. R., Lacosegliaz, M. J., Pajot, H. F., de Figueroa, L. I. C., & Nieto-Penalver, C. G. (2019). Copper alters the physiology of tomato rhizospheric isolates of *Papiliotrema laurentii*. **Scientia Horticulturae**, 243, 376-384.
- Li, H., Schmitz, O., & Alper, H. S. (2016). Enabling glucose/xylose co-transport in yeast through the directed evolution of a sugar transporter. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100(23), 10215-10223.
- Liu, X. Z., Wang, Q. M., Göker, M., Groenewald, M., Kachalkin, A. V., Lumbsch, H. T., & Bai, F. Y. (2015). Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. **Studies in mycology**, 81(1), 85-147.
- Martins, G. M., Bocchini-Martins, D. A., Bezzerra-Bussoli, C., Pagnocca, F. C., Boscolo, M., Monteiro, D. A., & Gomes, E. (2018). The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, 49(1), 162-168.
- Mikumo, D., Takaya, M., Orikasa, Y., & Ohwada, T. (2015). Improved leavening ability of a wild yeast, *Saccharomyces cerevisiae* AK46 2-deoxyglucose resistant mutant. **Food Science and Technology Research**, 21(4), 623-630.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Oda, Y., & Nakamura, K. (2009). Production of ethanol from the mixture of beet molasses and cheese whey by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. **FEMS yeast research**, 9(5), 742-748.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 113(8), 1031-1051.
- Parsons, S., Allen, M. J., & Chuck, C. J. (2020). Coproducts of algae and yeast-derived single cell oils: a critical review of their role in improving biorefinery sustainability. **Bioresource Technology**, 303, 122862.
- Petter, R., & Kwon-Chung, K. J. (1996). Disruption of the SNF1 gene abolishes trehalose utilization in the pathogenic yeast *Candida glabrata*. **Infection and immunity**, 64(12), 5269-5273.

- Poontawee, R., Yongmanitchai, W., & Limtong, S. (2017). Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production. **Process Biochemistry**, 53, 44-60.
- Qiao, K., Abidi, S. H. I., Liu, H., Zhang, H., Chakraborty, S., Watson, N., & Stephanopoulos, G. (2015). Engineering lipid overproduction in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. **Metabolic Engineering**, 29, 56-65.
- Ribeiro, L. E., Albuini, F. M., Castro, A. G., Campos, V. J., de Souza, G. B., Mendonça, J. G., ... & Fietto, L. G. (2021). Influence of glucose on xylose metabolization by *Spathaspora passalidarum*. **Fungal Genetics and Biology**, 157, 103624.
- Rodrussamee, N., Sattayawat, P., & Yamada, M. (2018). Highly efficient conversion of xylose to ethanol without glucose repression by newly isolated thermotolerant *Spathaspora passalidarum* CMUWF1–2. **BMC microbiology**, 18(1), 1-11.
- Runquist, D., Fonseca, C., Rådström, P., Spencer-Martins, I., & Hahn-Hägerdal, B. (2009). Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, 82(1), 123-130.
- Sarkar, S., Mukherjee, A., Das, S., Ghosh, B., Chaudhuri, S., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2019). Nitrogen deprivation elicits dimorphism, capsule biosynthesis and autophagy in *Papiliotrema laurentii* strain RY1. **Micron**, 124, 102708.
- Schmidt, M. C., & O'Donnell, A. F. (2021). 'Sugarcoating' 2-deoxyglucose: mechanisms that suppress its toxic effects. **Current Genetics**, 67(1), 107-114.
- Seip, J., Jackson, R., He, H., Zhu, Q., & Hong, S. P. (2013). Snf1 is a regulator of lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. **Applied Environmental Microbiology** 79(23), 7360-7370.
- Sharma, N. K., Behera, S., Arora, R., Kumar, S., & Sani, R. K. (2018). Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: current status. **Journal of bioscience and bioengineering**, 125(3), 259-267.
- Shashkova, S., Welkenhuysen, N., & Hohmann, S. (2015). Molecular communication: crosstalk between the Snf1 and other signaling pathways. **FEMS Yeast Research**, 15(4).

Sitepu, I. R., Sestric, R., Ignatia, L., Levin, D., German, J. B., Gillies, L. A., & Boundy-Mills, K. L. (2013). Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. **Bioresource Technology**, 144, 360-369.

Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Endoh, R., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., & Shima, J. (2014). Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. **Bioresource technology**, 153, 230-235.

Tiukova, I. A., Brandenburg, J., Blomqvist, J., Sampels, S., Mikkelsen, N., Skaugen, M. & Kerkhoven, E. J. (2019). Proteome analysis of xylose metabolism in *Rhodotorula toruloides* during lipid production. **Biotechnology for Biofuels**, 12(1), 137.

Ventorim, R. Z., de Moura Ferreira, M. A., de Almeida, E. L. M., Kerkhoven, E. J., & da Silveira, W. B. (2022). Genome-scale metabolic model of oleaginous yeast *Papiliotrema laurentii*. **Biochemical Engineering Journal**, 108353.

Vieira, N. M., Dos Santos, R. C. V., Germano, V. K. D. C., Ventorim, R. Z., de Almeida, E. L. M., da Silveira, F. A., ... & da Silveira, W. B. (2020). Isolation of a new *Papiliotrema laurentii* strain that displays capacity to achieve high lipid content from xylose. **3 Biotech**, 10(9), 1-14.

Vieira, N. M. (2018). Physiological, genomic and metabolic characterization of the oleaginous yeast *Papiliotrema laurentii* UFV-1. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2018.

Yamada, R., Yamauchi, A., Kashihara, T., & Ogino, H. (2017). Evaluation of lipid production from xylose and glucose/xylose mixed sugar in various oleaginous yeasts and improvement of lipid production by UV mutagenesis. **Biochemical Engineering Journal**, 128, 76-82.

Yu, X., Zheng, Y., Xiong, X., & Chen, S. (2014). Co-utilization of glucose, xylose and cellobiose by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. **Biomass and Bioenergy**, 71, 340-349.

Wiebe, M. G., Koivuranta, K., Penttilä, M., & Ruohonen, L. (2012). Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. **BMC biotechnology**, 12(1), 1-10.

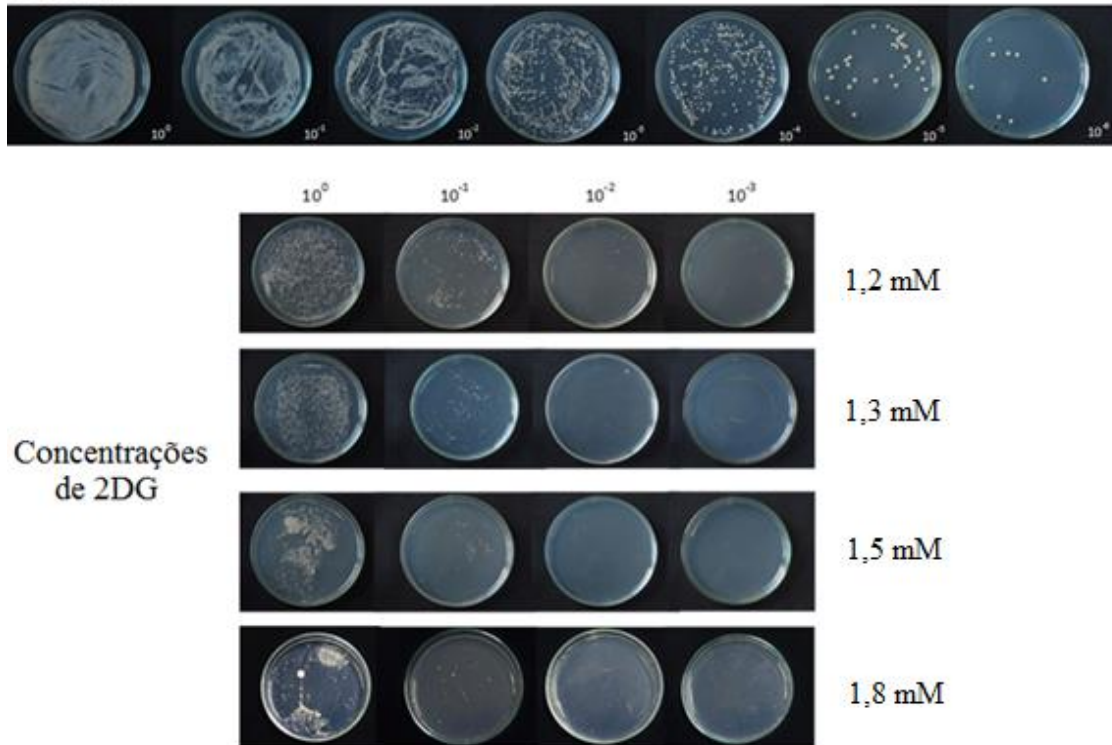
Winston, F. (2008). EMS and UV mutagenesis in yeast. **Current Protocols in Molecular Biology**, 82(1), 13-3.

