

LÍLIAN EMÍDIO RIBEIRO

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA GLICOSE SOBRE O METABOLISMO DE
XILOSE EM *Spathaspora passalidarum***

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*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R484a
2017
Ribeiro, Lílian Emídio, 1992-
Análise da influência da glicose sobre o metabolismo de
xilose em *Spathaspora passalidarum* / Lílian Emídio Ribeiro. –
Viçosa, MG, 2017.
vii, 41f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.36-41.

1. *Spathaspora passalidarum*. 2. Biocombustíveis.
3. Glicose. 4. Fermentação. 5. Xilose. 6. Etanol. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

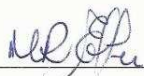
CDD 22 ed. 579.56

LÍLIAN EMÍDIO RIBEIRO

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA GLICOSE SOBRE O METABOLISMO DE
XILOSE EM *Spathaspora passalidarum***

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*.

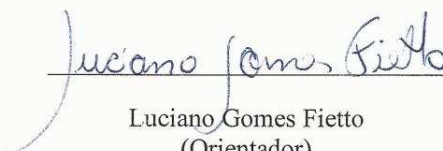
APROVADA: 24 de julho de 2017.



Monique Renon Eller



Raphael Hermano Santos Diniz



Luciano Gomes Fietto
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar saúde e colocar pessoas especiais na minha vida.

Aos meus pais, Marta e José do Carmo, e minhas irmãs, Letícia e Livia, pelo amor e incentivo incondicionais. Aos meus sobrinhos, Henrique e Heitor, que com seus sorrisos me deram forças. Ao meu namorado André pelo companheirismo, auxílio e compreensão.

À Universidade Federal de Viçosa, ao departamento de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e o departamento de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada pela oportunidade e acolhimento.

Ao professor Luciano Gomes Fietto pela oportunidade, confiança, ensinamentos e compreensão.

Aos professores Mateus Ferreira Santana e Wendel Batista da Silveira pelas contribuições, ensinamentos e disponibilidade.

Aos membros da banca, Prof^a. Monique Renon Eller e Dr. Raphael Hermano Santos Diniz, por terem aceitado participar da banca e contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Professor Carlos Augusto Rosa por ceder a linhagem para a realização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM), obrigada pela convivência e imensa ajuda. Em especial ao Alex, Aninha, Ananda, Fernanda, Gilza, Patrícia e Valquíria pela ajuda direta nos experimentos, disponibilidade e imenso apoio. Ao Fernando do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos pela ajuda nos experimentos em hipoxia. Fernanda, Patrícia e Valquíria muito obrigada também pelo apoio nessa reta final e contribuições com o trabalho.

Muito obrigada às velhas e novas amigas pelos momentos de descontração, incentivo e ajuda. Em especial à Aline e Gabriel, minha família viçosense. À Larissa por sempre me incentivar, mesmo não estando por perto. À Raquel, companheira de todas as horas durante todo o mestrado.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos. Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela ajuda e convivência, em especial ao João Guilherme pelo auxílio no manuseio do HPLC.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A todos que ajudaram, direta ou indiretamente, na realização desse trabalho, meu muito obrigada.

BIOGRAFIA

Lílian Emídio Ribeiro, filha de Luzia Marta Emídio Ribeiro e José do Carmo Ribeiro nasceu em 05 de abril de 1992 na cidade de Guiricema, Minas Gerais. Graduou-se em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa em 2015. Em agosto de 2015, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Bioetanol.....	3
2.2 Microrganismos fermentadores.....	4
2.2 Influência da glicose no metabolismo de xilose.....	6
3. OBJETIVOS.....	11
3.1 Objetivo geral.....	11
3.2 Objetivos específicos.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 Microrganismos e meio de cultivo.....	12
4.2 Análise de repressão por glicose usando o análogo 2-desoxiglicose.....	12
4.3 Parâmetros cinéticos de crescimento.....	12
4.4 Ensaio de fermentação.....	13
4.5 Métodos analíticos.....	14
4.6 Relação entre absorvância a 600 nm (A600) e massa celular seca (g/L).....	14
4.7 Parâmetros fermentativos e de crescimento.....	15
4.7 Análise de expressão gênica por pcr em tempo real (qRT-PCR).....	16
5. RESULTADOS.....	18
5.1 O metabolismo de xilose da levedura <i>S. passalidarum</i> não sofre repressão clássica por glicose.....	18
5.2 Cinética de crescimento de <i>S. passalidarum</i> em função da concentração de xilose e/ou glicose.....	19
5.3 A glicose afeta o metabolismo de xilose de <i>S. passalidarum</i>	22
5.4 A presença de xilose induz a expressão de genes que codificam enzimas importantes do seu metabolismo.....	26
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÃO.....	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

RESUMO

RIBEIRO, Lílian Emídio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Análise da influência da glicose sobre o metabolismo de xilose em *Spathaspora passalidarum***. Orientador: Luciano Gomes Fietto. Coorientadores: Mateus Ferreira Santana e Wendel Batista da Silveira.

A levedura *Spathaspora passalidarum* converte de maneira eficiente xilose a etanol, se destacando para fermentação de hidrolisados lignocelulósicos. Possui uma cópia adicional do gene que codifica a enzima xilose redutase (*XYL 1.2*) com preferência pelo cofator NADH, permitindo o estabelecimento do equilíbrio redox durante o metabolismo de xilose. O objetivo deste trabalho foi analisar como a glicose influencia a fermentação de xilose por *S. passalidarum*. A avaliação do crescimento em meio contendo xilose e 2-DOG revelou que *S. passalidarum* não possui repressão por glicose no metabolismo de xilose. Foram feitos ensaios fermentativos em batelada com xilose e/ou glicose em aerobiose e hipoxia, para avaliação dos parâmetros cinéticos de fermentação e crescimento. *S. passalidarum* apresentou maiores rendimentos de biomassa no cultivo em glicose comparado ao cultivo em xilose nas duas condições de oxigênio. O melhor rendimento e produtividade de etanol foram encontrados no cultivo em xilose em aerobiose ($Y_{(P/S)} = 0,45$ g/g e $Q_p = 1,51$ g/L.h). A mistura de açúcares, glicose e xilose não interfere nos rendimentos ou produtividades de etanol, visto que foram similares aos encontrados durante a fermentação de xilose. O perfil de consumo dos açúcares em cofermentação foi diferente nas duas condições de oxigênio. As análises da expressão dos genes que codificam as enzimas do metabolismo de xilose (*XR*, *XDH* e *XK*) por qRT-PCR revelaram que esses genes são induzidos por xilose e não são reprimidos por glicose. Os dois genes que codificam a enzima xilose redutase (*XR*) em *S. passalidarum* apresentaram perfil de expressão diferente em xilose e cofermentação. No cultivo em xilose (aerobiose e hipoxia) e cofermentação em aerobiose, o gene *XYL 1.2* foi mais expresso do que o gene *XYL 1.1*. Entretanto, no cultivo em cofermentação em hipoxia o gene *XYL 1.1* foi mais expresso do que o gene *XYL 1.2*, sugerindo que a expressão destes genes pode ser controlada pelo estado redox da célula. Dessa forma, o consumo simultâneo ou não dos açúcares glicose e xilose em diferentes condições de oxigênio por *S. passalidarum*, não é uma questão de repressão da glicose na síntese das enzimas do metabolismo de xilose, e sim uma adaptação fisiológica da célula para estabelecer o equilíbrio redox.

ABSTRACT

RIBEIRO, LÍlian Emídio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Analysis of the influence of glucose on xylose metabolism in *Spathaspora passalidarum*.** Adviser: Luciano Gomes Fietto. Co-advisers: Mateus Ferreira Santana and Wendel Batista da Silveira.

The yeast *Spathaspora passalidarum* efficiently converts xylose to ethanol, standing out for fermentation of lignocellulosic hydrolysate. It has an extra copy of the gene that encodes the enzyme xylose reductase (*XYL* 1.2) which prefers the cofactor NADH, allowing the establishment of a redox balance during xylose metabolism. The aim of this work was to analyze how glucose exerts influence on xylose fermentation by *S. passalidarum*. The evaluation of growth on medium containing xylose and 2-DOG revealed that *S. passalidarum* does not show glucose repression on xylose metabolism. Batch fermentative experiments were performed with xylose and/or glucose in aerobic condition and hypoxia, in order to evaluate the kinetic parameters of fermentation and growth. *S. passalidarum* showed higher biomass yields when cultivated in glucose compared to xylose in both oxygen conditions. The best ethanol yield and productivity was found in growth with xylose in aerobic condition ($Y_{(P/S)} = 0,45$ g/g e $Q_p = 1,51$ g/L.h). The mix of sugars glucose and xylose did not interfere on ethanol yield and productivity, once these parameters were similar to those found during xylose fermentation. The profile of sugar consumption in co-fermentation was different in the two oxygen conditions tested. The expression levels of the genes that encode the xylose metabolism enzymes (*XR*, *XDH* e *XK*) were analyzed by qTR-PCR and the results revealed that these genes are induced by xylose and are not repressed by glucose. The two genes that encodes the enzyme xylose reductase (*XR*) in *S. passalidarum* showed distinct expression profiles in xylose and co-fermentation. When cultivated in xylose (aerobic condition and hypoxia) and aerobic co-fermentation, the gene *XYL* 1.2 was more expressed than the gene *XYL* 1.1. However, the gene *XYL* 1.1 was more expressend than the gene *XYL* 1.2 when cultivation was performed in hypoxic co-fermentation, which suggests that the expression levels of these two genes might be controlled by the redox state of the cell. Thus, the simultaneous or non-simultaneous consumption of glucose and xylose under different oxygen conditions by *S. passalidarum* is not about glucose repression on the synthesis of xylose metabolism enzymes, but rather a physiological adaptation of the cell to establish the redox balance.

1. INTRODUÇÃO

O bioetanol é uma alternativa para diversificação das fontes energéticas. O aumento da produção de etanol no Brasil é possível a partir do uso da biomassa lignocelulósica da cana-de-açúcar. Os açúcares mais abundantes nesta biomassa são a glicose e a xilose, pertencentes às frações celulósica e hemicelulósica, respectivamente. A produção de etanol a partir desta biomassa depende da eficiente conversão destes açúcares em etanol pelos microrganismos fermentadores (Cortez *et al.*, 2008; Soccol *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2016). A levedura selvagem amplamente utilizada na fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*, não fermenta pentoses, assim, se torna importante o estudo de novos microrganismos capazes de fazer esta conversão (Moysés *et al.*, 2016).

A levedura *Spathaspora passalidarum* vem se destacando na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, por converter xilose em etanol com bons rendimentos (Hou, 2012; Long *et al.*, 2012; Yi-Kai Su *et al.*, 2015; Cadete *et al.*, 2016). Essa levedura possui dois genes que codificam a primeira enzima da via, xilose redutase (*XYL 1.1* e *XYL 1.2*). A presença do gene adicional *XYL 1.2* permite com que a fermentação de xilose seja mais eficiente, pois a enzima codificada por este gene apresenta preferência ao cofator NADH, e como a segunda enzima da via (xilitol desidrogenase) utiliza NAD⁺, ocorre um equilíbrio no balanço redox durante o metabolismo de xilose (Cadete *et al.*, 2016).

Alguns entraves limitam a utilização biotecnológica de leveduras que naturalmente fermentam xilose, como por exemplo, a utilização sequencial de açúcares, a baixa tolerância ao etanol e o efeito dos inibidores produzidos durante a hidrólise da lignocelulose (Harner *et al.*, 2015).

Em meios contendo misturas de açúcar glicose e xilose, a maioria dos microrganismos utiliza preferencialmente a glicose, o que aumenta o tempo de fermentação e pode levar a menores rendimentos de etanol durante a fermentação (Long *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 1990). Alguns estudos demonstram possíveis alvos da influência da glicose no metabolismo de xilose, porém a extensão da inibição difere entre as leveduras e o mecanismo não é totalmente compreendido. Além disso, não está claro se em leveduras fermentadoras de xilose, a repressão da

glicose ocorre em nível transcricional ou pós-transcricional (Lee *et al.*, 1990; Rodrussamee *et al.*, 2011; Hou, 2012; Harner *et al.*, 2015). Neste contexto, o objetivo deste trabalho é conhecer como a glicose influencia o metabolismo de xilose em *S. passalidarum*, através de ensaios fermentativos e análise de expressão de genes que codificam as enzimas do metabolismo de xilose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bioetanol

A preocupação em substituir o uso de combustíveis fósseis por fontes renováveis de energia vem crescendo nas últimas décadas. O processo de formação dos combustíveis fósseis é lento comparado à sua exploração e seu uso causa problemas ambientais devido à emissão de gases. Neste contexto, o uso de biocombustíveis reduz os impactos ambientais utilizando matérias-primas renováveis (Soccol *et al.*, 2010).

