

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

MIGUEL EDMUNDO ROMANIZIO

AVALIAÇÃO DO EFEITO CRABTREE EM *Candida maltosa* UFV-1

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2025

MIGUEL EDMUNDO ROMANIZIO

AVALIAÇÃO DO EFEITO CRABTREE EM *Candida maltosa* UFV-1

Monografia, apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Wendel Batista da Silveira

VIÇOSA - MINAS GERAIS


2025

MIGUEL EDMUNDO ROMANIZIO

AVALIAÇÃO DO EFEITO CRABTREE EM *Candida maltosa* UFV-1


Monografia, apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

APROVADO: 27/11/2025

Documento assinado digitalmente
 **MIGUEL EDMUNDO ROMANIZIO**
Data: 29/11/2025 10:50:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Miguel Edmundo Romanizio

(Autor)

Documento assinado digitalmente
 **WENDEL BATISTA DA SILVEIRA**
Data: 29/11/2025 16:31:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Wendel Batista da Silveira

(Orientador)

Departamento de Microbiologia - UFV

RESUMO

Em um contexto de mudanças climáticas potencializadas pela ação antrópica, o desenvolvimento de modelos alternativos de produção é cada vez mais necessário, especialmente no que tange à redução do uso de combustíveis fósseis, responsáveis pela liberação de grandes quantidades de gases estufa anualmente na atmosfera. Uma das alternativas promissoras para substituir os combustíveis fósseis é o etanol, que libera volumes menores de dióxido de carbono ao ser queimado em motores à combustão, quando comparado à gasolina. No Brasil, a maior parte do etanol é de primeira geração, produzido, majoritariamente, de cana-de-açúcar, prática que leva à degradação de ecossistemas para a expansão de terras agricultáveis, um problema ambiental grave. Nesse contexto, a crescente demanda por fontes energéticas mais sustentáveis impulsiona a busca por microrganismos capazes de converter biomassa lignocelulósica em biocombustíveis. A levedura *Candida maltosa* UFV-1, isolada de solo, apresenta potencial biotecnológico, uma vez que é caracterizada por sua tolerância a inibidores encontrados em hidrolisados lignocelulósicos e capacidade de metabolizar pentoses para a produção de lipídios. Entretanto, não se conhece sua capacidade de produzir etanol, o que a tornaria uma plataforma promissora para a produção de etanol de segunda geração. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência do Efeito Crabtree – fenômeno metabólico no qual a fermentação alcoólica é favorecida mesmo na presença de oxigênio, geralmente induzida por altas concentrações de glicose – em *C. maltosa* UFV-1. Foram realizados cultivos em biorreatores com diferentes concentrações de glicose, acompanhados por análises de crescimento celular, produção de etanol e consumo de substrato.

Palavras-chave: fermentação, respiração, biorreatores, metabolismo

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABELAS.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1. <i>Candida maltosa</i>	9
2.2. Metabolismo fermentativo.....	11
2.3. Efeito Crabtree.....	14
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo geral.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Manutenção e ativação das culturas.....	18
4.2. Meios e condições de cultivo.....	18
4.3. Cultivo em biorreator.....	18
4.4. Quantificação de biomassa por gravimetria.....	19
4.5. Quantificação de metabólitos extracelulares e substrato por CLAE.....	19
4.6. Parâmetros de crescimento.....	19
5. RESULTADOS.....	20
5.1. Cultivos em biorreator.....	20
5.2. Análise de metabólitos.....	20
6. DISCUSSÃO.....	22
7. CONCLUSÃO.....	26
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Efeito Crabtree em <i>S. cerevisiae</i>	17
FIGURA 2: Concentração de glicose, biomassa e etanol nos cultivos em biorreator.....	21
FIGURA 3: Valores de etanol, citrato e glicerol após o pulso.....	21
FIGURA 4: Simplificação das vias metabólicas centrais.....	25

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores de parâmetros fermentativos analisados.....22

1. INTRODUÇÃO

Durante grande parte da história, as sociedades estruturaram-se em torno de elementos religiosos, culturais e políticos, majoritariamente. Eventos como o surgimento das religiões monoteístas abraâmicas, o Renascimento europeu, o Florescimento Cultural Chinês durante a Dinastia Ming, a Revolução Francesa, entre outros marcos históricos, foram pivotantes para a definição das sociedades (DeLong, 2000). Entretanto, no século XX, com a revolução industrial e a rapidez das transformações comerciais, os modelos econômicos passaram a ocupar uma posição de destaque em diferentes sociedades. Essa mudança de perspectiva foi acompanhada de uma intensificação da exploração de recursos naturais e da degradação de ecossistemas para desenvolvimento de atividades econômicas em um ritmo intenso. Nas últimas duas décadas, o consumo global aumentou cerca de 8 vezes (Lamba et al. 2024). Prevê-se, ainda, que, até 2050, o uso de recursos naturais será três vezes maior (Upadhyay & Arvind, 2021), o que aumenta a busca por plataformas mais sustentáveis de produção.

Neste contexto, surge o conceito de economia circular, um contraponto ao modelo tradicional de economia linear que segue a sequência “extrair-produzir-descartar” (Ness, 2008). Processos que seguem a economia circular procuram, por meio da valorização de subprodutos de outros processos industriais, manter o desenvolvimento econômico concomitante à redução dos possíveis impactos ambientais (Kok et al., 2017), reduzir a exploração e aumentar o reuso, a reciclagem (Kirchherr, 2017), de forma a criar um sistema que se sustenta sem grandes danos ambientais. A redução do uso de combustíveis fósseis é um fator essencial para a redução dos impactos gerados pelas atividades humanas, dada a sua elevada emissão de gases estufa, o que impulsiona a busca por fontes energéticas mais sustentáveis (Soeder et al., 2020).

Bioetanol é um dos principais tipos de combustíveis renováveis que podem substituir, mesmo que parcialmente, combustíveis fósseis, como a gasolina (Dos Santos et al., 2016). Analisando-se o Índice de Intensidade de Carbono (CII), o etanol derivado de milho emite 75,97 g de CO₂/MJ, enquanto o que deriva de cana-de-açúcar libera 56,66 g de CO₂/MJ. Quando comparado à gasolina (95,86 g de CO₂/MJ), o uso de bioetanol apresenta uma emissão reduzida de gases que intensificam o efeito estufa (Dos Santos et al., 2016). O etanol pode ser classificado em três categorias: de primeira geração, baseado em culturas alimentares; de segunda geração, produzido a partir de biomassas lignocelulósicas; terceira, que se baseia em biomassas microbianas. A produção de etanol no Brasil tem início na década

de 30, mas aumenta consideravelmente a partir de 1975, quando o Programa Nacional do Álcool foi implementado como uma resposta às flutuações do petróleo (Stolf, 2020). Além do aperfeiçoamento tecnológico para a produção de etanol, o volume da produção tem crescido rapidamente: em 1981, eram cerca 5 milhões de metros cúbicos; em 2000, aproximadamente 10,5 milhões de m³; em 2020, 32,7 milhões de m³ e prevê-se que, em 2048, o mercado brasileiro de etanol será de 47,1 milhões de m³ (UNICA Histórico de Produção e Moagem Por Produto, Dados de Produção; De Oliveira Gonçalves, 2023). Segundo a Agência Nacional de Petróleo (ANP), em 2024, 90,85% da produção de etanol se baseia em cana-de-açúcar, enquanto o bagaço, um tipo de etanol de segunda geração, representa apenas 0,08% da produção, uma vez que grande parte dos microrganismos não metaboliza pentoses, açúcares abundantes em tais materiais, de forma eficiente. Assim, a prospecção de microrganismos capazes de produzir etanol a partir de subprodutos lignocelulósicos e consumir, de forma eficaz, pentoses, é uma alternativa promissora para que se aumente a produção de etanol de segunda geração, representando um modelo mais sustentável de produção de combustíveis.

A produção de etanol por microrganismos, especialmente por leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, é um processo bioquímico amplamente explorado na indústria de biocombustíveis e na indústria de alimentos há muitas décadas. Uma das características de leveduras eficientes na produção de etanol, como *S. cerevisiae*, é sua capacidade de, em condições de alta disponibilidade de glicose, apresentar o Efeito Crabtree que consiste na repressão da respiração pela glicose, com a ocorrência da fermentação mesmo na presença de oxigênio. Esse fenômeno está relacionado a mecanismos de regulação metabólica relacionados à sobrecarga do sistema respiratório e favorecimento da rápida geração de energia, resultando em maior produtividade fermentativa. Assim, o entendimento do efeito Crabtree é essencial para otimizar processos industriais e selecionar microrganismos com maior potencial biotecnológico para produção de etanol.