Zhao, X., Kong, X., Hua, Y., Feng, B., & Zhao, Z. (2008). Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 110(5), 405-412.

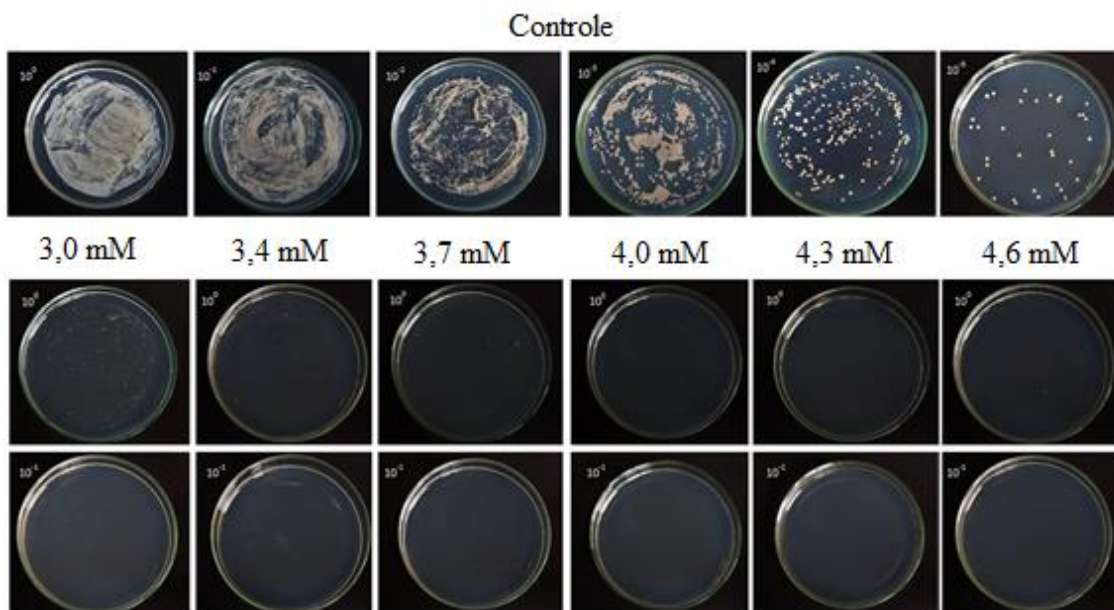
Zhu, L. Y., Zong, M. H., & Wu, H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. **Bioresource Technology**, 99(16), 7881-7885.