No Brasil, o Governo Federal implantou um programa de substituição da gasolina pelo etanol na década de 70, em resposta à primeira crise do petróleo (Moreira e Goldemberg, 1999). Neste período, a cana-de-açúcar foi escolhida como matéria-prima para a produção de etanol, devido aos excedentes e os baixos preços do açúcar (Soccol *et al.*, 2010). Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, com produção anual cerca de 25 bilhões de litros (Santos *et al.*, 2016).

A produção de etanol a partir do caldo de cana-de-açúcar utiliza apenas um terço da biomassa para a formação do produto final. O aumento na produção de etanol é possível se os açúcares a serem fermentados presentes nos resíduos da biomassa, caracterizados pelas folhas, palha e bagaço, forem convertidos a etanol (Cortez *et al.*, 2008). Além disso, os combustíveis produzidos a partir de culturas alimentares recebem críticas por competirem com o uso da terra para a produção de alimentos. Assim, é vantajoso o uso de resíduos, como o bagaço da cana-de-açúcar, para obtenção do biocombustível, visto que não demanda novas áreas de cultivo (Soccol *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2016).

No Brasil, o etanol produzido a partir da biomassa lignocelulósica, denominado etanol de segunda geração, está se tornando uma realidade com o surgimento das primeiras unidades industriais. Novas tecnologias vem sendo desenvolvidas em todas as etapas do processo para o desenvolvimento dessas unidades (Santos *et al.*, 2016).

A biomassa lignocelulósica compreende 30-50% de celulose, 20-40% de hemicelulose (Saha, 2003) e 10-20% de lignina e, dependendo da matéria-prima, também possui pectina (Van Maris *et al.*, 2006). A celulose é um polímero composto

pelo monômero D-glicose unido por ligações glicosídicas β (1-4). Possui uma estrutura conformacional associada a lignina, hemicelulose, amido, proteínas e minerais, que a torna altamente resistente à hidrólise, formando uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas hidrolíticas (Van Maris *et al.*, 2006). A hemicelulose é formada por um complexo heteropolissacarídeo composto por hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose, L-ramnose, L-fucose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urônicos (ácido D-glucurônico e ácido D-galacturônico). Sua cadeia principal é composta principalmente por xilanas ou heteroxilanas, formada por unidades de D-xilose unidas por ligações glicosídicas β (1-4) e diferentes carboidratos nas cadeias laterais (Whistler, 1953; Kwan, 1995). A lignina é um polímero formado por resíduos fenólicos e não contribui como fonte de carbono fermentável, sendo uma fonte potencial da inibição do processo fermentativo por microrganismos (Van Maris *et al.*, 2006).

Os açúcares contidos nas frações celulósica e hemicelulósica são os substratos para a produção de etanol por via fermentativa. A recuperação destes açúcares é limitada pela associação entre as três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) do material lignocelulósico (Sun e Cheng, 2002). Várias tecnologias têm sido desenvolvidas para o pré- tratamento da biomassa, com o objetivo de modificar a estrutura da biomassa lignocelulósica, para que se torne acessível às enzimas que convertem os polissacarídeos em monossacarídeos fermentáveis. Os tipos de pré-tratamento consistem em métodos químicos, físicos ou biológicos, ou ainda, a combinação destes no intuito de reduzir a recalcitrância da parede celular das plantas. Com o pré-tratamento a acessibilidade do complexo enzimático é aumentada e, conseqüentemente, a liberação de açúcares aumenta (Santos *et al.*, 2012). Porém, é durante o pré-tratamento que podem ser gerados inibidores do crescimento de microrganismos fermentadores, como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos (Kim *et al.*, 2013). Após o pré-tratamento da biomassa, as próximas etapas são a hidrólise enzimática, fermentação e destilação.

2.2 Microrganismos fermentadores

Para a produção de etanol de primeira geração, obtido a partir da fermentação do caldo de cana-de-açúcar, o microrganismo predominantemente utilizado é a

levedura *Saccharomyces cerevisiae* devido à sua alta capacidade de fermentar sacarose a etanol e à maior tolerância ao etanol comparada a outras leveduras (Sanchez e Cardona, 2008). Porém, linhagens selvagens de *S. cerevisiae* não são utilizadas para a produção de etanol de segunda geração, uma vez que não são capazes de fermentar pentoses que são liberadas a partir a hidrólise da hemicelulose de materiais lignocelulósicos (Van Maris *et al.*, 2006). Apesar de *S. cerevisiae* possuir genes para a utilização de xilose, estes são expressos em baixos níveis não suportando o crescimento em xilose, e além disso, a levedura não possui transportadores específicos para este açúcar (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2007).

A pentose D-xilose é um dos açúcares mais abundante em materiais lignocelulósicos, por isso, torna-se importante o estudo de novas leveduras capazes de metabolizar eficientemente xilose a etanol, ou ainda, uso de seus genes para melhorar outras leveduras já utilizadas em processos industriais.

A levedura *Sheffersomyces stipitis* (*Pichia stipitis*) (Pignatelli, 1967) é uma das primeiras leveduras descritas que realizam naturalmente a fermentação de xilose a etanol. Estudos posteriores demonstraram outras leveduras capazes de converter xilose a etanol de maneira eficiente, como espécies do gênero *Spathaspora* (Agbogbo *et al.*, 2006; Da Cunha-Pereira *et al.*, 2011; Cadete *et al.*, 2009). Recentemente a levedura *Spathaspora passalidarum* vem sendo descrita como a melhor levedura que fermenta xilose (Nguyen *et al.*, 2006; Cadete *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2017; Hou 2012).

Outros microrganismos, como as bactérias anaeróbias e fungos filamentosos, também são capazes de produzir etanol a partir da fermentação da xilose, porém, estes microrganismos possuem baixa tolerância ao etanol (Wiegel *et al.*, 1983). Além disso, os fungos filamentosos convertem açúcares em etanol lentamente (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). Linhagens de *S. cerevisiae* engenheiradas com genes que codificam as enzimas para o metabolismo de xilose não apresentam um bom rendimento de etanol (Van Maris *et al.*, 2006).

A levedura *Spathaspora passalidarum* linhagem NRRLY 27907 foi isolada a partir do intestino de besouros que se alimentam de madeira (Nguyen *et al.*, 2006). Estudos demonstram que essa linhagem possui bons rendimentos de conversão a etanol em meio sintéticos (Hou, 2012; Long *et al.*, 2012; Yi-Kai Su *et al.*, 2015; Cadete *et al.*, 2016). Cadete *et al.* (2016) demonstrou que a levedura *S. passalidarum* NRRLY 27907 apresenta rendimentos de etanol próximo do máximo teórico (0,48

g/g) no meio de cultivo sintético em condições limitantes de oxigênio.

S. passalidarum possui uma diversidade gênica, pois é a única levedura fermentadora de xilose descrita até o momento que apresenta dois genes que codificam a enzima xilose redutase (*XYL 1.1* e *XYL 1.2*). A enzima codificada pelo gene adicional *XYL 1.2* apresenta preferência ao cofator NADH, e como a segunda enzima da via (xilitol desidrogenase) utiliza NAD⁺, ocorre um equilíbrio no balanço redox durante o metabolismo de xilose, fazendo com que a fermentação seja mais eficiente (Cadete *et al.*, 2016).

Outros estudos demonstram que *S. passalidarum* NRRLY 27907 também apresenta bons rendimentos de conversão a etanol em diversos hidrolisados lignocelulósicos (Long *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2017; Nakanishi *et al.*, 2017). Além disso, estudos para melhoramento desta linhagem quanto à resistência a inibidores formados durante a etapa de pré-tratamento da biomassa estão sendo continuamente realizados (Hou e Yao, 2012; Morales *et al.*, 2017).

2.2 Influência da glicose no metabolismo de xilose

O transporte de xilose para o citoplasma celular ocorre através de sistema de difusão facilitada de baixa afinidade, o qual também transporta glicose, e de um sistema de simporte de prótons de alta afinidade (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Leandro *et al.*, 2009). No interior da célula, a via oxidorrredutiva converte xilose em xilulose por uma redução e uma oxidação. A primeira reação é a redução de xilose a xilitol catalisada pela enzima xilose redutase (XR) (Figura 1).

Na levedura *S. passalidarum* a enzima xilose redutase (XR) possui dupla especificidade de cofator, podendo utilizar NADPH ou NADH. Atividades enzimáticas a partir de extratos brutos mostram que as maiores atividades de XR é utilizando NADH como cofator (Hou, 2012; Cadete *et al.*, 2016). Para avaliar a influência das enzimas XRs codificada pelos genes *XYL 1.1* e *XYL 1.2*, as duas cópias do gene foram expressas individualmente em *S. cerevisiae*. As linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes foram caracterizadas quanto à atividade de XR, com ambos cofatores. Linhagens de *S. cerevisiae* expressando *XYL 1.1* de *S. passalidarum* revelou atividade de XR estritamente dependente de NADPH. Enquanto que linhagens expressando o gene *XYL 1.2* apresentaram atividade de XR utilizando ambos cofatores, porém a maior atividade

de XR foi quando utilizou NADH (Cadete *et al.*, 2016).

Posteriormente, a oxidação do xilitol à xilulose é mediada pela enzima xilitol desidrogenase (XDH). Por fim, ocorre a fosforilação da xilulose pela enzima xiluloquinase (XK) para formar xilulose-5-fosfato. A xilulose-5-fosfato pode ser convertida, através da via das pentoses-fosfato, em gliceraldeído-3-fosfato ou frutose-6-fosfato, e conectam-se com a via glicolítica (Figura 1) (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Hou, 2012). A via de conversão de xilose à xilulose também pode ser realizada diretamente pela enzima xilose isomerase (XI). Esta via corresponde à via isomerase de assimilação de xilose, porém ainda não foi descrita em leveduras, sendo encontrada em bactérias e alguns fungos anaeróbios (Moysés *et al.*, 2016; Madhava *et al.*, 2009; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Hou, 2012).

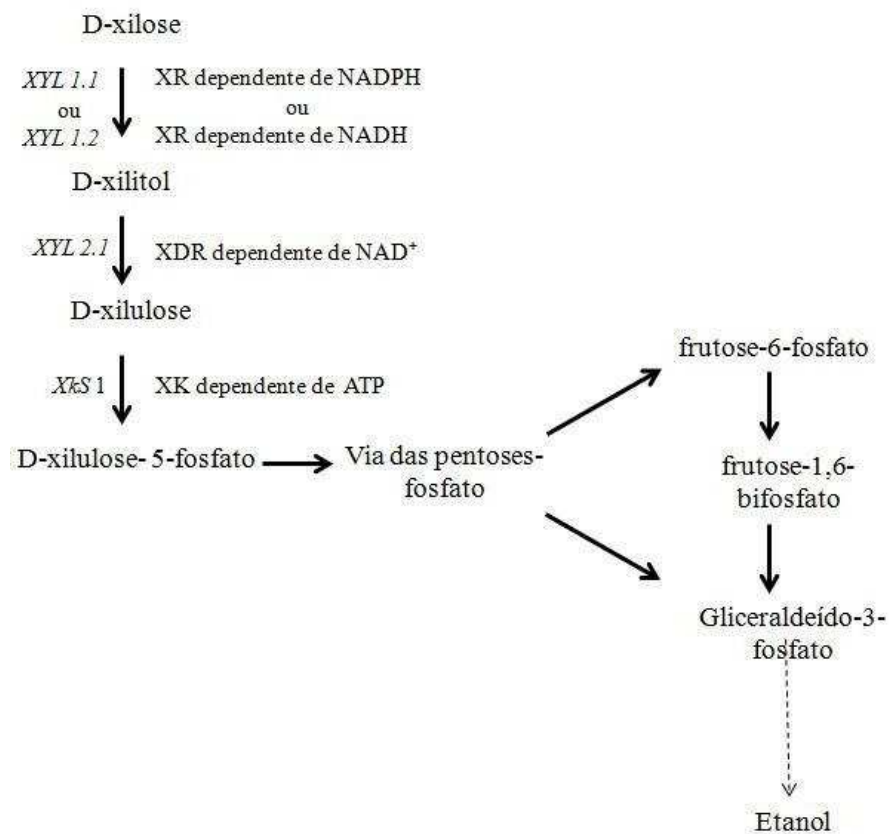


Figura 1: Esquema simplificado do metabolismo de xilose à etanol na levedura *S. passalidarum*. Fonte: modificado de Moysés *et al.*, 2016.