A levedura *Candida maltosa* UFV-1, isolada de amostra de solo pelo Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, apresenta potencial de produção de lipídios e capacidade de crescer em hidrolisados lignocelulósicos. Essa linhagem tolera inibidores gerados durante o pré-tratamento da biomassa, como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e ácido fórmico, além de metabolizar xilose e glicose como fonte de carbono e energia. Tais características tornam-na uma plataforma promissora para a produção de lipídios a partir de matérias-primas lignocelulósicas. Além disso, não se sabe, a fundo, como a linhagem produz etanol e como ela poderia ser empregada na produção de etanol de segunda geração. A

obtenção de óleo microbiano e etanol por meio dessa levedura se alinha aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU, em especial ao ODS 12 e ODS 13, referentes ao consumo e produção sustentáveis e à ação contra a mudança climática global, respectivamente. Este trabalho visa, portanto, a identificar os efeitos do aumento de glicose no metabolismo de *C. maltosa* UFV-1, com foco na produção de etanol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Candida maltosa*

A levedura *C. maltosa* foi isolada pela primeira vez em 1964 pelo Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Ajinomoto, em Kawasaki, Japão, em um estudo conduzido a fim de se obterem leveduras capazes de metabolizar hidrocarbonetos (Komagata et al. 1964). Na década de 1960, houve um aumento no interesse do setor petrolífero pela bioquímica de alcanos, principalmente associado ao uso de microrganismos para produção de proteínas para consumo humano ou animal, o que impulsionou a prospecção e caracterização de organismos com tal potencial biotecnológico, contexto no qual essa levedura foi isolada (Mauersberger et al. 1996). Essa espécie faz parte do Reino Fungi, Subreino Dikarya, Filo Ascomycota, Subfilo Saccharomycotina, Classe Pichiomycetes, Ordem Serinales e Família Debaryomycetaceae. É relevante citar que *C. maltosa* faz parte da Ordem Serinales, previamente conhecida como grupo CTG, que engloba espécies nas quais o códon CUG codifica uma serina no lugar de uma leucina (Krassowski et al. 2018).

A ordem Serinales, sobretudo o gênero *Candida*, possui representantes responsáveis por uma série de patologias em humanos, como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. auris* (Bongomin et al. 2017), com destaque para *C. tropicalis*, espécie filogeneticamente próxima a *C. maltosa* segundo sequenciamento de RNA ribossomal da subunidade pequena (18s) (Ohkuma et al., 1993; Opulente, 2024). Entretanto, apesar de fazer parte desse grupo, *C. maltosa* não é uma espécie clinicamente relevante para humanos (Kitamura et al. 1990; Silva et al. 1990). Outras espécies do gênero, como *C. utilis* e *C. sojae* têm seu potencial biotecnológico bem explorado e não são patogênicas (Mauersberger et al. 1996). Ainda nesse contexto, a segurança do uso industrial de *C. maltosa* é reforçada pelos estudos conduzidos na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas como uma fonte alternativa de proteínas (*single cell protein*) (Bauch et al. 1978; Mauersberger et al. 1996). Além disso, o fato de essa levedura ser raramente isolada de humanos sugere que a espécie não faz parte do grupo de organismos capazes de colonizar sistemas humanos (Mauersberger et al. 1996; Chávez-Tinoco, García-Ortega, e Mancera, 2024).

Sendo uma espécie mesófila comumente isolada do solo, *C. maltosa* apresenta maior crescimento entre 32-34 °C, mas ainda cresce a 37 °C e tolera temperaturas de até 41 °C (Nakase et al. 1972; Meyer et al. 1975). Entretanto, diferentemente do que se observa em espécies termófilas do gênero, como *C. albicans*, *C. rugosa* e *C. blankii*, *C. maltosa* não é capaz de crescer em temperaturas mais altas, como 47 °C. No que diz respeito ao pH, a espécie tolera valores entre 2,5 e 6,5, sendo que a faixa ideal varia de 3,5 a 5,5 (Gradova e Kovalsky 1978). Em condições de cultivo ideais em batelada, observa-se que diferentes linhagens de *C. maltosa* são capazes de atingir velocidades específicas de crescimento próximas a 0.55 h⁻¹ com glicose como única fonte de carbono e energia (Mauersberger, 1996) sob aeração plena. Altos níveis de oxigenação são essenciais para o crescimento de *C. maltosa* e em tensões de oxigênio gradativamente menores em cultivos, assim como em reatores com pouca homogeneização do meio de cultura, a produção de biomassa cai consideravelmente (Riege et al. 1989). Em situações de cultivo sob limitações acentuadas de oxigênio, há uma redução da incorporação de nitrogênio e de carbono à biomassa, assim como um aumento da produção de CO₂, enquanto mudanças ocasionais na pressão de oxigênio ocasionam apenas redução da incorporação de carbono e aumento na liberação de CO₂ (Riege et al. 1989).

Os trabalhos que discutem o metabolismo respiro-fermentativo de *C. maltosa* são majoritariamente datados das décadas de 70 e 80 (Röber & Reuter, 1979,1984; Röber, 1985; Schauer, 1988). Experimentos com carbono marcado mostram que a maior parte do metabolismo de hexoses se dá pela Via das Pentoses Fosfato, que gera gliceraldeído-3-fosfato, um intermediário comum com a via glicolítica, que culmina em piruvato, usado na síntese de acetil-CoA ou convertido em etanol pela fermentação alcoólica. Observa-se uma redução de atividade do Ciclo do Ácido Tricarboxílico (CAT) que varia com a oxigenação e com a hexose usada como fonte de carbono e energia, o que indica uma possível repressão dessa via. Além disso, a presença de glicose no meio pode causar repressão catabólica do ciclo do glioxilato, gliconeogênese, e do uso de fontes alternativas de carbono (hidrocarbonetos, acetato e etanol). Entretanto, os trabalhos trazem dificuldades na identificação da espécie e não abordam análises de fluxo de carbono devido às limitações de técnicas, o que impede o estudo mais aprofundado do balanço metabólico em *C. maltosa*. Além disso, não foram realizadas análises de expressão gênica, como transcriptômica e qPCR, que permitam identificar quais são as enzimas reprimidas no CAT e as maiores concentrações de glicose utilizadas nesses trabalhos se aproximam de 20 g/L, o que é baixo segundo metodologias

atuais de análise do Efeito Crabtree. Portanto, são necessários estudos mais aprofundados a fim de se compreender o metabolismo respiro-fermentativo de *C. maltosa*.

A linhagem *C. maltosa* UFV-1 foi isolada em 2024 pelo Laboratório de Fisiologia de Microrganismos de amostras de solo coletadas em Viçosa-MG. Capaz de acumular lipídios a partir de pentoses em hidrolisados lignocelulósicos e de tolerar inibidores de crescimento produzidos no tratamento dessa biomassa (furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e ácido fórmico), essa linhagem é uma promissora plataforma para a produção de lipídios a partir de subprodutos agroindustriais. Em experimentos conduzidos em laboratório durante o isolamento, testes preliminares indicam a produção de etanol em hidrolisado lignocelulósico.

2.2. Metabolismo fermentativo

Em comparação a bactérias, que apresentam uma maior diversidade metabólica, leveduras são mais homogêneas no que diz respeito ao metabolismo de açúcares (Van Dijken et al., 1986; Opulente, 2024). Para gerar energia, leveduras podem usar a via respiratória, dependente de oxigênio, oxidativa e altamente energética; ou a via fermentativa, que produz cerca de um décimo da energia produzida pela respiração aeróbica (Nilsson & Nielsen, 2016). A concentração de oxigênio no meio é, portanto, um fator central da produção de energia em microrganismos e diversas estratégias surgiram ao longo da evolução à escassez desse recurso (Dashko et al., 2014). Leveduras podem ser classificadas em diferentes categorias de acordo com o uso de oxigênio em seu metabolismo: aeróbias obrigatórias, que dependem exclusivamente da respiração aeróbia; fermentativas facultativas, que podem usar ambas as vias de metabolismo de açúcar; ou fermentativas obrigatórias (Merico et al., 2007). A capacidade de crescer em ausência de oxigênio está intimamente ligada à fermentação, uma vez que essa via é a principal alternativa à fosforilação oxidativa para a oxidação de NADH produzido na Via de Embden-Meyerhof-Parnas, principal fonte de ATP na fermentação, o que mantém o balanço redox celular (NADH/NAD⁺) (Pronk et al., 1996). Por outro lado, sob condições anaeróbicas, as leveduras são incapazes de sintetizar, por via *de novo*, alguns componentes celulares, como ácidos graxos insaturados e esteróis, pois algumas reações dependem de oxigênio e de intermediários produzidos em etapas da respiração aeróbica sobretudo do CAT (Dashko et al., 2014). Por outro lado, uma das espécies mais exploradas como respiro-fermentativa é *Kluyveromyces lactis*, levedura capaz de crescer manter o metabolismo respiratório e fermentativo simultaneamente, capazes de produzir etanol a 0,83 g/L em experimentos de pulso de glicose em aerobiose (Kiers, 1988).