## APÊNDICE

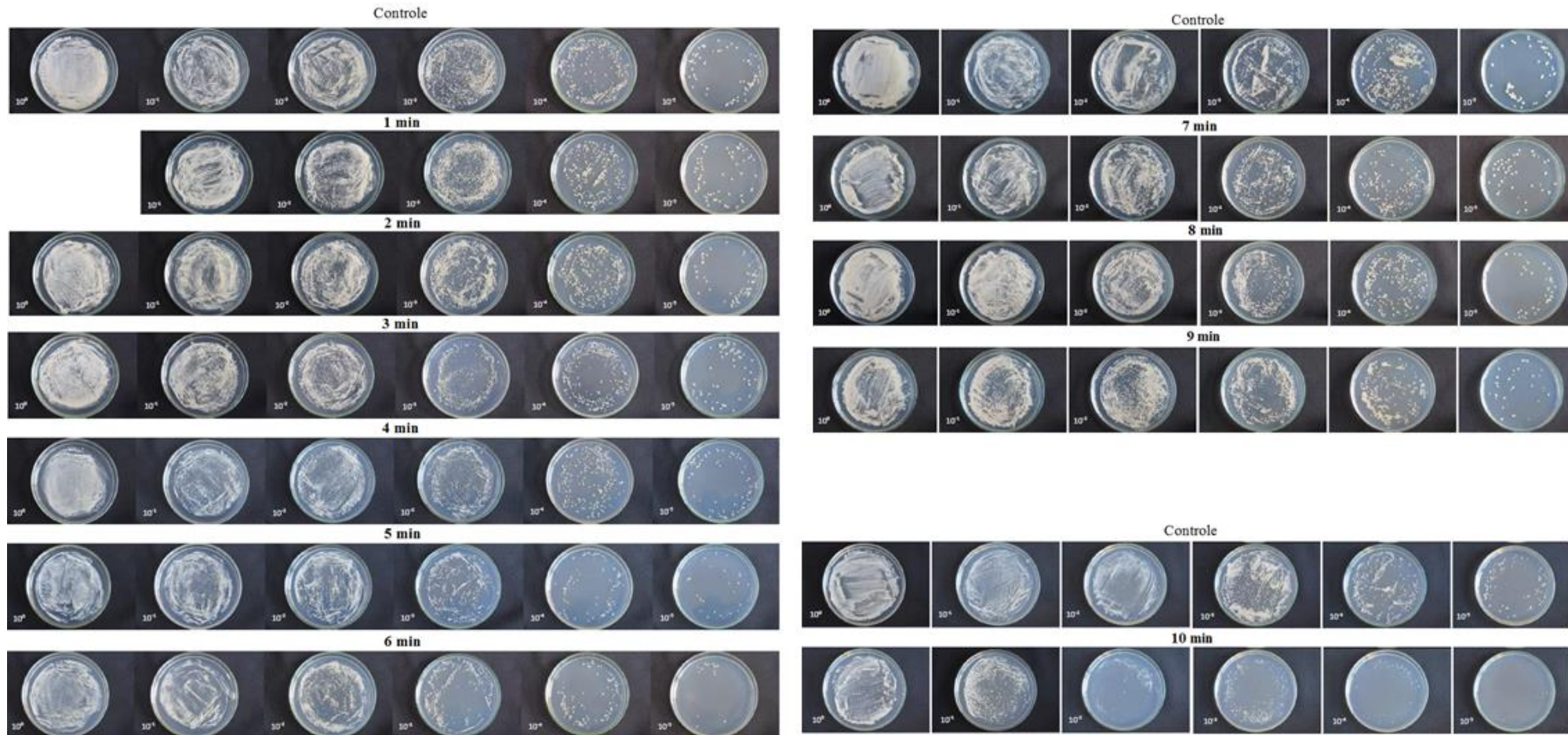
### Controle



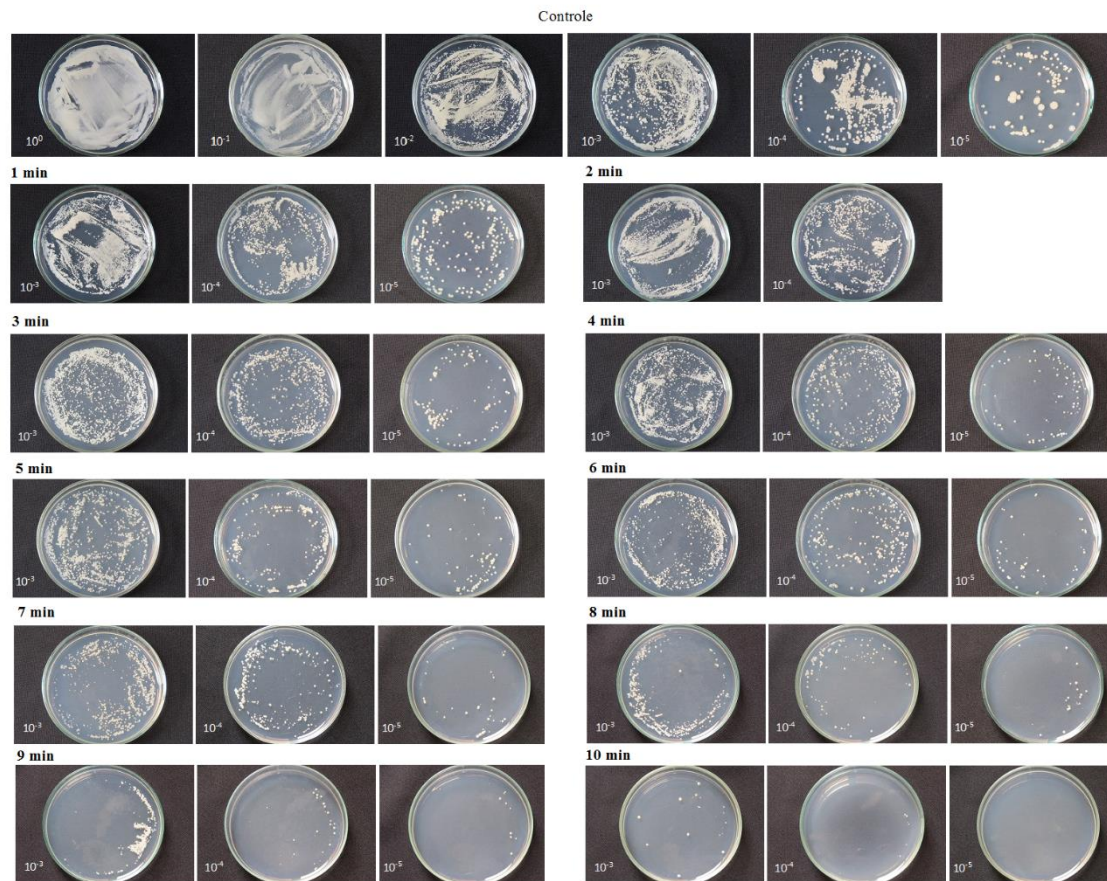
**Figura A1 – Análise do crescimento de *P. laurentii* UFV-1 em diferentes concentrações de 2-DG.** A levedura foi cultivada em meio sólido YNB contendo 133 mM de xilose e 2-DG (1,2 a 1,8 mM) e incubada a 30 °C por 72 h.