Durante a via oxidorrredutiva, um desequilíbrio redox pode ocorrer, devido ao fato das duas primeiras enzimas do metabolismo de xilose possuir diferentes preferências de cofatores. A maioria das leveduras fermentadoras de xilose possui a

enzima XR que utiliza NADPH e NADH como cofatores, no entanto, geralmente exibem preferência por NADPH. A enzima XDH utiliza NAD^+ como cofator. Assim, a eficiente conversão da xilose a etanol depende da concentração de oxigênio no meio. O acúmulo de xilitol ocorrerá em condições anaeróbicas, pois o cofator NADH não pode ser reoxidado eficientemente por meio da cadeia transportadora de elétrons. Para evitar o acúmulo de xilitol, a presença de oxigênio é importante durante a fermentação da xilose, pois o NAD^+ é regenerado na cadeia transportadora de elétrons, impedindo o bloqueio da conversão de xilose a etanol (Hahn- Hägerdal *et al.*, 2007; Hou, 2012).

A glicose e a xilose são os açúcares mais abundantes na biomassa lignocelulósica, os demais açúcares são encontrados em concentrações mais baixas. Neste contexto, torna-se interessante que os microrganismos para a fermentação desta biomassa sejam capazes de cometabolizar glicose e xilose simultaneamente, para melhorar a economia do processo. Entretanto, em um meio com mistura de açúcares, a maioria dos microrganismos utiliza preferencialmente a glicose e, somente após seu esgotamento, metaboliza xilose. Isso implica em menores rendimentos de etanol e aumento do tempo de fermentação. Além disso, o uso sequencial de açúcar pode resultar em consumo incompleto de substrato, pois os produtos podem atingir níveis inibitórios antes do metabolismo completo dos açúcares (Long *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 1990). Dessa forma, a eficiente fermentação de mistura de açúcares em hidrolisados lignocelulósicos é um dos principais problemas da produção de etanol de segunda geração.

Em *S. cerevisiae* a repressão de glicose no uso de fontes alternativas de carbono ocorre principalmente em nível de transcrição, através de uma cascata de sinais. Os níveis de concentração de glicose são sinalizados pela célula através das proteínas receptoras Snf3 e Rgt2. Dependendo das concentrações de glicose no meio extracelular, a proteína quinase Snf1, juntamente com outras proteínas regulatórias, regula o fator de transcrição Mig1. Esse fator de transcrição se liga ao promotor de fontes alternativas de carbono quando desfosforilado, impedindo sua transcrição. Quando Snf1 fosforila Mig1, há a liberação deste fator de transcrição do promotor de genes de fontes alternativas de carbono, permitindo a transcrição dos mesmos. A enzima hexoquinase (Hxk2), a qual realiza a fosforilação de glicose a glicose- 6-fosfato pode está envolvida na inativação do complexo Snf1 (Kayikci e Nielsen, 2015; Westergaard *et al.*, 2007).

Abordagens de engenharia metabólica vêm sendo desenvolvidas para obter microrganismos capazes de cofermentar a mistura de açúcares simultaneamente. Em *S. cerevisiae*, por exemplo, existem estudos relacionados à modificação de genes ou vias envolvidas com a sinalização de glicose para inativar a repressão, e também, expressão heteróloga de novos transportadores de açúcar e genes metabólicos para evitar mecanismos regulatórios. Estas abordagens permitem superar a repressão de glicose em *S. cerevisiae*, porém nenhuma delas permitiu eficiente cofermentação de açúcares glicose e outros açúcares com bons rendimentos, comparados à fermentação de glicose. Assim, é importante uma maior compreensão da repressão por glicose no metabolismo de xilose, em níveis moleculares, para a identificação de alvos para a engenharia de leveduras que sejam eficientes na cofermentação de açúcares (Kim *et al.*, 2012). Apesar da levedura *S. cerevisiae* engenheirada ser um bom modelo de estudos, ela não o é para estudar como o metabolismo de xilose é nativamente regulado (Long *et al.*, 2012).

Considerando que a levedura que naturalmente fermenta xilose *S. passalidarum* tem recebido destaque como promissora para produção de etanol de segunda geração, torna-se importante identificar possíveis alvos da influência da glicose no metabolismo de xilose nesta levedura, possibilitando o melhoramento genético da mesma e/ou uso de seus genes para engenheirar outras leveduras.

A glicose pode afetar a atividade das enzimas do metabolismo de xilose em *S. passalidarum*, no entanto, ainda não está claro se a repressão da glicose ocorre em nível transcricional ou pós-transcricional (Rodrussamee *et al.*, 2011). Os principais alvos descritos para a repressão de glicose no metabolismo de xilose são as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), seja pela atividade ou na expressão destas enzimas, e/ou no transporte de xilose para a célula (Hou, 2012; Harner *et al.*, 2015).

Hou (2012) demonstrou que a levedura *S. passalidarum* ATCC MYA-4345 (NRRLY 27907) apresenta diminuição das atividades das enzimas XR e XDH em meio contendo glicose e xilose em condição de anaerobiose. Neste trabalho, o consumo de açúcares foi diferente em condições de aerobiose e limitação de oxigênio. Segundo o autor, a glicose poderia interferir no transporte de xilose para o interior celular, pela ocupação dos transportadores, bloqueando a passagem intracelular de xilose. Além do transporte, o autor relata que a presença de glicose pode afetar o metabolismo de xilose também na síntese das enzimas XR e XDH.

Long *et al.* (2012) demonstrou que *S. passalidarum* NRRLY 27907 apresenta produtividade de etanol três vezes maior em xilose do que em meio com glicose, e também, é capaz de cofermentar glicose, celobiose e xilose com um rendimento de etanol de 0,42 g/g.

A levedura *S. stipitis* em presença de mistura de açúcares fermenta a xilose incompletamente, pois primeiro utiliza a glicose. Estudos sugerem que isto é devido à repressão por glicose das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase (Webb e Lee, 1990), porém ainda não existem estudos em nível transcricional em condição de misturas de açúcares. A deleção do gene hexoquinase 1 em *S. stipitis*, resultou na utilização de xilose na presença de cerca de 1,72% de glicose, mantendo a capacidade de utilizar glicose e xilose individualmente (Dashtban *et al.*, 2015). Estudo do transcriptoma de *S. stipitis* em cultivo com glicose ou xilose revelou diversos genes diferentemente expressos, e sugeriu que esta levedura possui um mecanismo diferente para repressão por glicose, comparado à *S. cerevisiae* (Yuan *et al.*, 2011).

Um estudo em nível transcricional foi feito com a levedura *Kluyveromyces marxianus* em condição de açúcares mistos. Análises de RT-PCR do gene *XYL 1* para xilose redutase em meio contendo glicose e xilose a 30 °C durante a fase exponencial demonstraram uma redução na sua expressão. Este resultado sugere que *XYL 1* de *K. marxianus* é reprimido por glicose. No entanto, nenhuma sequência de ligação da proteína repressora Mig1 foi encontrada na região *upstream* do gene, sendo possível que existam outras vias reguladoras em vez de Mig1 para a repressão por glicose neste gene (Rodrussamee *et al.*, 2011).

Neste contexto, as leveduras que naturalmente fermentam xilose são importantes para produção eficiente de bioetanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos e/ou fontes de genes para engenheirar linhagens industriais. Nosso objetivo é compreender melhor um dos entraves que limitam a utilização biotecnológica de leveduras na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, a utilização sequencial dos açúcares glicose e xilose. Embora existam alguns estudos sobre o efeito da glicose no metabolismo de xilose em *S. passalidarum* NRRLY 27907 (Hou 2012; Long *et al.*, 2012), ainda não existem estudos a nível transcricional em condições de misturas de açúcares.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo analisar como a glicose influencia o metabolismo de xilose na levedura *Spathaspora passalidarum*, em aerobiose e hipoxia.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a repressão por glicose no metabolismo de xilose em *Spathaspora passalidarum* NRRLY 27907;

Determinar os parâmetros cinéticos de crescimento e fermentação de *S. passalidarum* NRRLY 27907 em meio contendo xilose e/ou glicose, em aerobiose e hipoxia;

Avaliar a expressão de genes que codificam as enzimas da via metabólica de xilose (XR, XDH e XK) de *S. passalidarum* NRRLY 27907 em meio contendo xilose e/ou glicose, em aerobiose e hipoxia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e meio de cultivo

As linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho foram *Spathaspora passalidarum* NRRLY 27907, *Spathaspora arborariae* HM 19.1A e *Scheffersomyces stipitis* NRRL 7124, disponibilizadas pelo professor Carlos Augusto Rosa do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e *Kluyveromyces marxianus* CCT7735, disponibilizada pelo Laboratório de Fisiologia de Microrganismos da UFV. Estas linhagens foram mantidas em meio completo YPD (2% (m/v) extrato de levedura, 1% (m/v) peptona e 2% (m/v) glicose) com glicerol 30% (v/v) a -80 °C ou quando utilizadas com frequência, em placas de YPD sólido (2 % (m/v) Ágar), a 4 °C.

4.2 Análise de repressão por glicose usando o análogo 2-desoxiglicose

As leveduras *S. passalidarum*, *S. stipitis*, *S. arborariae* e *K. marxianus* foram previamente crescidas em meio YPD, sob agitação de 150 rpm a 28 °C. A partir do pré- inóculo, as células foram centrifugadas a 3000 g por 5 min. O precipitado formado foi lavado com solução salina 0,85% (m/v) e a densidade óptica em espectrofotômetro a 600 nm ($DO_{(600nm)}$) foi ajustada para 1,0. Diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) foram feitas e 10 μ L de cada diluição plaqueado em placas de petri contendo meio sólido YP com 2% (m/v) de xilose e YP com 2% (m/v) de xilose e 0,1% (m/v) de 2-desoxiglicose. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas. A linhagem *K. marxianus* CCT7735 foi utilizada como controle.

4.3 Parâmetros cinéticos de crescimento

Para determinar a constante de saturação (K_s), a levedura *S. passalidarum* foi crescida em meio mínimo Yeast Nitrogen Base (YNB) 0,67% (m/v), acrescido de glicose e/ou xilose nas concentrações 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 16,0; 32,0; e 64,0 mM por 12 h, em aerobiose e hipoxia (descrito no item 4.4). Quando os açúcares foram utilizados em combinação, metade da concentração final correspondia a xilose e a outra metade a glicose. O cultivo iniciava-se com $DO_{(600nm)}$

correspondente a 0,2. Em intervalos de uma hora, alíquotas de 1 mL foram retiradas para determinar a $DO_{(600nm)}$ e calcular as velocidades específicas de crescimento nestas concentrações. Esse procedimento foi realizado em duplicata. A velocidade específica de crescimento (μ) foi calculada a partir da regressão linear obtida no gráfico $\ln DO_{600\text{ nm}}$ versus tempo durante a fase exponencial.

As constantes de saturação (K_s) e a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) foram determinadas utilizando o programa Sigma Plot 12.0, segundo o modelo cinético de Monod (1949) (Equação 4). Sendo μ a velocidade específica de crescimento; $\mu_{m\acute{a}x}$, a velocidade específica máxima de crescimento; S , a concentração de glicose e/ou xilose e K_s à constante de saturação. A significância estatística foi determinada pelo teste t de Student, considerando nível de significância de 0,05.

$$\mu = \frac{(\mu_{m\acute{a}x} \cdot S)}{(K_s + S)} \quad (4)$$

4.4 Ensaios de fermentação

A linhagem *S. passalidarum* NRRLY 27907 foi previamente cultivada em meio de cultivo contendo extrato levedura (5 g/L); peptona (5 g/L); NH_4Cl (2 g/L); KH_2PO_4 (1 g/L); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,3 g/L) e 2% (m/v) de glicose ou xilose, sob agitação de 150 rpm a 32 °C. O pré-inóculo para os ensaios fermentativos com açúcares individuais foram realizados com 2% (m/v) de glicose ou xilose. Para os ensaios de cofermentação o pré-inóculo foi realizado com 2% (m/v) de glicose.

A partir do pré-inóculo as células foram centrifugadas a 3000 g por 5 min. O precipitado formado foi lavado com solução salina 0,85% (m/v) e ressuspenso diretamente no mesmo meio de cultivo para iniciar os ensaios de fermentação, com $D.O_{(600nm)}$ correspondente a 2 (Souza *et. al.*, 2012).

Os ensaios de fermentação foram realizados em Erlenmeyers com volume de meio de cultivo ocupando 1:5 do volume final. As fontes de carbono utilizadas foram 8% (m/v) xilose ou 8% (m/v) de glicose, para as fermentações com açúcares individuais, e 4% (m/v) de glicose e 4% (m/v) de xilose, para as cofermentações. Os cultivos foram realizados em aerobiose e condição limitante de oxigênio (hipoxia).