Dentre as características que consolidam *Saccharomyces cerevisiae* como o microrganismo mais utilizado em processos fermentativos, estão a sua capacidade de produzir grandes quantidades de etanol sob condições aeróbias e sua elevada tolerância a esse álcool e à concentrações elevadas de açúcares no meio, que representam condições de estresse osmótico (Parapouli, 2020). Em contraste, algumas leveduras não apresentam a mesma robustez frente aos estresses gerados em processos fermentativos industriais. Em *C. albicans*, por exemplo, uma das respostas ao estresse osmótico envolve o aumento da expressão de genes relacionados à síntese de glicerol e trealose (Alvarez-Peral, 2002; Rodaki, 2009). Esses compostos atuam como solutos compatíveis, equilibrando o gradiente osmótico entre o citosol e o meio externo (Brown, 1978), além de exercer funções adicionais, como a regeneração de cofatores reduzidos na glicólise (Nordström, 1966). O metabolismo de glicerol em leveduras se inicia com a fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato pela hexocinase, onde segue, pela via glicolítica, até dihidroxicetona-fosfato (Scanes et al., 1998). Existe uma interconversão entre esse composto e o gliceraldeído-3-fosfato pela triose fosfato isomerase, enzima com maior afinidade pela fosfato de dihidroxicetona, o que leva a uma maior presença de gliceraldeído-3-fosfato que segue na via glicolítica, e posteriormente na via fermentativa (Scanes et al., 1998). As moléculas de dihidroxicetona-fosfato restantes são convertidas a glicerol-3-fosfato em uma reação reversível catalisada pela glicerol-3-fosfato desidrogenase e, por fim, glicerol é formado através da glicerol cinase (Albertyn, Van Tonder & Prior, 1992). Segundo Rodaki (2009), em meios de cultura suplementados com 1% de glicose foi observado aumento da expressão de genes envolvidos na síntese de trealose, em comparação ao controle, o que evidencia a sensibilidade de *C. albicans* a concentrações mais elevadas de glicose. Essa resposta está associada a uma maior resistência a outros tipos de estresse, como o oxidativo, e a antifúngicos. Em *Nakaseomyces glabrata* (previamente *C. glabrata*) e *C. parapsilosis*, altas concentrações desse açúcar resultam, respectivamente, em menor e maior formação de biofilme, o que evidencia a diversidade de respostas de espécies do gênero frente ao estresse osmótico (Pereira, 2015; Ng, 2016). No que diz respeito à tolerância ao etanol, *C. albicans*, uma levedura capaz de fermentar glicose a etanol (Casey & Ingledew, 1986; Juroszek et al., 1987), é inibida em concentrações próximas a 5% (Zeuthen, 1988), enquanto *S. cerevisiae* pode suportar valores próximos a 21% (Casey & Ingledew, 1986).

A família das oxidorreduções, um grupo de enzimas responsáveis por mediar reações redox, é encontrada em praticamente todos os domínios da vida e participa de processos biológicos e ecológicos complexos (Ekeoma, 2023). Dentre essas proteínas, as álcool

desidrogenases (E.C. 1.1.1.1) se destacam como enzimas frequentemente presentes em procariotos e eucariotos, responsáveis por reduzir NADH ou NADPH ao catalisar a interconversão entre álcoois, aldeídos e cetonas (Escobosa et al., 2011). Além de ocuparem papel importante na manutenção do equilíbrio redox e na recuperação de transportadores de elétrons reduzidos, os compostos produzidos nessas reações possuem função ecológica relevante nos nichos ocupados pelas espécies (Piškur, 2006).

As álcool desidrogenases podem ser divididas em três grupos principais: as de cadeia média, as de cadeia curta e as dependentes de ferro (Reid et al., 1994). Grande parte dos organismos apresenta diversas ADHs com funções biológicas que dificilmente podem ser distinguidas (Ismaiel et al., 1993). Dentre elas, as de cadeia média são as mais estudadas (Brändén et al., 1975; Yokoyama et al., 1990; Sun & Plapp, 1992). Essas enzimas apresentam íons de zinco em seu sítio ativo, essenciais para estabilidade estrutural e catálise, e podem assumir duas conformações principais: diméricas, comuns em plantas superiores e mamíferos, ou tetraméricas, mais abundantes em bactérias e leveduras (Korkhin et al., 1998).

Um exemplo clássico da importância fisiológica dessas enzimas pode ser observado em *Saccharomyces cerevisiae*, onde diferentes cópias de ADHs estão diretamente relacionadas ao metabolismo fermentativo e, conseqüentemente, ao fenótipo Crabtree-positivo, o que as configura como bons alvos de estudo para o fenótipo. Em *S. cerevisiae* foram identificados três genes de ADHs com funções bem caracterizadas: ADH I, expressa na presença de glicose e responsável pela redução de acetaldeído a etanol (Denis et al., 1983); a ADH II, expressa após o consumo de glicose no meio, agindo na oxidação de etanol como fonte de carbono e energia (Ciriacy, 1975); e, por fim, a ADH III, que atua na mitocôndria, catalisando a conversão de acetaldeído a etanol e contribuindo para o balanço redox mitocondrial em condições anaeróbias (Bakker, 2000). De forma semelhante, em *C. maltosa* foram descritos três genes que codificam álcool desidrogenases: *Cmadh1* e *Cmadh2a*, com funções análogas às ADHs I e II de *S. cerevisiae*, respectivamente, e *Cmadh2b*, cuja função é pouco estudada (Yuping et al., 2010). Em algumas leveduras Crabtree-negativas, como *Yarrowia lipolytica*, as álcool desidrogenases são utilizadas exclusivamente para o consumo oxidativo de etanol, uma vez que não catalisam a produção de etanol, mesmo em anaerobiose (Gatter, 2016).

Outra enzima imprescindível para o metabolismo fermentativo é a piruvato descarboxilase (EC 4.1.1.1). Essa enzima é responsável pela descarboxilação não oxidativa do

piruvato a acetaldeído e CO₂, etapa que precede a redução do acetaldeído a etanol ou a ácido acético pela álcool desidrogenase ou pela acetaldeído desidrogenase, respectivamente. A piruvato descarboxilase é dependente de tiamina pirofosfato (TPP) como cofator, o que leva à formação de um intermediário denominado acetaldeído ativo (Flickweert, 1996). Em *S. cerevisiae*, foram identificados três genes estruturais que codificam piruvato descarboxilases: *ScPDC1*, *ScPDC5* e *ScPDC6*. Enquanto PDC1 e PDC5 são essenciais para o consumo de glicose, PDC6 parece estar relacionado ao metabolismo de açúcares não fermentáveis (Hohmann, 1991). Em um contexto industrial, o aumento de expressão dos genes relacionados à piruvato descarboxilase está relacionado à produção de R-fenilacetilcarbinol (R-PAC), precursor quiral da síntese química de epinefrina e pseudoefedrina (Chen, 2005). No gênero *Candida*, a quantidade de genes estruturais que codificam piruvato descarboxilases varia de acordo com a espécie. *N. glabrata* apresenta duas cópias *CgPDC1* e *CgPDC5* de genes para a PDC (Iosue, 2023) e, em *C. albicans* foi identificado, por homologia, apenas um gene para a PDC, *CaPDC1* (Braun, 2005). Além disso, em trabalhos não publicados, as sequências de aminoácidos de genes relativos à álcool desidrogenase e piruvato descarboxilase, provenientes de diversas espécies do Reino Fungi, foram obtidas do UniProt (UniProt, 2025) e usadas na construção de perfis de HMM (*Hidden Markov Model*) pelo hmmer (Finn et al., 2011). Esses modelos foram usados para varrer o proteoma previsto de *C. maltosa* UFV-1 a fim de se identificarem quais são os genes, bem como suas cópias, relacionados a essas enzimas. Foram identificados 4 possíveis genes correspondentes a PDC e 10 genes correspondentes a ADH.