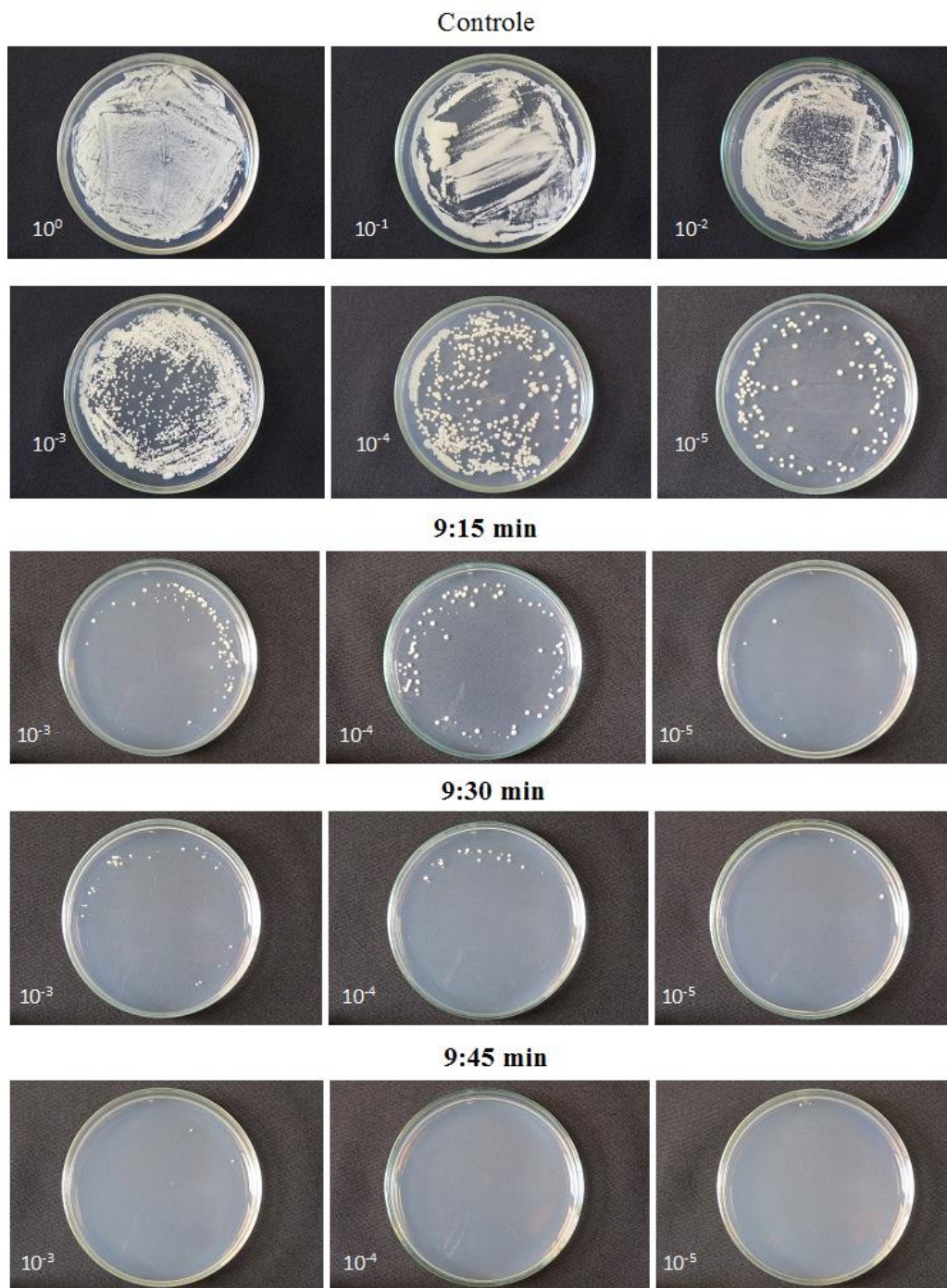
**Figura A2 - Determinação da concentração mínima inibitória de 2-DG em *P. laurentii* UFV-1.** A levedura foi cultivada em meio sólido YNB contendo 133 mM de xilose e 2-DG (3,0 a 4,6 mM) e incubada a 30 °C por 72 h.