Em aerobiose, os Erlenmeyers foram vedados com tampão de algodão e incubados a temperatura de 32 °C sob agitação de 200 rpm. Em hipoxia, os

Erlenmeyers foram vedados com tampão de borracha, para evitar a permeabilidade do oxigênio. Nitrogênio gasoso foi borbulhado por 15 min antes da inoculação, para expulsar o oxigênio dissolvido no meio. Após a inoculação, foram incubados a temperatura de 32 °C sob agitação de 60 rpm. As concentrações de açúcar do meio de cultivo e a temperatura de incubação utilizada neste trabalho foram determinadas de acordo com (Campos, 2015).

Cada ensaio foi realizado em triplicata por 48 h, e nos intervalos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 e 48 h, alíquotas foram retiradas para avaliar a densidade óptica em espectrofotômetro à 600 nm e quantificação de substratos e produtos por “high-performance liquid chromatography” (HPLC). Adicionalmente, no intervalo de 6 h foram retiradas alíquotas para análise de expressão gênica por PCR em tempo real.

4.5 Métodos analíticos

As amostras retiradas durante os ensaios de fermentação para quantificação do consumo de açúcares (xilose e glicose) e a produção de metabólitos (etanol, xilitol, glicerol e ácido acético) foram centrifugadas a 9.000 g por 5 min, e o sobrenadante foi filtrado em membrana de poro de 0,22 µm. As concentrações destes metabólitos foram determinadas por HPLC, utilizando uma coluna de troca iônica HPX-87H (BIO-RAD), mantida a 45 °C, acoplada ao detector de índice de refração SPD-20A. O eluente para separação foi solução de ácido sulfúrico 5 mM, aplicado a uma taxa de eluição 0.7 mL/min⁻¹. Na montagem dos métodos foram preparados padrões de 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75 e 100 mM para glicose, xilose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol.

4.6 Relação entre absorvância a 600 nm (A600) e massa celular seca (g/L)

Para determinar a relação massa seca *versus* densidade óptica, a levedura *S. passalidarum* foi cultivada em 50 mL de meio de fermentação com 8% (m/v) xilose, 8% (m/v) de glicose ou 4% (m/v) de glicose e 4% (m/v) de xilose, sob agitação de 200 rpm a 32 °C por 16 h. Posteriormente, a D.O_(600nm) foi avaliada e a alíquota foi centrifugada a 9.000 g por 10 min. O precipitado obtido foi ressuspenso em 10 mL de solução salina NaCl 0,85% (m/v). Foram retiradas três alíquotas de 1 mL para a determinação de massa celular seca, a 105 °C, durante 24 h. As alíquotas foram pesados em balança analítica até atingirem peso constante. Adicionalmente,

amostras de 1 mL da suspensão de células foi utilizada nas seguintes diluições: 2×10^{-1} , 4×10^{-1} , 8×10^{-1} , 16×10^{-1} e 32×10^{-1} para estimar a DO. Este experimento foi realizado em triplicata e os dados obtidos foram a média entre as triplicatas. A regressão linear (equações 1, 2 e 3) entre a D.O_(600nm) e massa seca (g.L⁻¹) permitiu a determinação de massa seca celular de *S. passalidarum* em 8% (m/v) de xilose, 8% (m/v) de glicose e 8% (m/v) de glicose e xilose (4% (m/v) de glicose e 4% (m/v) de xilose), respectivamente. Sendo Y= D.O_(600nm) e X=massa seca (g/L).

$$y=1,7945x + 0,0559$$

$$R^2= 0,972 \quad (1)$$

$$y=1,5305x + 0,0883$$

$$R^2= 0,962 \quad (2)$$

$$y= 1,7809x + 0,0386$$

$$R^2= 0,9805 \quad (3)$$

4.7 Parâmetros fermentativos e de crescimento

O rendimento de etanol (Y_{P/S}) pela levedura foi calculado dividindo a diferença da massa final e inicial de etanol pela massa inicial e final de substrato, expressos em gramas (Equação 5). Da mesma forma, foi calculado o rendimento de etanol por glicose e xilose consumida (Y_{P/S}) nos ensaios de cofermentação.

$$Y_{P/S} = \frac{\text{massa final} - \text{massa inicial etanol}}{\text{massa inicial} - \text{massa final substrato}} \quad (5)$$

O rendimento da biomassa celular (Y_{X/S}) foi calculado dividindo a diferença da massa seca final e inicial pela massa inicial e final de substrato, expressos em gramas (Equação 6).

$$Y_{X/S} = \frac{\text{massa seca final} - \text{massa seca inicial}}{\text{massa inicial} - \text{massa final substrato}} \quad (6)$$

A produtividade de etanol (Q_p) foi calculada dividindo-se a diferença da concentração final e inicial de etanol pelo tempo em que houve a maior produção de etanol, expressos em g/L.h (Equação 7).

$$Q_p = \frac{\text{Concentração final} - \text{concentração inicial etanol}}{\text{tempo}} \quad (7)$$

A eficiência de fermentação (Y%) foi calculada pela diferença entre o valor de $Y_{P/S}$ encontrado nos experimentos e o valor de $Y_{P/S}$ teórico (0,51 g/g), multiplicado por 100 (Equação 8).

$$Y\% = \frac{Y_{\left(\frac{P}{S}\right)}(real)}{Y_{\left(\frac{P}{S}\right)}(teórico)} \times 100 \quad (8)$$

A taxa específica de consumo de substrato (q_s) foi calculada durante a fase exponencial, expressos em $g/g_{(MS)}.h^{-1}$. Foi feita a regressão linear entre a massa seca *versus* concentração de substrato, e o coeficiente angular (rendimento de consumo) foi multiplicado pela velocidade de crescimento (μ).

O crescimento da levedura *S. passalidarum* durante os ensaios de fermentação foi estimado pela absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. Posteriormente, o valor da D.O_(600nm) foi convertido em massa seca celular de acordo com a relação massa seca *versus* densidade óptica, descrita anteriormente no item 4.5. A velocidade específica de crescimento (μ) foi calculada durante a fase exponencial, a partir da regressão linear obtida no gráfico $\ln DO_{600\text{ nm}}$ *versus* tempo.

4.7 Análise de expressão gênica por pcr em tempo real (qRT-PCR)

Durante os ensaios de fermentação a expressão de genes foi avaliada por qRT-PCR. A sequência do genoma de *S. passalidarum* foi obtida do banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As buscas dos genes que codificam as enzimas xilose redutase (*XYL 1.1* e *XYL 1.2*), xilitol desidrogenase (*XYL 2.1* e *XYL 2.2*) e xiluloquinase (*XKS 1*) foram realizados por palavra chave. Os oligonucleotídeos específicos para os genes (*XYL 2.1*, *XYL 2.2* e *XKS 1*) foram construídos com o software Primer3. Os oligonucleotídeos dos demais genes foram validados por Cadete *et. al.*, 2016 (Tabela 1).

O RNA total das culturas foi extraído pelo método *hot fenol* (Collart *et.al.*, 2001). A qualidade da extração do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (*SpectraMax M5 microplate/cuvette reader* (Molecular Devices)) no comprimento de onda de 260 nm e 1 μ g de RNA total foi

tratado com DNase I (Sigma), seguindo as recomendações do fabricante.

Após o tratamento com DNase, foi realizado uma PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com os oligonucleotídeos específicos para o gene constitutivo que codifica actina (*ACT 1*) (Tabela 1), a fim de verificar contaminação por DNA genômico. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante, a partir de amostras contendo 1 µg de RNA total. Para confirmar a síntese de cDNA foi realizada uma reação de PCR com o gene constitutivo *ACT 1*.

A reação submetida ao qRT-PCR continha os oligonucleotídeos específicos (Tabela 1), os cDNAs dos tratamentos realizados e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). O aparelho utilizado foi *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram 95 °C por 10 min, e 40 ciclos de 94 °C por 15 s e 60 °C por 1 min, seguido por desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação (*melting*), que permite detectar amplificações inespecíficas.

Para calcular a eficiência de amplificação da reação (Tabela 1) foram feitas curvas de eficiência de amplificação para cada par de oligonucleotídeos. Para obter as curvas foram realizadas reações utilizando-se cDNA, a partir de células cultivadas em xilose, em 6 diluições decimais seriadas, partindo de 250 ng. O coeficiente angular da regressão linear obtida (*slope*) foi utilizado para calcular a eficiência de amplificação da reação, conforme equação: $E = (10^{-1/slope} - 1)$.

A quantificação da expressão gênica foi realizada no *software Relative Expression Software Tool – REST 2009* (<http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>). Amostras de células cultivadas em glicose foram usadas como controle. O gene da actina foi utilizado como controle endógeno. As amostras foram analisadas em triplicata.

Tabela 1: Oligonucleotídeos específicos para qPCR.

Gene	Proteína	Sequência 5' – 3'	Eficiência	Referência
<i>XYL</i>		CTCAGGTCACTTGATGCCTTTAG	0,7616	Cadete <i>et al.</i> ,2016
1.1	Xilose redutase	TCTTTAAACCGTCACCGACTTCC		
<i>XYL</i>		GCCACCATTTCCTCAGCAAATTTAC	0,7888	Cadete <i>et al.</i> ,2016
1.2		CTCTTAACAAGACCGTCTTCAATA GC		
<i>XYL</i>		TGCTGCCAGAGTCATTGTCATTG	0,7850	Este trabalho
2.1	Xilitol	AACATTTGGTTCAACACCGTCAA		
<i>XYL</i>	desidrogenase	TGAAGTCGGTCCTGGAGTGAA	0,7348	Este trabalho
2.2		CCTCCCCTCTTGTACGCATC		
<i>XKS 1</i>	Xiluloquinase	GGTCCAGTCCACGGTAACTT CGCCCTTTTGTTCACACTCA	0,8371	Este trabalho
<i>ACT 1</i>	Actina	AGATACCCAATTGAACACGGTATC GATTTAGGATTCATTGGAGCTTCA	0,7495	Cadete <i>et al.</i> ,2016

5. RESULTADOS

5.1 O metabolismo de xilose da levedura *S. passalidarum* não sofre repressão clássica por glicose

O análogo de glicose 2-desoxiglicose (2DOG) é muito utilizado em estudos de repressão catabólica (Lane *et al.*, 2011; Rodrussame *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015; Suprayogi, *et al.*, 2015; Sreenath e Jeffries, 1999). Após entrar na célula, 2DOG é fosforilado pela enzima hexoquinase, mas é incapaz de ser metabolizado pela fosfoglicose isomerase, impedindo o prosseguimento da via glicolítica. Dessa forma, células cultivadas em meio contendo 2DOG como fonte de carbono não são capazes de multiplicar devido à depleção de ATP e intermediários metabólicos. Assim, células que possuem repressão por glicose não se multiplicam em meio contendo 2DOG e outra fonte de carbono, pois apesar de 2DOG não ser metabolizada pela célula, essa molécula ativa as vias de sinalização envolvidas na repressão catabólica em leveduras (Suprayogi, *et al.*, 2015).

Quando 2DOG foi adicionado ao meio contendo xilose como única fonte de carbono,

K. marxianus não cresceu, indicando que o metabolismo de xilose nesta levedura é reprimido por glicose. Nas leveduras *S. passalidarum* e *S. arborariae*, o metabolismo de xilose não é reprimido por glicose, visto que na presença de 2DOG ambas as leveduras crescem. Porém *S. passalidarum* obteve um melhor crescimento comparado a *S. arborariae*. A levedura *S. stipitis* possui repressão parcial, pois cresceu somente nas menores diluições no meio contendo 2DOG (Figura 2).

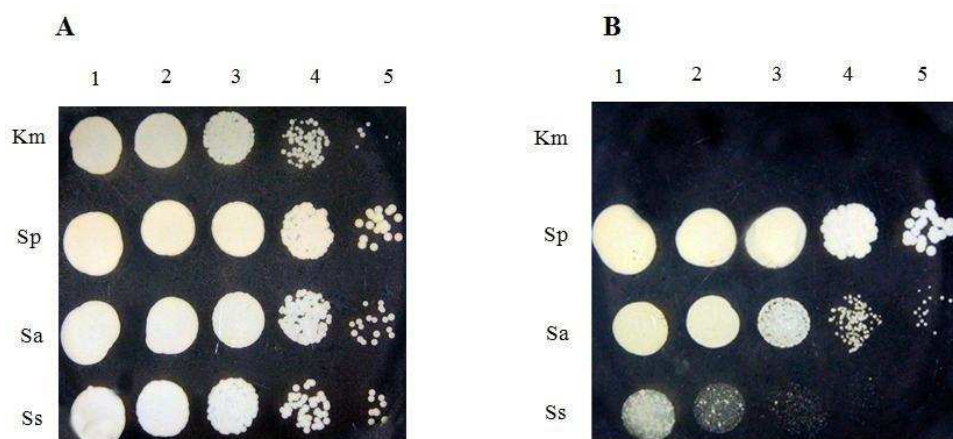


Figura 2: Análise de repressão por glicose usando o análogo 2-desoxiglicose. (A) YP xilose 2% (m/v) e (B) YP xilose 2% (m/v) e 2-desoxiglicose 0,1% (m/v). $DO_{(600nm)}=1$ (1), diluição 10^{-1} (2), diluição 10^{-2} (3), diluição 10^{-3} (4) e diluição 10^{-4} (5). *Kluyeromyces marxianus* (Km), *Spathaspora passalidarum* (Sp), *Spathaspora arborariae* (Sa) e *Scheffersomyces stipitis* (Ss).