2.3. Efeito Crabtree

Descrito em 1929, o Efeito Crabtree foi, primeiramente, observado ao se estudar o metabolismo de células tumorais, que produzem lactato na presença de oxigênio (Crabtree, 1929), sendo que ficou posteriormente conhecido como efeito Warburg. Apenas em 1948 foi constatado que o metabolismo de glicose em *S. cerevisiae*, mesmo em aerobiose, se dava por fermentação alcóolica (Swanson & Clifton, 1948) e, a partir desse momento, esse conceito passou a ser utilizado na microbiologia. Por muitos anos, o Efeito Pasteur, inibição da via fermentativa pela respiração aeróbia, foi central nos estudos fisiológicos de microrganismos (Slonimsky, 1956). Assim, com os estudos em *S. cerevisiae*, o Efeito Crabtree também passou a ser conhecido como “contra-efeito Pasteur”, uma vez que podem ser vistos como contrários.

Nesse contexto, as leveduras são classificadas como Crabtree-positivas, caso sejam capazes de fermentar na presença de oxigênio; respiro-fermentativas, caso usem ambas as vias fermentativas e oxidativa em aerobiose, a depender da concentração de substrato; ou Crabtree-negativas, que só usam a via oxidativa na presença de oxigênio (Pffeifer & Morley, 2014; Hanegraaf et al., 2000). Outro metabólito associado ao metabolismo fermentativo é o acetato, formado a partir do acetaldeído na reação catalisada pela acetaldeído desidrogenase, na qual ocorre a sua conversão em ácido acético (Papapedritis, 2016), o que pode ser usado como indicador de aumento do fluxo pelas vias fermentativas.

O Efeito Crabtree pode ser simplificado como a “inibição da respiração por glicose” (Sussman & Erecínska, 1980). Em leveduras que apresentam esse fenótipo, sob certas concentrações de glicose, que variam de acordo com a espécie, observa-se um intenso fluxo glicolítico, o que resulta em altas concentrações de piruvato, superiores à capacidade de ação da piruvato desidrogenase (Otterstedt, 2004). Assim, há o redirecionamento do piruvato para a via fermentativa, na qual é descarboxilado pela PDC a acetaldeído e subsequentemente reduzido a etanol pela ADH (Malina et al., 2021). Esse uso preferencial de vias metabólicas menos eficientes em termos de rendimento energético, mas que permitem altas taxas de crescimento, é denominado metabolismo *overflow* (Molenaar et al., 2009). Segundo Pfeiffer et al. (2001), o aumento do fluxo por essas vias, apesar do saldo energético reduzido, é mantido devido a um balanço entre a energia obtida e o custo de manutenção da maquinaria enzimática necessária. Enquanto a fermentação depende de poucas enzimas citosólicas (como PDC e ADH), a respiração aeróbia exige a síntese de um conjunto muito maior de proteínas, incluindo as do CAT e da cadeia transportadora de elétrons. Como o *pool* proteico celular é limitado, em condições de crescimento rápido, a fermentação representa uma estratégia mais econômica em termos de alocação de recursos celulares (Malina et al., 2021; Nilsson & Nielsen, 2016). Diversos estudos de modelagem metabólica confirmam que, em ambientes ricos em glicose, o metabolismo *overflow* pode ser mais vantajoso que o oxidativo, pois maximiza a taxa de produção de ATP por proteína investida (Chen & Nielsen, 2019; Molenaar et al., 2009; Sánchez et al., 2017).

O efeito Crabtree em leveduras pode ser classificado em duas modalidades: *short-term* e *long-term*, que resultam em um mesmo fenótipo, porém mediados por mecanismos distintos (Hagman et al., 2014). O Efeito Crabtree *short-term* consiste na rápida mudança do metabolismo oxidativo para o fermentativo, em condições aeróbias, após a adição de grandes quantidades de glicose a leveduras cultivadas em limitação nutricional (Pronk et al., 1996).

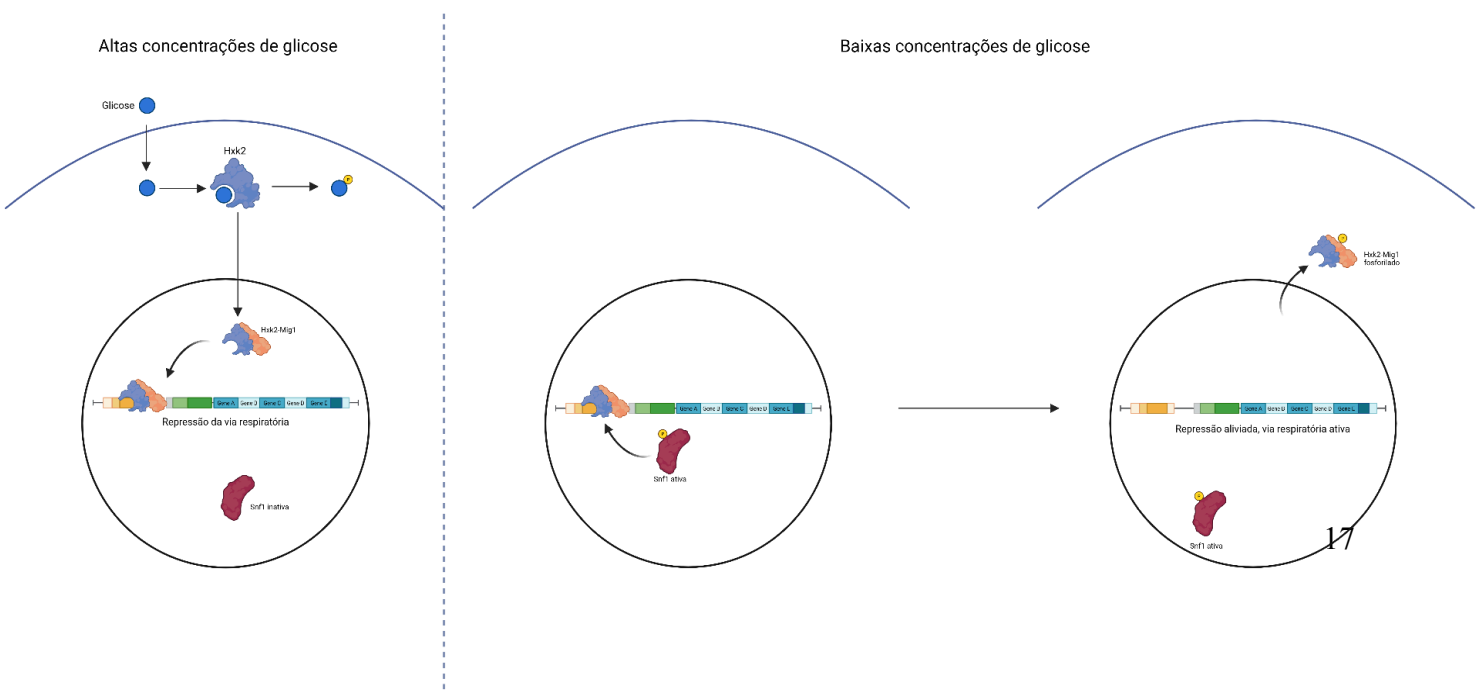
Estudos com *Saccharomyces uvarum* mostraram que esse é um efeito agudo, decorrente da regulação enzimática e do metabolismo *overflow* frente à limitada capacidade respiratória celular, e não de reduções da função mitocondrial (Petrik et al., 1983). Além disso, o acúmulo de intermediários da via glicolítica, como hexoses-fosfato, exerce papel central na resposta rápida à alta disponibilidade de glicose (Rosas Lemus et al., 2018). Por outro lado, o Efeito Crabtree *long-term* é observado em cultivos contínuos sob quimiostato, quando taxas crescentes de diluição levam a uma transição progressiva do metabolismo oxidativo para o fermentativo. Esse processo reflete adaptações mais lentas, evidenciadas pela diminuição da quantidade de citocromos mitocondriais e pela consequente redução da atividade respiratória (Petrik et al., 1983). Os mecanismos moleculares que sustentam o Efeito Crabtree ainda não são totalmente compreendidos (Martínez-Ortiz, 2019), mas há evidências de que a regulação da captação e do fluxo de glicose desempenha papel central. Essa regulação ocorre, em parte, por meio do controle transcricional dos transportadores de hexose, modulados por proteínas sinalizadoras como a quinase Snf1 (Martínez-Ortiz, 2019), sendo apontada como um dos principais mecanismos envolvidos no fenótipo (Huberts, Niebel & Heinemann, 2012). Em *S. cerevisiae*, conforme a Figura 1, a repressão das vias oxidativas depende de três elementos centrais: a hexocinase *Hxk2*, a cinase Snf1 e a proteína repressora Mig1. *Hxk2* é uma enzima com duas ações catalíticas, uma vez que age como enzima da via glicolítica ao fosforilar glicose a glicose-6-fosfato e como fator de transcrição no núcleo, ao formar o complexo *Hxk2-Mig1* (Klein et al., 1998). Em presença de glicose, tal complexo age como repressor dos genes da respiração e, portanto, tem um papel central no Efeito Crabtree. Em baixas concentrações de açúcar, o resíduo 210 de treonina no sítio catalítico da proteína Snf1 é fosforilado por uma cinase (*Sak1*, *Tos3* ou *Elm*) e a proteína se torna uma cinase ativa, que altera o estado de fosforilação de Mig1 e reduz sua afinidade pelo DNA, o que alivia a repressão dos genes e reativa a via oxidativa (Vega et al., 2016).