**Figura A3 – Irradiação ultravioleta de *P. laurentii* UFV-1 a 13 cm de distância nos tempos de 1 a 10 min. A levedura foi plaqueada em meio sólido YNB contendo 133 mM de xilose e irradiada por luz ultravioleta, seguida por incubação a 30 °C por 72 h.**



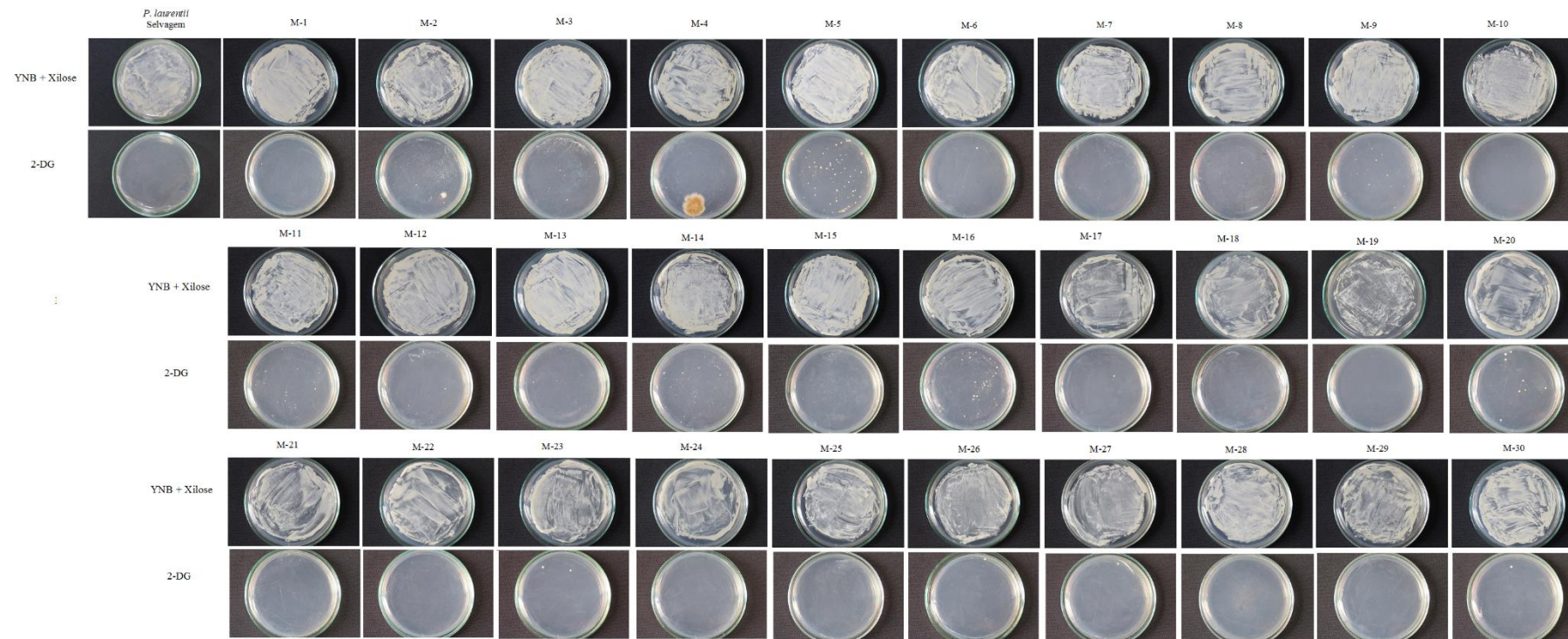
**Figura A4 - Irradiação ultravioleta de *P. laurentii* UFV-1 a 10 cm de distância nos tempos de 1 a 10 min** A levedura foi plaqueada em meio sólido YNB contendo 133 mM de xilose e irradiada em diferentes tempos por luz ultravioleta, seguida por incubação a 30 °C por 72 h.