5.2 Cinética de crescimento de *S. passalidarum* em função da concentração de xilose e/ou glicose

Para avaliar se a levedura possui diferente afinidade pelos substratos xilose e glicose, foi realizada a cinética pelo modelo de Monod. Os parâmetros cinéticos de crescimento foram realizados em meio YNB com diferentes concentrações de glicose e/ou xilose (Figura 5).

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi maior nos cultivos em aerobiose comparado a hipoxia. A constante de saturação (K_s) em xilose ou glicose não foi significativamente diferente nas duas condições de oxigênio, mostrando que a levedura possui a mesma afinidade por ambos os substratos (Tabela 3).

Para determinar o K_s em cofermentação, a concentração do substrato refere-

se à metade de glicose e metade de xilose, em mM. Neste caso, o K_s em aerobiose foi significativamente maior ($K_s=2,10$ mM) do que em hipoxia ($K_s=1,00$ mM). Essa diferença de afinidades pelos substratos em mistura sugere que o oxigênio interfere no transporte e/ou metabolismo dos açúcares.

Tabela 3: Velocidades específicas máxima de crescimento (μ_{\max} (h^{-1})) e constante de saturação (K_s (mM)) de *S. passalidarum*.

	Aerobiose		Hipoxia	
	μ_{\max} (h^{-1})	K_s (mM)	μ_{\max} (h^{-1})	K_s (mM)
Xilose	0,46	1,53	0,28	1,45
Glicose	0,47	1,59	0,18	1,49
Glicose e xilose	0,54	2,10	0,20	1,00

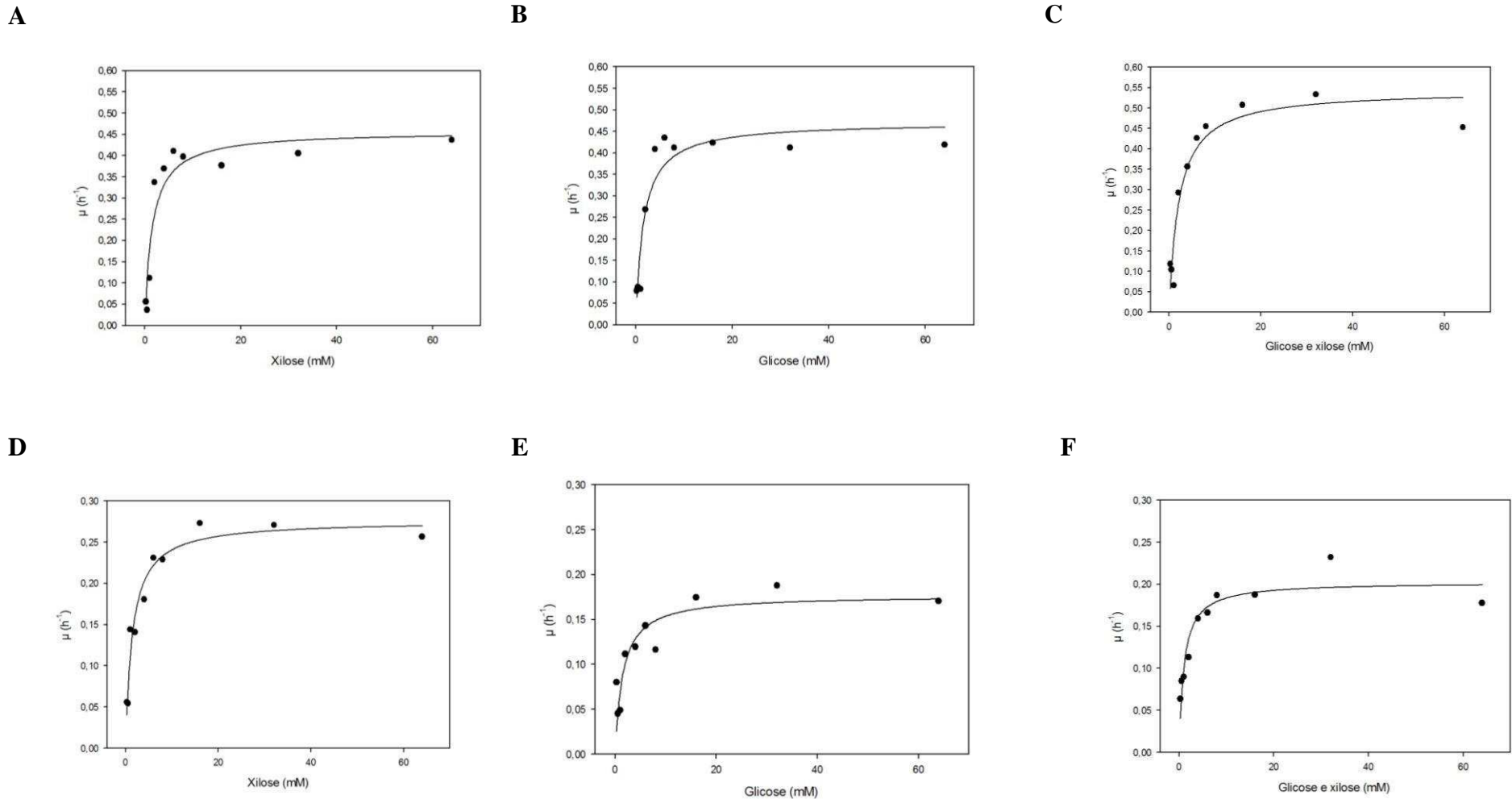


Figura 5: Velocidades específicas de crescimento em função da concentração de xilose (A e D), glicose (B e E) e glicose e xilose (C e F). Aerobiose (A, B e C) e Hipoxia (D, E e F).

5.3 A glicose afeta o metabolismo de xilose de *S. passalidarum*

Com o objetivo de analisar como a glicose pode interferir no consumo de xilose e na produção de etanol em *S. passalidarum*, foram feitos experimentos de fermentação com ambos os açúcares, individualmente ou em combinação, em duas condições de oxigênio, aerobiose e hipoxia. A partir das cinéticas das fermentações (Figuras 3 e 4) foi possível calcular os parâmetros fermentativos e de crescimento (Tabela 2).

Em relação ao crescimento celular em aerobiose, *S. passalidarum* obteve a maior velocidade específica de crescimento ($\mu = 0,27 \text{ h}^{-1}$) e rendimento em biomassa ($Y_{(X/S)} = 0,45 \text{ g/g}$) no cultivo em glicose comparado com o cultivo em xilose ($\mu = 0,20 \text{ h}^{-1}$ e $Y_{(X/S)} = 0,20 \text{ g/g}$). Da mesma forma, em hipoxia a velocidade específica de crescimento e o rendimento de biomassa foram maiores em glicose ($\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$ e $Y_{(X/S)} = 0,20 \text{ g/g}$) do que em xilose ($\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$ e $Y_{(X/S)} = 0,08 \text{ g/g}$) (Tabela 2).

Apesar de *S. passalidarum* apresentar menores taxas de crescimento em xilose, o melhor rendimento e produtividade de etanol foram encontrados nesta condição e em aerobiose ($Y_{(P/S)} = 0,45 \text{ g/g}$ e $Q_p = 1,51 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Na fermentação de xilose em hipoxia, *S. passalidarum* apresentou rendimento celular baixo, e mesmo assim obteve uma boa conversão de etanol ($Y_{(P/S)} = 0,35 \text{ g/g}$ e $Y\% = 68,4\%$). No entanto, a produtividade de etanol em hipoxia foi menor comparado ao cultivo em aerobiose, pois se leva mais tempo para atingir altas concentrações de etanol (Tabela 2).

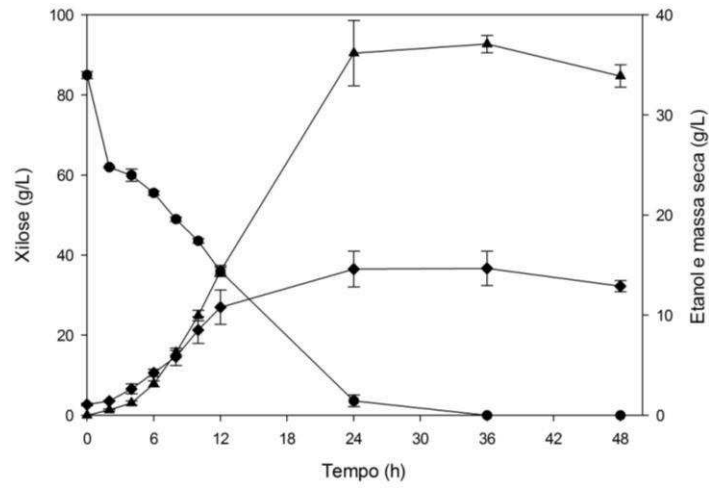
O consumo de glicose não altera em aerobiose ($q_s = 0,34 \text{ g/g.h}^{-1}$) ou hipoxia ($q_s = 0,35 \text{ g/g.h}^{-1}$) na ausência de xilose. Em hipoxia há uma diminuição do rendimento celular ($Y_{(X/S)} = 0,20 \text{ g/g}$), metade da encontrada em aerobiose, e um aumento no rendimento de etanol ($Y_{(P/S)} = 0,40 \text{ g/g}$), porém não houve maior produtividade de etanol ($Q_p = 0,57 \text{ g/L.h}$). Em condição limitante de oxigênio, mesmo que os rendimentos de etanol sejam mais altos, as produtividades são menores, visto que 48 h a glicose não foi totalmente consumida.

Tabela 2: Parâmetros fermentativos de *S. passalidarum* em meio de fermentação 8% (m/v) xilose, 8% (m/v) de glicose ou 4% (m/v) de glicose e 4% (m/v) de xilose, em aerobiose e hipoxia. Rendimento de etanol ($Y_{(P/S)}$), eficiência de fermentação (Y%); rendimento de biomassa ($Y_{(X/S)}$); produtividade de etanol (Qp); taxa específica de consumo (q_s).

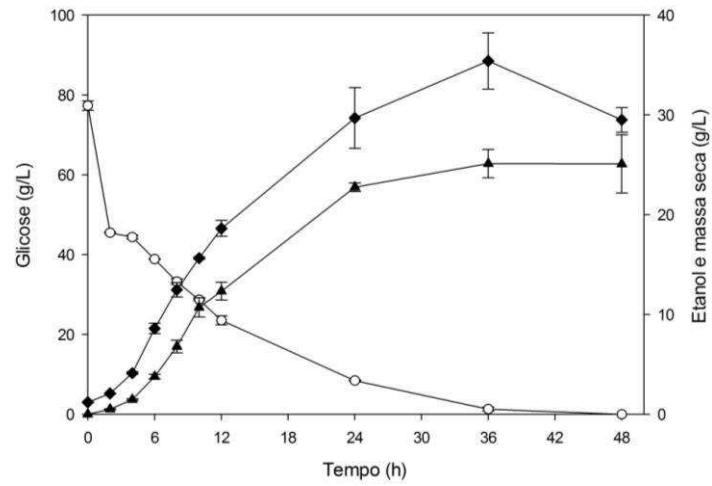
		Velocidade específica de crescimento (h^{-1})	Produção de etanol (g/L)	Produção máxima de etanol (horas)	$Y_{(P/S)}$ (g/g)	Y%	$Y_{(X/S)}$ (g/g)	Qp (g/L.h)	q_s^* (g/g _(MS) .h ⁻¹)
Aerobiose	Xilose	0,20	36,2	24	0,45	87,3	0,20	1,51	0,56
	Glicose	0,27	25,1	36	0,33	64,8	0,45	0,70	0,34
	Glicose e xilose	0,26	36,1	24	0,39	74,9	0,29	1,50	0,38(glic)
Hipoxia	Xilose	0,06	26,3	48	0,35	68,4	0,08	0,55	0,44
	Glicose	0,13	27,2	48	0,40	79	0,20	0,57	0,35
	Glicose e xilose	0,12	21,6	48	0,39	77	0,27	0,45	0,16(glic) 0,04 (xil)