Sob um viés evolutivo, espécies Crabtree-positivas provavelmente surgiram em consonância com as angiospermas, plantas que apresentam flores e frutos, microambientes ricos em açúcares (Piškur, 2006). Essa hipótese é reforçada pelo fato de que o evento de Duplicação Completa do Genoma (*Whole Genome Duplication* – WGD), que aumentou a capacidade de captação de glicose em leveduras pela duplicação de transportadores (Liti & Louis, 2005; Merico et al., 2007), coincide com o período de diversificação das angiospermas (Wing & Boucher, 1998). Além disso, a duplicação da ADH em duas enzimas, *Adh1* e *Adh2*, também é vista como um marco importante na evolução do Efeito Crabtree.

Nesse contexto, a hipótese do comportamento “*make-accumulate-consume*” (MAC) propõe que esse fenótipo foi essencial para o aumento da competitividade de espécies Crabtree-positivas: em ambientes ricos em açúcar, o metabolismo fermentativo permite um consumo mais rápido de glicose do que a via oxidativa, uma vez que não é limitado pelo elevado custo de síntese da maquinaria proteica; além disso, essas espécies usam sua resistência ao etanol produzido e sua capacidade de oxidá-lo posteriormente para se manterem no ambiente (Piškur, 2006).

Outra teoria sobre o surgimento de leveduras Crabtree-positivas se baseia no *trade-off* entre rendimento e taxa de produção de ATP (*rate-yield trade-off*) (RYT) (Pfeiffer et al., 2001). Segundo essa hipótese, a produção de ATP pode ser lenta, mas eficiente, como na respiração aeróbia, ou rápida, mas menos eficiente, como na fermentação. Nesse contexto, em ambientes sujeitos a variações, taxas mais rápidas de produção de ATP, ainda que menos rentáveis, tenderiam a ser selecionadas. Essas teorias destacam aspectos distintos do Efeito Crabtree, a toxicidade do etanol e a velocidade de produção de ATP, e, embora não haja consenso, é possível que ambas tenham contribuído de forma complementar para a evolução desse fenótipo.

Figura 1 - Efeito Crabtree em *S. cerevisiae*. A figura representa o mecanismo molecular de repressão catabólica envolvido na inibição da via respiratória por glicose em *S. cerevisiae*.



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o metabolismo fermentativo em *C. maltosa* UFV-1.

3.2. Objetivos específicos

- Observar o crescimento de *C. maltosa* UFV-1 em meio mínimo com glicose;
- Analisar o consumo de glicose e a produção de etanol por *C. maltosa* UFV-1 em biorreator;
- Avaliar se pulsos de glicose promovem o efeito Crabtree *short-term* em *C. maltosa* UFV-1;
- Calcular parâmetros fermentativos para *C. maltosa* UFV-1 antes e após o pulso de glicose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Manutenção e ativação das culturas

A levedura *Candida maltosa* UFV-1 foi mantida em ultrafreezer a -80 °C em meio composto por extrato de levedura 0,5% (m/v), peptona 0,5% (m/v), e glicerol 50% (v/v). A cultura também foi mantida em meio YPD ágar, composto por extrato de levedura 1% (m/v), peptona 2% (m/v), D-glicose 2% (m/v) e ágar 2% (m/v).

4.2. Meios e condições de cultivo

Os meios de cultura usados nos experimentos foram: YPD – extrato de levedura 0,5% (m/v), peptona 2% (m/v) e D-glicose 2% (m/v) e *Yeast Nitrogen Base* (YNB) [0,67% (m/v)] adicionado a D-glicose 2% (m/v). Para os cultivos de *C. maltosa* UFV-1, a cultura foi ativada em 100 mL do meio usado para os cultivos em frascos Erlenmeyer de 250 mL e mantidos em shaker a 30 °C e 200 rpm.

4.3. Cultivo em biorreator

Os cultivos foram realizados em biorreatores de bancada de 1.3 L (BioFlo/CelliGen 115, Eppendorf, Alemanha) em meio YNB suplementado com cloranfenicol (200 mg/L). Como condições de cultivo, foram mantidas as condições operacionais de 31 °C, 400 rpm e antiespumante em concentração final de 400 µL/L, sob aeração a fim de se manter um

nível de oxigênio dissolvido acima de 30%. O inóculo foi ajustado para densidade óptica à 600 nm (DO_{600nm}) de 0,2. Nas primeiras dez horas de cultivo, foram coletadas amostras para análise de DO_{600nm} e quantificação de açúcares, etanol, glicerol e citrato por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além disso, também foram coletadas amostras após 24, 48, 72 e 96 h de cultivo. Para avaliar o metabolismo fermentativo, os cultivos foram realizados em biorreatores de bancada sob as mesmas condições descritas com alteração do volume de trabalho para 600 mL. Após 12 h de cultivo, foi adicionada de solução de D-glicose a 720 g/L, de forma que a concentração de açúcar no reator fosse ajustada para, aproximadamente, 120 g/L. Foram coletadas amostras para análise de DO_{600nm} e quantificação de açúcares, etanol, glicerol e citrato em HPLC no momento do inóculo e após 12; 12,5; 13; 14; 15; 16; 17, 18, 19, 20, e 36 h de cultivo. Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

4.4. Quantificação de biomassa por gravimetria

A equação que correlaciona DO_{600nm} e massa seca de *C. maltosa* UFV-1 nas condições de cultivo em biorreator descritas foi construída por gravimetria. Primeiramente, tubos do tipo Falcon foram secos em estufa até que obteve massa constante e pesados em balança de precisão. Em seguida, após atingir-se a fase de crescimento exponencial, 100 mL do cultivo em meio YNB-Glicose [2% (m/v)] foram centrifugados a 4.000 g por 15 min; a biomassa úmida foi congelada e liofilizada até se obter peso constante. A biomassa seca foi pesada em balança de precisão e ressuspensa em solução salina [0,85% (m/v)] estéril e usada em dez diluições seriadas. O valor de DO_{600nm} para cada diluição foi obtido e os valores foram correlacionados.

4.5. Quantificação de metabólitos extracelulares e substrato por CLAE

As concentrações de glicose, etanol e citrato foram determinadas por CLAE – LC-20AT (Shimadzu, Japão) – acoplada ao detector de índice de refração RID-20A (Shimadzu, Japão), bem como a uma coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (Coluna 300 x 7.8 mm, 9 μ m, Bio-Rad, Munique, Alemanha). A fase móvel utilizada foi ácido sulfúrico 5 mM, em vazão de 0,7 mL/min à 45 °C. As concentrações foram calculadas com base em padrões externos.