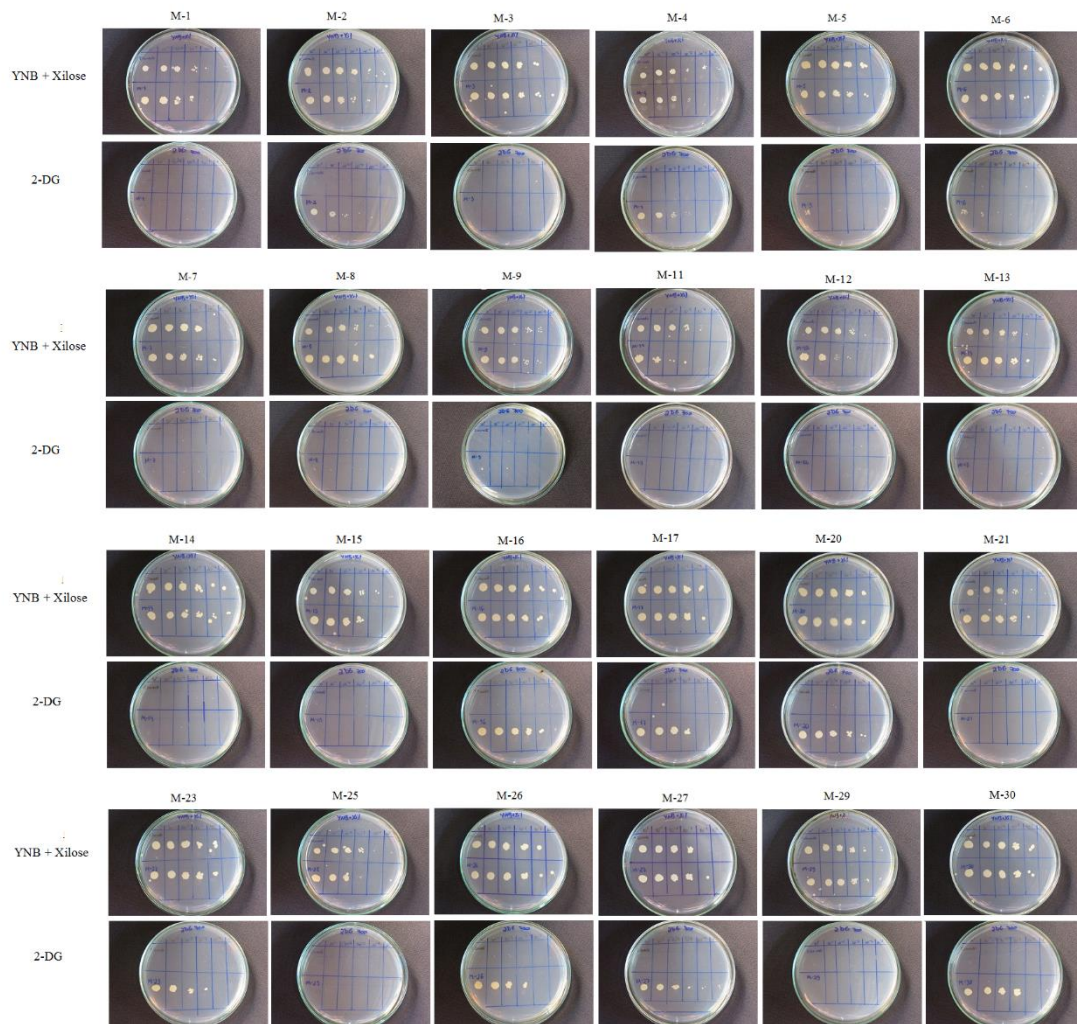
**Figura A5 – Irradiação ultravioleta em *P. laurentii* UFV-1 a 10 cm de distância no intervalo entre 9 a 10 min.** A levedura foi plaqueada em meio sólido YNB contendo 133 mM de xilose, irradiada em diferentes tempos e incubada a 30 °C por 72 h. O tempo de 9 min e 15 seg correspondeu a uma taxa de mortalidade de aproximadamente 99% da população de células.