*Calculado durante a fase exponencial

A



B



C

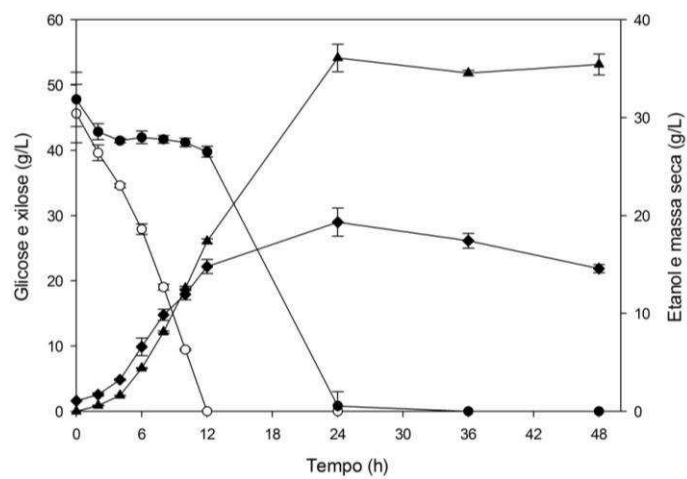
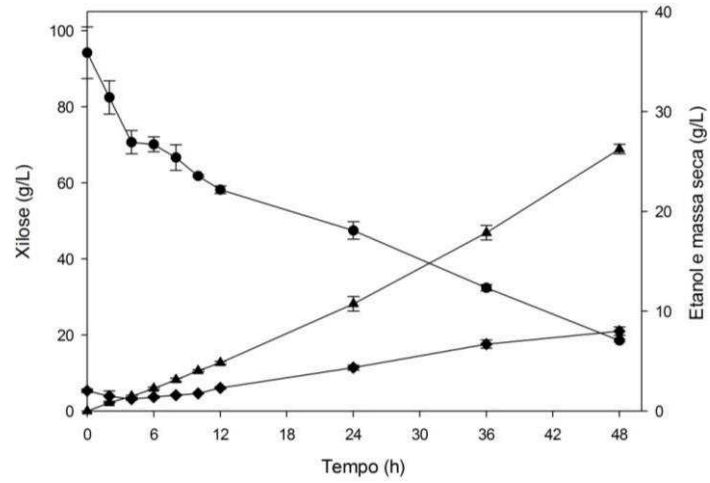
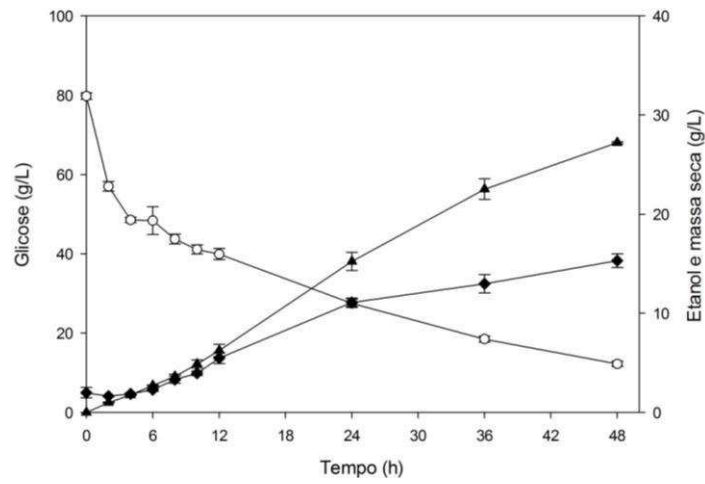


Figura 3: Cinética da fermentação de *S. passalidarum* em aerobiose. (A) 8% xilose, (B) 8% glicose e (C) 8% glicose e xilose. . Xilose (\blacksquare), glicose (\circ), etanol (\blacktriangle) e massa seca (\blacklozenge)

A



B



C

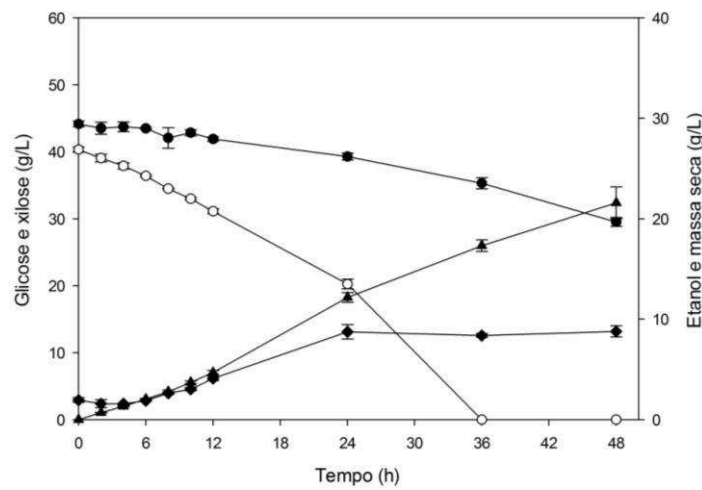


Figura 4: Cinética da fermentação de *S. passalidarum* em hipoxia. (A) 8% xilose, (B) 8% glicose e (C) 8% glicose e xilose. . Xilose (●), glicose (○), etanol (▲) e massa seca (◆).

Em cofermentação os rendimentos e produtividades de etanol foram similares aos encontrados durante a fermentação de xilose. Isso indica que a glicose não interfere no metabolismo de xilose na formação do produto de interesse (Tabela 2).

O consumo dos açúcares em cofermentação foi diferente nas duas condições de oxigênio avaliadas. Em aerobiose *S. passalidarum* consome primeiro a glicose e depois a xilose. A taxa de consumo em cofermentação em aerobiose da glicose foi de $q_s = 0,38 \text{ g/g}_{(MS)} \cdot \text{h}^{-1}$. Entretanto, a taxa de consumo de xilose não foi calculada na condição aeróbica, pois durante a fase exponencial de crescimento da levedura este açúcar não foi consumido.

Em hipoxia, *S. passalidarum* consome ambos os açúcares a partir de 12 h de cultivo. O consumo de glicose ocorre desde o início do cultivo e apresenta uma taxa maior ($q_s = 0,16 \text{ g/g}_{(MS)} \cdot \text{h}^{-1}$) em relação à xilose ($q_s = 0,04 \text{ g/g}_{(MS)} \cdot \text{h}^{-1}$).

Durante a fermentação de glicose individual, o melhor rendimento foi encontrado em hipoxia, enquanto que na fermentação de xilose e na mistura de açúcares, os melhores rendimentos e produtividades foram em aerobiose. Em todos os ensaios fermentativos não foram produzidos os subprodutos xilitol e ácido acético. O glicerol foi detectado em concentrações baixas, cerca de 0,8 g/L.

5.4 A presença de xilose induz a expressão de genes que codificam enzimas importantes do seu metabolismo

Em *S. passalidarum*, a enzima xilose redutase é codificada por dois genes (*XYL 1.1* e *XYL 1.2*). Essas duas cópias estão a aproximadamente 1Kb de distância no genoma e, até o momento, foram encontradas somente nesta levedura (Cadete *et al.*, 2016). Durante as buscas de genes no banco de dados, foi encontrado também duas cópias do gene que codificam a enzima xilitol desidrogenase (*XYL 2.1* e *XYL 2.2*).

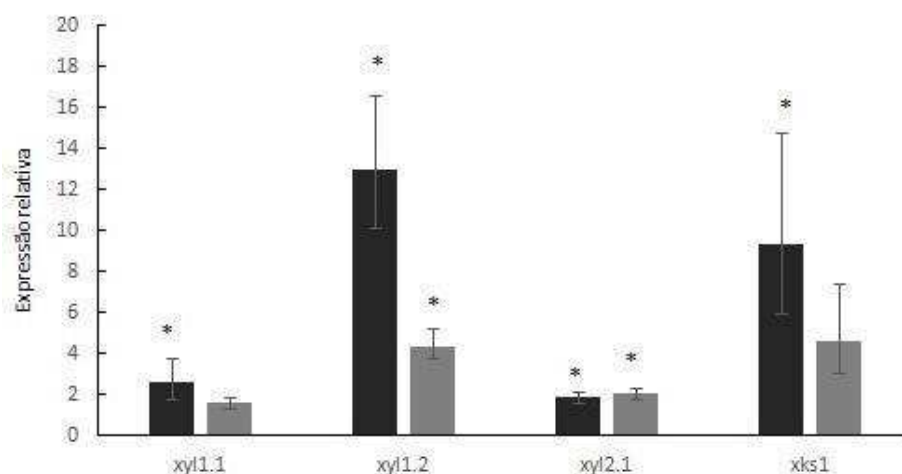
Os genes *XYL 1.1*, *XYL 1.2*, *XYL 2.1* e *XKS1* foram expressos em todas as condições avaliadas (Figura 5). Porém, o gene *XYL 2.2* não foi expresso (dados não mostrados). O perfil transcricional da levedura após 6h de cultivo mostra que os genes que codificam as enzimas XR, XDH e XK são induzidos por xilose, visto que no cultivo contendo somente xilose como fonte de carbono, todos os genes são superexpressos nas duas condições de oxigênio avaliadas em relação a condição

contendo apenas glicose (Figura 6).

Em aerobiose, em que o consumo dos açúcares não é simultâneo na cofermentação, os genes *XYL 1.2* e *XYL 2.1* foram superexpressos em relação ao cultivo apenas com glicose, enquanto os demais não tiveram sua expressão alterada. Isso sugere que os genes do metabolismo de xilose não sofrem repressão clássica por glicose, pois em 6 h de cultivo na presença de ambos os açúcares, o gene o qual codifica a primeira enzima da via (*XYL 1.2*) está superexpresso (Figura 6).

Da mesma forma, em cofermentação na condição de hipoxia, o gene *XYL 1.1* é superexpresso em relação ao cultivo com apenas glicose, enquanto os outros não sofreram alteração, corroborando a hipótese sugerida de que os genes do metabolismo de xilose em *S. passalidarum* não sofrem repressão por glicose.

A



B

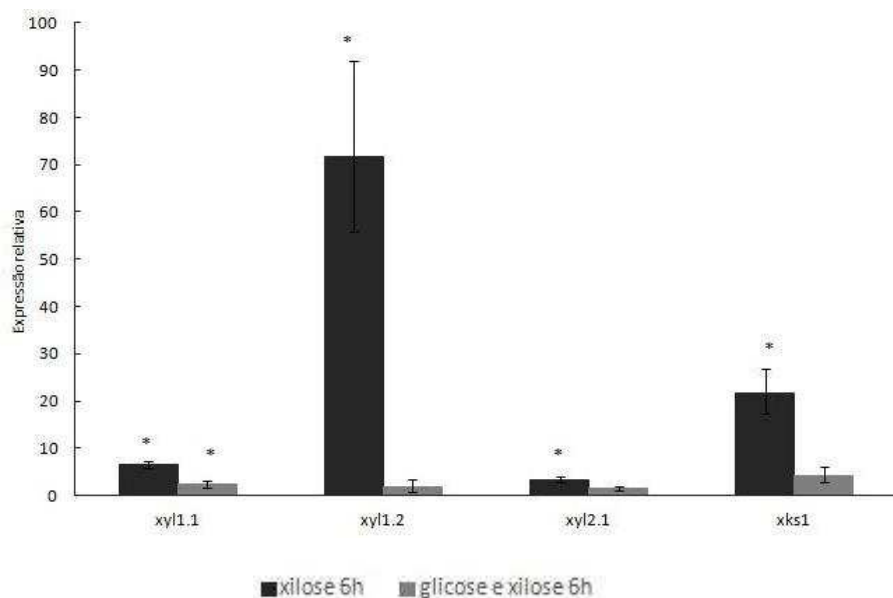


Figura 6: Expressão relativa dos genes *XYL* 1.1, *XYL* 1.2, *XYL* 2.1 e *XKS* 1 em células cultivadas em xilose e em glicose e xilose por 6 horas. (A) Aerobiose, (B) Hipoxia. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e as médias indicadas com asterisco são significativamente superexpressas em relação ao tratamento controle (células cultivadas em glicose).

As cópias dos genes que codificam a enzima xilose redutase (*XYL* 1.1 e *XYL* 1.2) possuem um perfil de expressão diferente no cultivo em xilose e em cofermentação, nas duas condições de oxigênio. No cultivo em xilose, a cópia *XYL* 1.2 é mais expressa do que a cópia *XYL* 1.1. Esse perfil é mantido no cultivo em

cofermentação aerobiose. Porém em cofermentação hipoxia, a cópia *XYL 1.1* foi mais expressa do que a cópia *XYL 1.2* (Figura 6).

6. DISCUSSÃO

Para avaliar como a glicose interfere na fermentação de xilose da levedura *S. passalidarum* NRRLY 27907, promissora para a fermentação de hidrolisados lignocelulosicos, realizou-se um estudo da cinética de crescimento desta levedura em xilose, na presença e ausência de glicose, na condição de aerobiose e hipoxia. Além disso, a análise do crescimento de *S. passalidarum* na presença de 2-DOG e a avaliação da expressão de genes que codificam as enzimas chaves para o metabolismo de xilose permitiu avaliar se esta levedura possui repressão clássica por glicose no uso de xilose.