4.6. Parâmetros de crescimento

A velocidade específica de crescimento (μ) será determinada pelo coeficiente angular da regressão exponencial do gráfico $\ln(X)$ versus tempo (h). O rendimento etanol/glicose máximo teórico (θ) foi calculado com base em estequiometria, considerando-se que um mol de glicose (180 g) é totalmente convertido em dois mols de etanol (92,14 g). Baseando-se nas concentrações de substrato e metabólitos, foram calculados os seguintes parâmetros fermentativos:

$$Y_{E/X} = (E_F - E_I) / (X_F - X_I) \text{ (Equação 1)}$$

$$Y_{E/G} = (E_F - E_I) / (G_I - G_F) \text{ (Equação 2)}$$

$$Y_{X/G} = (X_F - X_I) / (G_I - G_F) \text{ (Equação 3)}$$

$$\text{Eficiência: } Y_{E/G} / \theta \text{ (Equação 4)}$$

Sendo que X_I = concentração inicial da biomassa (mg/mL); X_F = concentração final da biomassa (mg/mL); E_I = concentração inicial de etanol (g/L); E_F = concentração final de etanol (g/L); G_I = concentração inicial de glicose (g/L); G_F = concentração final de glicose (g/L); μ = velocidade específica de crescimento; θ = rendimento etanol/glicose máximo teórico. As equações representam, respectivamente, o rendimento etanol/biomassa (Equação 1); rendimento etanol/glicose (Equação 2); rendimento biomassa/glicose (Equação 3); eficiência de conversão (equação 4).

5. RESULTADOS

5.1. Cultivos em biorreator

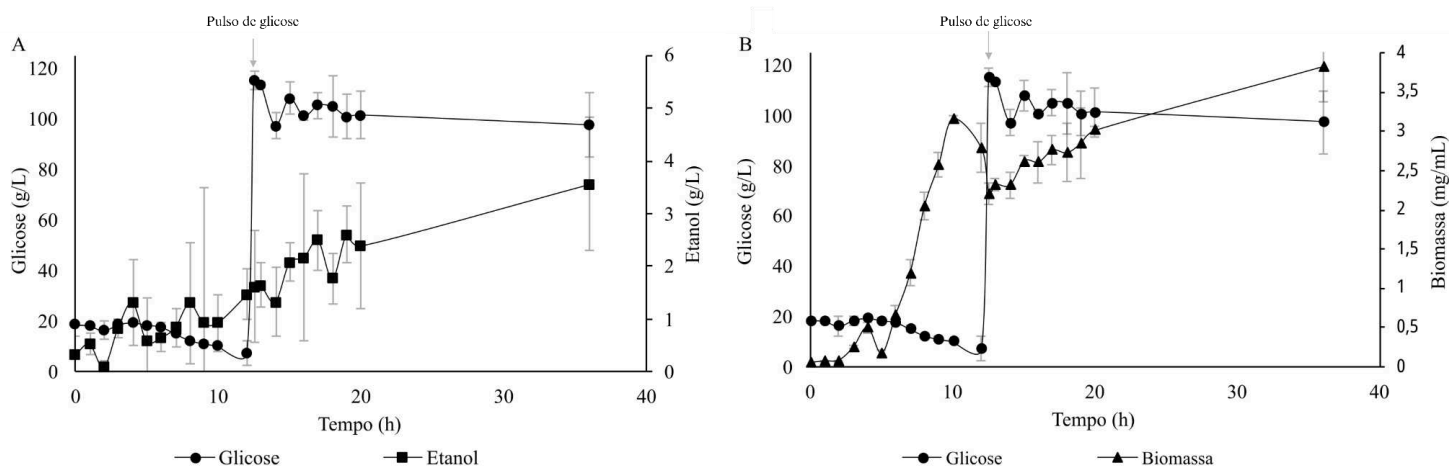
Os cultivos foram realizados em duplicata e os resultados de densidade óptica 600 nm foram representados em uma curva de crescimento. No cultivo inicial, foi observada uma fase lag curta, de aproximadamente duas horas, e uma taxa de crescimento específico média (μ) de 0,5445 h⁻¹. A DO_{600nm} final, medida após 96 h de cultivo, foi de 12,8850, que corresponde a uma biomassa de 4.703 g/L. Após o pulso, observou-se um crescimento lento após ajuste da concentração de glicose para, aproximadamente, 120 g/L, com taxa de crescimento específico média de (μ) de 0,0282 e uma DO_{600nm} de 10,8945 após 36 h de cultivo, com biomassa de 3,833 g/L (Figura 2-B).

5.2. Análise de metabólitos

As concentrações de glicose, etanol, citrato e glicerol relativas a cada um dos pontos coletados no experimento para avaliação do metabolismo fermentativo foram determinadas

por CLAE. Após o ajuste da concentração de glicose no meio para 120 g/L, houve aumento nas concentrações dos metabólitos analisados, com valores finais de etanol (3,55 g/L) (Figura 2-A), citrato (0,70 g/L) e glicerol (0,73 g/L) (Figura 3) superiores aos analisados no momento que precede o pulso de açúcar (0,93 g/L de etanol; 0,07 g/L de citrato e 0,11 g/L de glicerol). Os parâmetros fermentativos analisados foram representados na Tabela 1.

Figura 2 - Concentração de glicose, biomassa e etanol nos cultivos em biorreator. 2-A) As concentrações de glicose estão representadas no eixo Y à esquerda e de etanol no eixo Y à direita, enquanto o eixo X representa o tempo do cultivo em horas. O momento do pulso de glicose é representado por uma linha tracejada e seta às 12 horas de cultivo. 2-B) As concentrações de glicose estão representadas no eixo Y à esquerda e de biomassa no eixo Y à direita, enquanto o eixo X representa o tempo do cultivo em horas. O momento do pulso de glicose é representado por uma linha tracejada e seta às 12 horas de cultivo. Os desvios-padrão de cada leitura são representados por barras



de erro.

Figura 3 - Valores de etanol, citrato e glicerol após o pulso. A concentração de etanol, citrato e glicerol são representados por símbolos diferentes no gráfico. O eixo Y corresponde aos valores de concentração (g/L), enquanto o eixo X corresponde ao tempo (h). O gráfico representa apenas a variação dos metabólitos após o pulso de glicose, enquanto o valor do ponto de 12 h corresponde à

concentração imediatamente antes do aumento de glicose. Os desvios-padrão de cada leitura são representados por barras de erro.

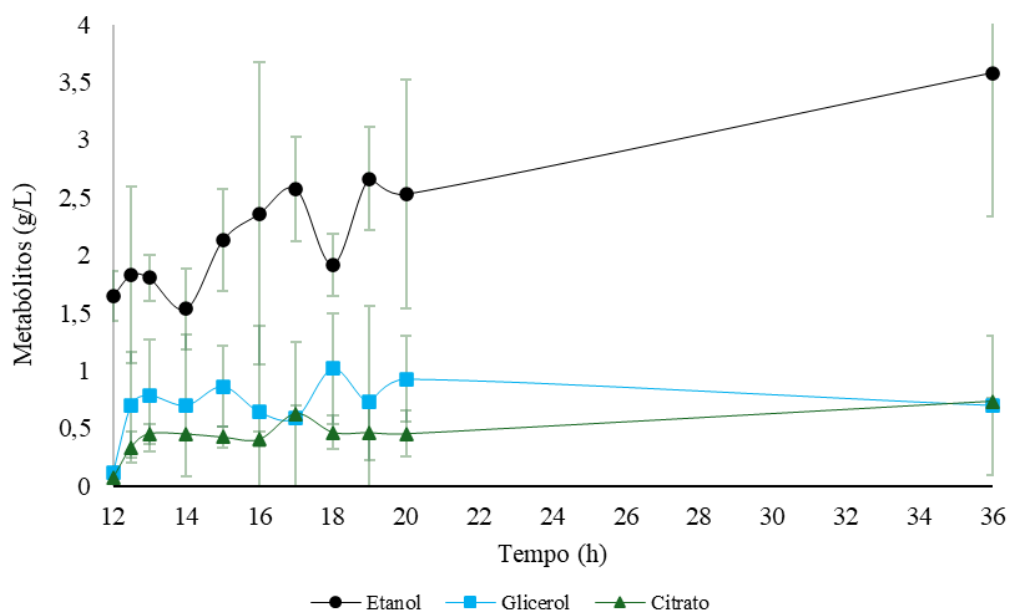


Tabela 1 - Valores médios de parâmetros de crescimento analisados. Os valores médios de cada parâmetro foram analisados em amostras colhidas antes e após o pulso de glicose no reator. Os valores de desvio-padrão são representados entre parênteses.