**Tabela A1. Determinação da taxa de sobreviventes de *P. laurentii* UFV-1 após irradiação ultravioleta em diferentes distâncias e tempos de exposição.** A taxa de sobreviventes foi determinada a partir da contagem das unidades formadoras de colônias.

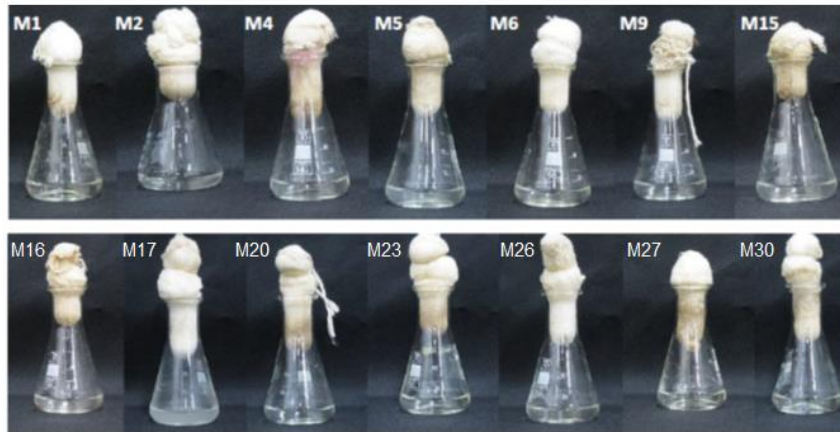
<b>Tempo (min)</b>	<b>Taxa de sobrevivência celular (%)</b>	
	<b>13 cm</b>	<b>10 cm</b>
<b>1</b>	82,35	246,15
<b>2</b>	76,47	184,62
<b>3</b>	88,24	115,38
<b>4</b>	111,76	84,62
<b>5</b>	42,35	73,08
<b>6</b>	21,18	46,16
<b>7</b>	85,71	36,15
<b>8</b>	78,57	20,77
<b>9</b>	62,86	3,77
<b>9:15</b>	-	0,72
<b>9:30</b>	-	0,23
<b>9:45</b>	-	0,02
<b>10</b>	0,01	0,20



**Figura A6 – Determinação dos isolados tolerantes a concentração mínima inibitória de 2DG.** Os 30 isolados foram plaqueados em meio sólido YNB contendo 133 mM de xilose e 4 mM de 2DG. Foram observadas formação de colônias em 24 isolados após incubação a 30 °C por 72 h. Os isolados M10, M18, M19, M22, M24 e M28 não cresceram nas condições mencionadas.



**Figura A7 – Isolados tolerantes a concentração mínima inibitória de 2DG.** Os 24 isolados foram plaqueados em meio sólido YNB contendo 133 mM de xilose e 4,3 mM de 2DG. Após incubação a 30 °C por 72 h, 14 isolados apresentaram crescimento. Não foram observadas formação de colônias para os isolados M3, M7, M8, M11, M12, M13, M14, M21, M25 e M29.



**Figura A8 – Cultivo dos 14 possíveis mutantes em meio líquido contendo 2DG.** Uma colônia isolada de cada um dos possíveis mutantes foi inoculada em meio YNB contendo 133 mM de xilose e 4 mM de 2DG a 30 °C e 200 rpm por até 5 dias ou turvação do meio de cultivo.