A avaliação do crescimento de diversas leveduras fermentadoras de xilose em meio contendo xilose e 2-DOG revelou diferentes perfis. A levedura *S. stipitis* vem sendo estudada há mais tempo como promissora para a fermentação de hidrolisados lignocelulosicos (Pignal, 1967). Recentemente espécies do gênero *Spathaspora* também vêm se destacando como boas fermentadoras de xilose (Nguyen *et al.*, 2006; Cadete *et al.*, 2009). Os resultados revelaram que as leveduras *S. passalidarum* e *S. arborariae* não possuem repressão por glicose no metabolismo de xilose, enquanto que o metabolismo de xilose da levedura *S. stipitis* possui repressão parcial por glicose. O fato da levedura *S. passalidarum* não possuir repressão por glicose no metabolismo de xilose a torna ainda mais interessante para futuras aplicações biotecnológicas na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos.

Nossos resultados também demonstraram que outra levedura fermentadora de xilose, *K. marxianus*, possui repressão por glicose no metabolismo de xilose. De fato, alguns trabalhos, realizado em meio líquido com glicose e xilose, demonstram que as linhagens *K. marxianus* CCT7735 (Santos *et al.*, 2012), mesma linhagem utilizada neste trabalho, e *K. marxianus* DMKU3-1042 (Rodrussamee *et al.*, 2011) apresentam repressão por glicose no uso da xilose em aerobiose. Isto demonstra diversas formas de regulação do metabolismo de xilose em diferentes leveduras.

A cinética de crescimento de *S. passalidarum* na utilização dos açúcares glicose ou xilose demonstrou que a levedura possui a mesma afinidade por ambos os substratos, visto que a constante de saturação (K_s) não foi significativamente

diferente nas duas condições de oxigênio avaliadas. Na mistura dos açúcares glicose e xilose, o Ks em aerobiose foi significativamente maior do que o Ks em hipoxia, sugerindo que os sistemas de transportes desses açúcares são afetados pela disponibilidade de oxigênio no meio. A disponibilidade de oxigênio interfere no balanço redox da célula, o que influencia o metabolismo dos açúcares (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Hou, 2012).

Hou (2012) avaliou o consumo de xilose na presença de glicose da linhagem *S. passalidarum* ATCC MYA-4345 (NRRLY 27907) em meio líquido. Neste caso, ocorreu consumo de açúcares simultâneos em aerobiose e não simultâneo em condição limitante de oxigênio. Segundo o autor, a levedura pode utilizar diferentes sistemas de transporte dependendo da condição de oxigênio no meio. Existem dois tipos de transportadores para a xilose em leveduras: difusão facilitada e transporte ativo, através do simporte de xilose e prótons. Dessa forma, a disponibilidade de oxigênio pode interferir na força motriz de prótons para realizar o transporte ativo (Hou, 2012).

Além do estudo de Hou (2012), outro estudo demonstra a interferência do oxigênio no consumo dos açúcares glicose e xilose por *S. passalidarum* NRRLY 27907. Long *et al.*, 2012 demonstrou que em condições totalmente aeróbias, 700 rpm e inóculo inicial de 0,014mg/mL de massa seca, o consumo dos açúcares xilose e glicose foram simultâneos. Porém, nesta condição não houve produção de etanol e nas 20 primeiras horas de cultivo não houve crescimento celular. Neste mesmo estudo, foram realizados também experimentos na condição limitante de oxigênio em biorreatores de 3 litros com volume de trabalho de 2 litros, equilibrado com 90% de N₂ e 10% de ar (nível de oxigênio dissolvido igual a 2,1% de O₂). Neste caso, xilose e celobiose foram consumidas desde o início a taxas muito semelhante na presença ou ausência de glicose. Porém na presença de glicose houve um atraso no consumo de xilose e celobiose nas 15 primeiras horas (Long *et al.*, 2012).

As diferenças de consumo de glicose e xilose em cofermentação nestes estudos podem ser devidas às diversas condições experimentais que interferem na disponibilidade de oxigênio no meio. Assim, o oxigênio pode estar interferindo no metabolismo e /ou transporte dos açúcares, podendo apresentar diversas respostas em relação ao consumo dos mesmos (Hou, 2012). Além disso, a glicose pode causar um sinal de repressão catabólica diferente dependendo das condições de oxigenação do meio.

Para compreender melhor se a glicose causa um sinal de repressão transcricional dos genes do metabolismo de xilose, foram realizados ensaios fermentativos em xilose e/ou glicose, em aerobiose e hipoxia, a fim de avaliar a expressão de genes e também os rendimentos fermentativos.

Os melhores rendimentos e produtividades foram encontrados no cultivo em xilose e mistura de açúcares em aerobiose. Isso demonstra mais uma vez o potencial de *S.passalidarum* NRRLY 27907 como uma boa fermentadora de xilose. Diversos estudos mostram que o rendimento celular a partir do cultivo em xilose de *S. passalidarum* é cerca da metade encontrada no cultivo em glicose. Porém, os rendimentos de produção de etanol são maiores em xilose (Hou,2012; Long *et al.*, 2012; Yi-Kai Su *et. al.*, 2015).

Assim como relatado na literatura, o consumo dos açúcares em cofermentação foi diferente nas duas condições de oxigênio avaliadas, sugerindo que o oxigênio interfere no balanço redox e/ou transporte dos açúcares. A produção de etanol foi similar em cofermentação, comparado ao cultivo em xilose, em ambas condições de oxigênio. O fato de glicose não interferir na produção de etanol por *S. passalidarum* NRRLY 27907 indica que hidrolisados lignocelulosicos podem ser concentrados com este açúcar sem prejuízo na produtividade de etanol.

A análise da expressão de genes após 6h de cultivo demonstrou que os genes que codificam as enzimas do metabolismo de xilose são induzidos por xilose. Em cofermentação os genes não sofrem repressão por glicose, pois os genes são superexpressos ou não tem sua expressão alterada em relação ao cultivo contendo apenas glicose. Na levedura *S. stipitis* estudos também demonstram que a expressão dos três genes da via da assimilação de xilose (*XYL 1*, *XYL 2* e *XKS 1*) são superexpressos quando as células são cultivadas em xilose. No cultivo apenas em glicose, esses genes possuem diminuição da expressão, sugerindo uma repressão de glicose no metabolismo de xilose nesta levedura (Jeffries e Vleet, 2009). Entretanto, não foram feitos estudos de expressão destes genes em condição de cofermentação.

A diferença de expressão das cópias dos genes que codificam a enzima xilose redutase (*XYL 1.1* e *XYL 1.2*) em aerobiose e hipoxia poderia explicar a diferença de consumo de açúcares nas duas condições de oxigênio.

A levedura *S. passalidarum* não possui desequilíbrio redox, havendo regeneração dos cofatores na própria via, uma vez que as duas primeiras enzimas da via (*XR* e *XDH*) utilizam o mesmo cofator na forma reduzida (*XR*) e oxidada (*XDH*)

(Cadete *et al.*, 2016). Pelos resultados obtidos, sugerimos que a diferença de expressão dos genes *XYL 1.1* e *XYL 1.2* podem interferir no equilíbrio redox da célula. Durante as fermentações de xilose e em cofermentação em aerobiose, *XYL 1.2* possui maior expressão do que o gene *XYL 1.1*, resultado que sugere não haver desequilíbrio redox no metabolismo de xilose (Figura 7A). Isso é mais evidente no cultivo em xilose em hipoxia, pois neste caso o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons é reduzido, impedindo a reoxidação eficiente de NADH, e assim *XYL 1.2* é ainda mais expresso comparado à fermentação de xilose em aerobiose (Figura 6). Porém em cofermentação em hipoxia, um desequilíbrio redox pode acontecer, pois nesta condição a cópia *XYL 1.1*, a qual codifica a XR dependente estritamente de NADPH, possui maior expressão do que a cópia *XYL 1.2*, influenciando no fluxo metabólico e consumo de açúcares (Figura 6).

Santos *et al.* (2012) verificou que a glicose reprime o consumo de xilose em *K. marxianus* CCT7735 em aerobiose. Porém, na presença de antimicina A, um inibidor da cadeia respiratória, não houve repressão de glicose no consumo de xilose e a levedura consumiu glicose e xilose simultaneamente. Neste estudo, supõe-se que o consumo simultâneo de xilose e glicose foi possível, pelo fato de glicose restabelecer um equilíbrio redox na célula, visto que a xilose não foi mais consumida quando a glicose foi esgotada.

Da mesma forma, o consumo simultâneo de xilose e glicose por *S. passalidarum* em hipoxia pode também ser uma alternativa para restabelecer o equilíbrio redox na célula. Como nesta condição o gene *XYL 1.1*, que codifica a enzima XR dependente de NADPH, é superexpresso, um desequilíbrio redox acontece no metabolismo de xilose. Dessa forma, a presença de glicose pode ser importante para a regeneração dos cofatores envolvidos na via de assimilação de xilose.

O consumo de glicose no processo de cofermentação em hipoxia fornece os cofatores NADPH e NAD⁺, a serem usados pelas enzimas XR e XDH do metabolismo de xilose, respectivamente. Considerando que o cultivo em glicose gera maior rendimento de biomassa, provavelmente o fluxo pela via das pentoses fosfato é mais intenso. A primeira reação da via das pentoses fosfato (glicose-6-fosfato convertida a 6-fosfogluconato) gera NADPH, aumentando a concentração de NADPH a ser utilizado pela enzima XR codificada pelo gene *XYL 1.1* (Figura 7B).

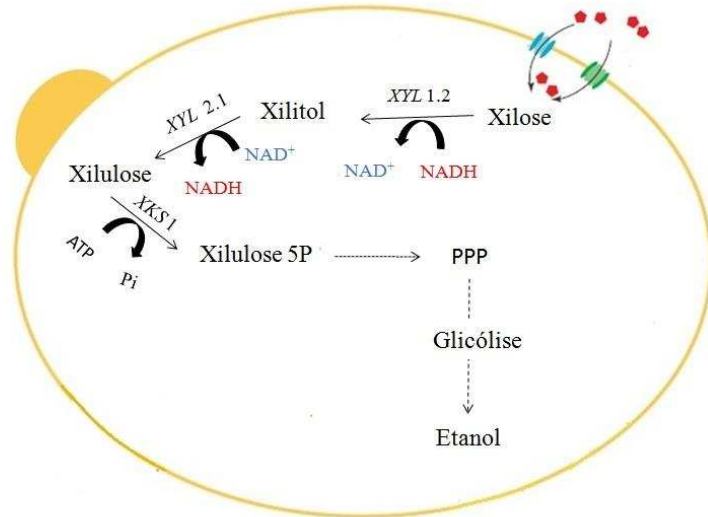
Hou (2012) avaliou o consumo de xilose na presença de 2-desoxiglicose da

linhagem *S. passalidarum* ATCC MYA-4345 (NRRLY 27907) em meio líquido e verificou que em condições limitantes de oxigênio, o consumo de xilose foi totalmente inibido. Isso confirma a hipótese sugerida neste trabalho de que o consumo simultâneo de glicose e xilose em hipoxia é uma alternativa para restabelecer o equilíbrio redox na célula. Pois, como o análogo 2-desoxiglicose não pode ser metabolizado pela célula, não haverá o restabelecimento do equilíbrio redox e por isso a xilose não pode ser consumida.

A levedura *S. stipitis* também apresentou diferenças de consumo de glicose e xilose em diferentes condições de oxigênio. Em aerobiose, a xilose não é consumida na presença de glicose. Porém, em mutantes para o gene citocromo c (*CYC 1*), a xilose foi utilizada juntamente com a glicose comparada à linhagem selvagem (Shi *et al.*, 1999).

Dessa forma, em *S. passalidarum* o consumo simultâneo ou não dos açúcares glicose e xilose em diferentes condições de oxigênio, não é uma questão de repressão da glicose na síntese das enzimas do metabolismo de xilose, e sim uma adaptação fisiológica da célula para estabelecer o equilíbrio redox.