	Antes do pulso (0 a 12 h)	Após o pulso (12,5 a 36 h)
μ (h^{-1})	0,54 ($\pm 0,019021$)	0,03 ($\pm 0,0045$)
Título de etanol (g/L)	0,93 ($\pm 0,5374$)	3,55 ($\pm 0,6028$)
$Y_{E/X}$ ($\text{g E} \cdot \text{g}^{-1} \text{X}$)	0,459 ($\pm 0,2583$)	1,19 ($\pm 0,34$)
$Y_{E/S}$ ($\text{g E} \cdot \text{g}^{-1} \text{S}$)	0,087 ($\pm 0,0643$)	0,10 ($\pm 0,0341$)
Eficiência (%)	17 ($\pm 0,013$)	19,6 ($\pm 0,0669$)
$Y_{X/S}$ ($\text{g X} \cdot \text{g}^{-1} \text{S}$)	0,24 ($\pm 0,038$)	0,0914 ($\pm 0,016$)

6. DISCUSSÃO

A velocidade específica de crescimento ($\mu = 0,54 \text{ h}^{-1}$) apresentada por *C. maltosa* é similar aos valores de μ descritos em outros trabalhos nos quais diferentes linhagens de *C.*

maltosa foram cultivadas sob elevada disponibilidade de oxigênio. Segundo Mauersberger (1980), linhagens de *C. maltosa* atingiram velocidades específicas de crescimento variando de 0,55 a 0,60 h⁻¹ sob aerobiose e com glicose como única fonte de carbono e energia. De forma semelhante, *N. glabrata* apresenta μ de aproximadamente 0,6 h⁻¹ em glicose, quando cultivada a 37 °C (Ng, 2015). Por outro lado, a μ apresentada por *C. albicans* (0,44 h⁻¹) a 30 °C foi inferior aos valores supracitados para outras espécies do gênero (Rozpedowska et al., 2011).

Como o pulso de glicose foi aplicado após 12 h de cultivo, quando a cultura se encontrava em fase de desaceleração, é possível que os nutrientes essenciais ao crescimento microbiano, como nitrogênio, fósforo e elementos traços, estivessem em concentrações muito baixas para manter uma alta velocidade específica de crescimento. Isto indica que o estresse nutricional também pode ter contribuído para o crescimento mais baixo nessa condição. A mudança no crescimento foi acompanhada por uma alteração na produção de metabólitos, como etanol, ácido cítrico e glicerol. A produção de etanol aumentou após o pulso de glicose, atingindo 3,55 g/L, superior à concentração de 0,93 g/L obtida antes do pulso. Essa resposta à alta disponibilidade de glicose pode ter sido em função do aumento do fluxo fermentativo, mesmo em cultivo mantido em nível de oxigênio dissolvido acima de 30%, o que caracteriza um processo aeróbio, se aproximando do comportamento esperado para o efeito Crabtree *short-term*. No entanto, o baixo rendimento etanol/glicose ($YE/S = 0,10 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$), correspondendo a uma eficiência de conversão de 19,6%, indica que ocorreu o metabolismo respiro-fermentativo, mais propriamente do que o metabolismo fermentativo, típico de leveduras Crabtree-positivas. Em *S. cerevisiae*, espécie modelo para estudo de organismos Crabtree-positivos, observa-se um rendimento etanol/glicose de, em média 0,46 g·g⁻¹, o que representa 90% do rendimento teórico de conversão, ou seja, da quantidade de etanol produzida caso toda a glicose consumida fosse direcionada à via fermentativa (Liu, 2016). Nesse contexto, sugere-se que *C. maltosa* UFV-1 seja classificada como uma linhagem respiro-fermentativa, uma vez que a produção de etanol é menor do que a apresentada por leveduras Crabtree-positivas. Comparando-se esses resultados com dados da literatura, *C. maltosa* UFV-1 apresenta um metabolismo respiro-fermentativo mais próximo ao de *C. albicans*, que pode produzir etanol em aerobiose, mas o faz de forma menos eficiente que leveduras Crabtree-positivas. Segundo Rozpedowska (2011), *C. albicans* produz cerca de 0,09 g de etanol por grama de glicose sob aerobiose. Os resultados obtidos para *C. maltosa* UFV-1 parecem seguir padrão semelhante, já que a presença de etanol confirma a ativação da fermentação, mas os rendimentos reduzidos indicam que a via respiratória foi predominante.

Nesse sentido, *C. maltosa* UFV-1 não apresenta um fenótipo Crabtree-positivo clássico, mas se aproxima do comportamento descrito para leveduras respiro-fermentativas, nas quais a fermentação é fracamente ativada apenas em situações de excesso de glicose. Entretanto, vale ressaltar que não há consenso nem valores de parâmetros fermentativos que delimitam a separação entre espécies Crabtree-positivas, negativas ou respiro-fermentativas.

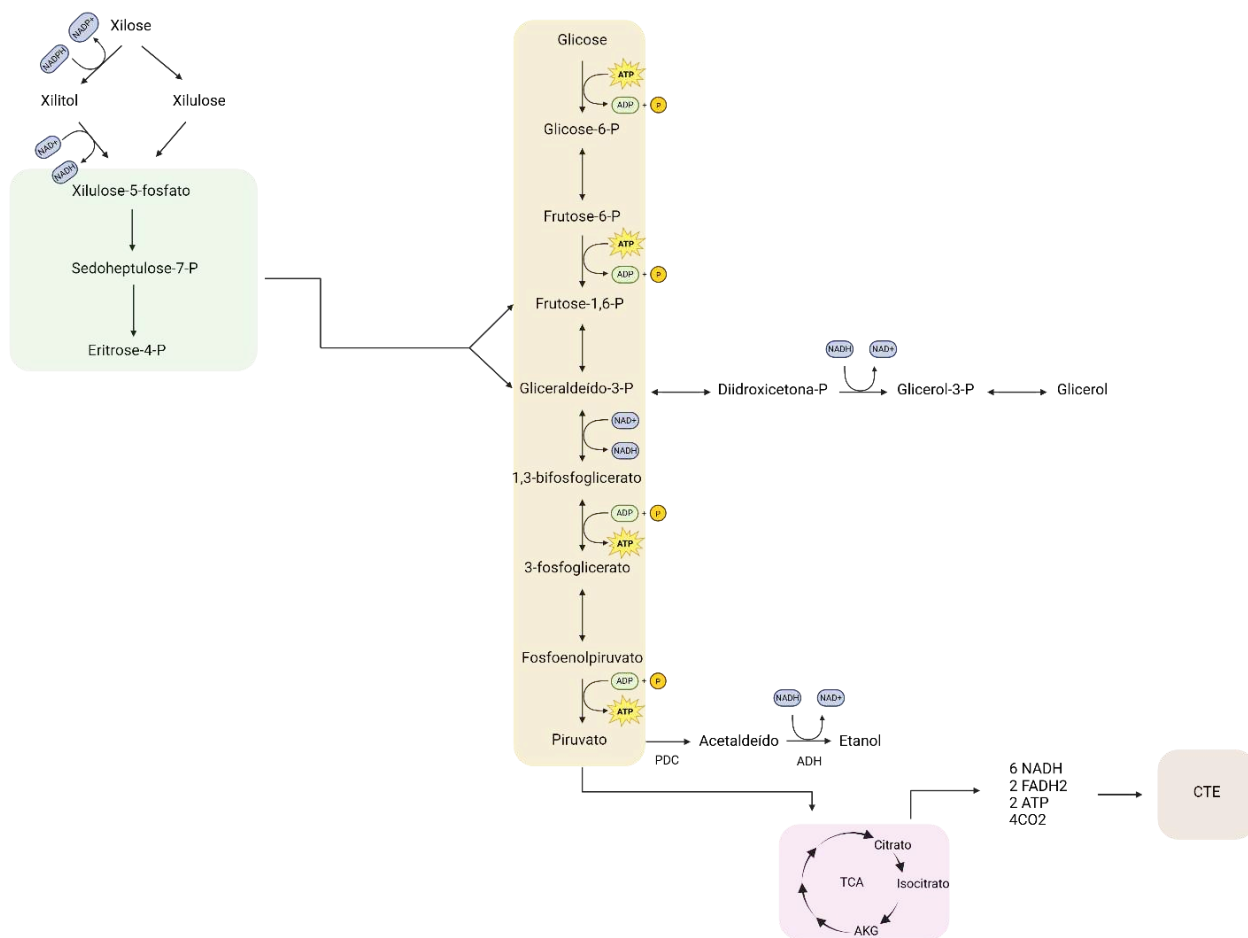
Um fator que pode ser limitante para a ativação da via fermentativa é a capacidade de transporte de glicose do meio extracelular para o citosol, primeira grande etapa do metabolismo. Em *S. cerevisiae*, levedura Crabtree-positiva, ocorreu o evento de Duplicação Completa do Genoma (WGD) e apresenta 20 genes de transportadores de hexose (HXT), o que propicia uma alta taxa de transporte de glicose e alto fluxo fermentativo (Rozpedowska, 2011). Em contrapartida, leveduras que se divergiram antes do WGD, como *C. albicans* e *Kluyveromyces lactis*, apresentam uma diversidade metabólica alta e são mais dependentes de oxigênio, apesar de apresentarem comportamento respiro-fermentativo. Todavia, existem algumas espécies pré-WGD com características semelhantes às pós-WGD, como *Torulaspora delbrueckii* e *T. globosa* (Merico, 2007). Como não se conhecem os transportadores de hexose de *C. maltosa* UFV-1, tampouco sua regulação, é possível que a taxa de transporte de glicose seja mais baixa, o que limitaria o fluxo fermentativo.