A



B

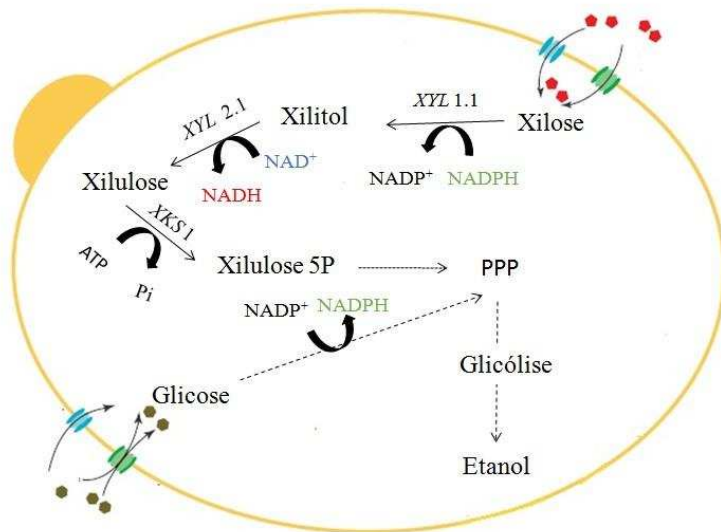


Figura 7: Metabolismo de xilose (A) no cultivo em xilose nas duas condições de oxigênio e cofermentação em aerobiose e (B) no cultivo em cofermentação hipoxia. Fonte: modificado de Yi-Kai Su *et. al.*, 2015.

7. CONCLUSÃO

A levedura *S. passalidarum* apresentou maiores rendimentos celulares, e consequentemente maiores velocidades de crescimento, no cultivo em glicose comparado ao cultivo em xilose, em ambas as condições de oxigênio avaliadas. Os rendimentos de etanol foram maiores no cultivo em xilose aerobiose ($Y_{(P/S)} = 0,45$ g/g) e no cultivo em glicose hipoxia ($Y_{(P/S)} = 0,40$ g/g). Em cofermentação os rendimentos e produtividades de etanol foram similares aos encontrados durante as fermentações de xilose, indicando que a glicose não interfere na produção do produto de interesse, tanto em aerobiose quanto em hipoxia.

O perfil de consumo dos açúcares foi diferente nas duas condições de oxigênio. Em aerobiose *S. passalidarum* consome primeiro a glicose e depois a xilose, enquanto que em hipoxia ocorre o consumo simultâneo dos açúcares a partir de 12 h de cultivo, porém o consumo de glicose é maior.

As análises da expressão dos genes que codificam as enzimas da via do metabolismo de xilose (XR, XDH e XK) revelaram que estes genes são induzidos por xilose e não sofrem repressão clássica por glicose. A análise do crescimento em meio contendo xilose e 2-DOG também revelou que *S. passalidarum* não possui repressão por glicose no metabolismo de xilose.

As cópias dos genes que codificam a enzima xilose redutase (XR) possuem um perfil de expressão diferente no cultivo em xilose e em cofermentação. No cultivo em cofermentação aeróbio e xilose nas duas condições de oxigênio, a cópia *XYL 1.2* obteve maior expressão do que a cópia *XYL 1.1*, indicando não haver desequilíbrio redox no metabolismo de xilose. Em cofermentação na condição limitante de oxigênio, a cópia *XYL 1.1* foi mais expressa do que a cópia *XYL 1.2*, e consequentemente um desequilíbrio redox acontece na célula. Neste caso, o consumo simultâneo de glicose e xilose é uma alternativa para restabelecer o equilíbrio redox na célula.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agbogbo, F. K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K. S. (2006). Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2333-2336.

Barnett, J. A. (1992). Some controls on oligosaccharide utilization by yeasts: the physiological basis of the Kluyver effect. **FEMS Microbiology Letters**, v. 100, n. 1-3, p. 371-378.

Cadete, R. M., Las Heras, A. M. de., Sandstrom, A.G., Ferreira, C., Gírio, F., Gorwa-Grauslund, M.F., Rosa, C. A., Fonseca C. (2016). Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v.9:167, p.1-14.

Cadete, R. M., Melo, M. A., Dussán, K. J., Rodrigues, R. C. L. B., Silva, S. S., Zilli, J. E., Vital, M. J. S., Gomes, F. C. O., Lachance, M. A., Rosa, C. A. (2012). Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian forest. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43135.

Cadete, R. M., Santos, R. O., Melo, M. A., Mouro, A., Gonçalves, D. L., Stambuk, B. U., Gomes, C. O., Lachance, M., Rosa, C. A. (2009). *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D- xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEAMS Yeast Research**, v.9, p.1338-1342.

Campos, V. J. (2015). Caracterização fisiológica de leveduras fermentadoras de xilose. Dissertação. **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa.

Collart, M. A., Oliviero, S. (2001). Preparation of Yeast RNA. In: **Current Protocols in Molecular Biology**, 23:IV:13, Unit 13.12.

Cortez, L. A. B.; Lora, E. E. S.; Gómez, E. O. (Org.) (2008). **Biomassa para Bioenergia**. Campinas-SP: Editora UNICAMP, 734p.

Cunha-Pereira, F.da., Hickert, L.R., Sehnem, N.T., De Souza-Cruz, P.B., Rosa, C.A., Ayub, M.A.Z. (2011). Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v.102, p. 4219-4225.

- Dashtban, M., Wen, X., Bajwa, P. K., Ho, C. Y., Lee, H. (2015). Deletion of *hxx1* gene results in derepression of xylose utilization in *Scheffersomyces stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.42, p. 889-896.
- Delgenes, J., Moletta, R., Navarro, J. M. (1996). Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p. 220–225.
- De Souza, C. J., Costa, D. A., Rodrigues, M. Q., Dos Santos, A. F., Lopes, M. R., Abrantes, A. B., Costa, P.S, Silveira, W.B., Passos, F. M. L., Fietto, L. G. (2012). The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 109, p 63-69.
- Gong C. S., Chen L. F., Flickinger M. C., Chiang L. C., Tsao G. T. (1981). Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, p.430–436.
- 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**, v.74, p.937–953.
- Harner, N. K., Wen, X., Bajwa, P. K., Austin, G. D., Ho, C. Y., Habash, M. B., Trevors, J. T., Lee, H. (2015). Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p 1-20.
- Hou, X. (2012). Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.94, p.205-214.
- Hou, X., Yao, S. (2012). Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. **Applied microbiology and Biotechnology**, v.93, p. 2591-2601.
- Jeffries, T. W., Fady, J. H., Lightfoot, E. N. (1985). Effect of glucose supplements on the fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 2, p. 171-176.
- Jeffries, T. W.; Van Vleet, J. R. H. (2009). *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics,

and gene clusters. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 6, p. 793-807.

Kayikci, Ö; Nielsen, J. (2015). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v.15, n.6, p. 1-8.

Kim, S. R., Ha, S. J., Wei, N., Oh, E. J., Jin, Y. S. (2012). Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 274-282.

Kim, Y., Kreke, T., Hendrickson, R., Parenti, J., Ladisch, M. R. (2013). Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. **Bioresource Technology**, v.35, p.30–38.

Kwan, J. S., Morvan, H. (1995). Characterization of extracellular $\beta(1,4)$ -xylan backbone O-substituted by arabinogalactans type II in a plant cell suspension. **Carbohydrate Polymers**, v.26, p.99-107.

Lane, M. M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K. H., O'Byrne, C. P., Morrissey, J.P. (2011). Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 4, p. 507-519.

Leandro, M. J., Fonseca, C., Gonçalves, P. (2009). Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 511-525.

Lee, H. (1990). D-Glucose inactivation of D-xylose utilization in *Pachysolen tannophyllus*. **Annual Meeting Canadian Society of Microbiologist**, University of Calgary, Alberta, Canada.

Lee, W. J., Kim, M. D., Ryu, Y. W., Bisson, L., Seo, J. H. (2002). Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1, p. 186-191.

Long, T. M., Su, Yi-Kai, Headman, J., Higbee, A., Willis, L. B., Jeffries, T. W. (2012). Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the Beetle-Associated Yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p. 5492– 5500.

Madhavan, A., Tamalampudi, S., Ushida, K., Kanai, D., Katahira, S., Srivastava, A., Kondo, A. (2009). Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.82, p.1067-1078.

- Monod, J. (1949). The growth of bacteria cultures. **Annual Review Microbiology**, v.3, p. 371-394.
- Morales, P., Gentina, J. C., Aroca, G., Mussatto, S. I. (2017). Development of an acetic acid tolerant *Spathaspora passalidarum* strain through evolutionary engineering with resistance to inhibitors compounds of autohydrolysate of *Eucalyptus globulus*. **Industrial Crops and Products**, v.106, p. 5-11.
- Moreira, J. R., Goldemberg, J. (1999). The alcohol program. **Energy Policy**. v.27, p.229– 245.
- Moysés, D. N., de Almeida, J. R., De Moraes, L. M., Torres, F. A. (2016). Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: challenges and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 207, p. 1-18.
- Nakanishi, S. C., Soares, L. B., Biazzi, L. E., Nascimento, V. M., Costa, A. C., Rocha, G. J., Ienczak, J. L. (2017). Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.114, p.2211-2221.
- Nguyen, N., Suh, S., Marshall, C. J., Blackwell, M. (2006). Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesse* sp.nov. **Mycological Research**, v.110, p. 1232-1241.
- Pignal, M. C (1967). Une nouvelle espece de levure isole e de larves d'insectes: *Pichia stipitis*. **Bulletin Mensuel de la Siciété Linnéenne de Lyon**, v. 4, p 163-168.
- Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Hirata K., Suprayogi, Savitree L., Kosaka, T., Yamada M. (2011). Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1573-1586.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.30, p.279–291.
- Sanchez, O. J., Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-95.

Santos, F. A.; Queiróz, J. H. De; Colodette, J. L.; Fernandes, S. A.; Guimarães, V. M. (2012). Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**. v.35, p.1004-1010.

Santos, L. V., Barros Grassi, M. C., Gallardo, J. C. M., Pirolla, R. A. S., Calderón, L. L., de Carvalho-Netto, O. V., Teixeira, G. S. (2016). Second-generation ethanol: the need is becoming a reality. **Industrial Biotechnology**, v.12, p. 40-57.

Santos, V. C. dos., Bragança, C. R. S., Passos, F. J. V., Passos, F. M. L. (2013). Kinetics of growth and ethanol formation from a mix of glucose/xylose substrate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 1, p. 153-161.

Shi, N. Q., Davis, B., Sherman, F., Cruz, J., & Jeffries, T. W. (1999). Disruption of the cytochrome c gene in xylose-utilizing yeast *Pichia stipitis* leads to higher ethanol production. **Yeast**, v. 15, n. 11, p. 1021-1030.

Slininger P. J., Bothast R. J., Vancauwenberge J. E., Kurtzman C. P. (1982). Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, p.371–384.

Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Medeiros, A. B. P., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., Pitarelo, A. P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L. M. F., Ferrara, M. A., Bom, E. P. S., Moraes, L. M. P., Araújo, A., Torres, F. A. G. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, p.4820-4825.

Sreenath, H. K.; Jeffries, T. W. (1999). 2-Deoxyglucose as a selective agent for derepressed mutants of *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 211-222.

Su, Y. K., Willis, L. B.; Jeffries, T. W. (2015) Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 457-469.

Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**. v.83, p.1-11.

Suprayogi, S., Nguyen, M. T., Lertwattanasakul, N., Rodrussamee, N., Limtong, S.,

Kosaka, T., Yamada, M. (2015). A *Kluyveromyces marxianus* 2-deoxyglucose-resistant mutant with enhanced activity of xylose utilization. **International Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 235-244.

Van Maris, A. J. A., Abbott, D. A., Bellissimi, E., Van Den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A. H., Wisselink, H. W., Scheffers, W. A., Van Dijken, J. P., Pronk, J. T. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.90, p.391-418.

Webb, S. R.; Lee H. (1990). Regulation of d-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. **Biotechnology Advances**, v. 8, p. 685--97.

Westergaard, S. L., Oliveira, A. P., Bro, C., Olsson, L., Nielsen, J. (2007). A systems biology approach to study glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p.134-145.

Whistler, R. L., Smart, C. L. (1953) **Polysaccharide Chemistry**. New York: Academic Press Inc., 493p.

Wiegel J., Carreira L. H., Mothershed C. P., Puls J. (1983). Production of ethanol from bio-polymers by anaerobic, thermophilic, and extreme thermophilic bacteria. II. *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 and its mutants in batch cultures and resting cell experiments. **Biotechnology and Bioengineering**, p.193–205.

Yu, H., Guo, J., Chen, Y., Fu, G., Li, B., Guo, X., Xiao, D. (2017). Efficient utilization of hemicellulose and cellulose in alkali liquor-pretreated corncob for bioethanol production at high solid loading by *Spathaspora passalidarum* U1-58. **Bioresource Technology**, v. 232, p.168-175.

Yuan, T., Ren Y., Meng K., Feng Y., Yang, P., Wang, S., Shi, P., Wang, L., Xie, D., Yao, B. (2011). RNA-Seq of the xylose-fermenting yeast *Scheffersomyces stipitis* cultivated in glucose or xylose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p.1237-1249.

Zhang, J., Zhang, B., Wang, D., Gao, X., Sun, L., Hong, J. (2015). Rapid ethanol production at elevated temperatures by engineered thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* via the NADP (H)-preferring xylose reductase-xylitol dehydrogenase pathway. **Metabolic Engineering**, v. 31, p. 140-152.