Após o pulso de glicose observou-se também o aumento da produção de glicerol, com valor inicial de 0,14 g/L e final 0,70 g/L. Além de agir como osmoprotetor em contexto intracelular, a síntese de glicerol consome poder redutor, haja vista que a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase catalisa a interconversão entre glicerol-3-fosfato e diidroxiacetona-fosfato com gasto de elétrons, o que gera coenzimas oxidadas como um dos produtos (Scanes, 1998) (Figura 4). O aumento na concentração de glicerol no meio de cultura, mesmo que moderado, indica, portanto, outra via de regeneração de NAD⁺, em excesso de açúcar.

Além da produção de etanol, também foi detectado aumento na concentração de citrato após o pulso de glicose (valores iniciais de 0,07 g/L e finais de 0,73 g/L). Tal aumento pode estar associado a uma perturbação no balanço entre a glicólise e o ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) em excesso de glicose. A produção simultânea de etanol e citrato após o pulso de glicose, indica uma alteração do fluxo no CAT. No entanto, os baixos valores de citrato excretado refletem, possivelmente, um desbalanceamento no ciclo. Em leveduras oleaginosas, como *C. maltosa*, elevadas razões C/N favorecem o acúmulo de citrato no

citósol, que posteriormente pode ser convertido em acetil-CoA para síntese de lipídios. Sob limitação de nitrogênio, a enzima AMP desaminase aumenta sua atividade e catalisa a conversão de AMP em IMP e NH₃, o que causa uma redução nos níveis de AMP. Entretanto, resultados recentes do nosso grupo de pesquisa ainda não-publicados, indicam que essa levedura, assim como outras espécies do subfilo Saccharomycotina, não apresenta a enzima ATP citrato-liase (ACL), que catalisa a quebra de citrato citosólico a acetil-CoA e oxaloacetato. Assim, o citrato acumulado não é usado na síntese lipídica e pode, portanto, ser excretado a fim de evitar o seu acúmulo intracelular.

Figura 4 - Simplificação das vias metabólicas centrais. A imagem representa pontos metabólicos essenciais à discussão, como a produção de etanol e de glicerol.



7. CONCLUSÃO

O aumento da concentração de glicose proporcionou possivelmente um aumento do fluxo pela via glicolítica e, conseqüentemente, aumento da produção de etanol. O aumento da produção de glicerol, corrobora o aumento do fluxo fermentativo. Como perspectivas futuras, espera-se identificar os genes que codificam as enzimas álcool desidrogenase e piruvato descarboxilase em *C. maltosa* UFV-1 e avaliar sua expressão em condições similares às conduzidas neste trabalho. Outro desdobramento do projeto é a avaliação do Efeito Crabtree *long-term*, pavimentando o caminho para estudos futuros com *C. maltosa* visando sua aplicação mais assertiva em biorrefinarias lignocelulósicas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTYN, Jacobus; VAN TONDER, André; PRIOR, Bernard A. Purification and characterization of glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**, v. 308, n. 2, p. 130-132, 1992.

BAKKER, Barbara M. et al. The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 17, p. 4730-4737, 2000.

BAUCH, J. et al. Verfahren zur Gewinnung von "fermosin" - Futterhefe aus Erdöldestillaten. **Chemische Technik**, v. 30, p. 284-287, 1978

BONGOMIN, F. et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases estimate precision. **Journal of Fungi MDPI AG**, 1 dez. 2017.

BRÄNDÉN, Carl-Ivar et al. 3 Alcohol dehydrogenases. In: **The enzymes. Academic Press**, 1975. p. 103-190.

BRAUN, Burkhard R. et al. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. **PLoS genetics**, v. 1, n. 1, p. e1, 2005.

BROWN, A. D. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms. **Advances in microbial physiology**, v. 17, p. 181-242, 1978.

CASEY, Gregory P.; INGLEDEW, WM Mike. Ethanol tolerance in yeasts. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 219-280, 1986.

CHÁVEZ-TINOCO, M.; GARCÍA-ORTEGA, L. F.; MANCERA, E. Genetic modification of *Candida maltosa*, a non-pathogenic CTG species, reveals EFG1 function. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 170, n. 3, 2024.

CHEN, Allen Kuan-Liang et al. pH shift enhancement of *Candida utilis* pyruvate decarboxylase production. **Biotechnology and bioengineering**, v. 92, n. 2, p. 183-188, 2005.

CHEN, Yu; NIELSEN, Jens. Energy metabolism controls phenotypes by protein efficiency and allocation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 35, p. 17592-17597, 2019.

CIRIACY, Michael. Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 138, n. 2, p. 157-164, 1975.

CRABTREE, Herbert Grace. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. **Biochemical journal**, v. 23, n. 3, p. 536, 1929.

DASHKO, Sofia et al. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?. **FEMS yeast research**, v. 14, n. 6, p. 826-832, 2014.

DE OLIVEIRA GONÇALVES, Felipe et al. Strategies to ensure fuel security in Brazil considering a forecast of ethanol production. **Biomass**, v. 3, n. 1, p. 1-17, 2023.

DE SMIDT, Olga; DU PREEZ, James C.; ALBERTYN, Jacobus. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 7, p. 967-978, 2008.

DELONG, J. Bradford. The shape of twentieth century economic history. 2000.

DENIS, Clyde L.; FERGUSON, J.; YOUNG, E. T. mRNA levels for the fermentative alcohol dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* decrease upon growth on a nonfermentable carbon source. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 2, p. 1165-1171, 1983.

DOS SANTOS, Leandro Vieira et al. Second-generation ethanol: the need is becoming a reality. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 40-57, 2016.

EKEOMA, Bernard Chukwumeka et al. Recent advances in the biocatalytic mitigation of emerging pollutants: a comprehensive review. **Journal of biotechnology**, v. 369, p. 14-34, 2023.

ESCOBOSA, Alma Rosa Corrales et al. *Fusarium oxysporum* Adh1 has dual fermentative and oxidative functions and is involved in fungal virulence in tomato plants. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 9, p. 886-895, 2011.

FINN, Robert D.; CLEMENTS, Jody; EDDY, Sean R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. **Nucleic acids research**, v. 39, n. suppl_2, p. W29-W37, 2011.

FLIKWEERT, Marcel T. et al. Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast*, v. 12, n. 3, p. 247-257, 1996.

GATTER, Michael et al. Three alcohol dehydrogenase genes and one acetyl-CoA synthetase gene are responsible for ethanol utilization in *Yarrowia lipolytica*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 95, p. 30-38, 2016.

GRADOVA, N. B.; KOVALSKY, Y. V. Production of fodder yeast cultures on media containing hydrocarbons (Russ). **Mikrobiologiya**, v. 47, p. 259-264, 1978.

HAGMAN, Arne; SÄLL, Torbjörn; PIŠKUR, Jure. Analysis of the yeast short-term Crabtree

effect and its origin. **The FEBS journal**, v. 281, n. 21, p. 4805-4814, 2014.

HANEGRAAF, P. P. F.; STOUTHAMER, A. H.; KOOIJMAN, S. A. L. M. A mathematical model for yeast respiro-fermentative physiology. **Yeast**, v. 16, n. 5, p. 423-437, 2000.

HOHMANN, STEFAN. Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 24, p. 7963-7969, 1991.

HUBERTS, Daphne HEW; NIEBEL, Bastian; HEINEMANN, Matthias. A flux-sensing mechanism could regulate the switch between respiration and fermentation. **FEMS yeast research**, v. 12, n. 2, p. 118-128, 2012.

IOSUE, Christine L. et al. Pyruvate decarboxylase and thiamine biosynthetic genes are regulated differently by Pdc2 in *S. cerevisiae* and *C. glabrata*. **Plos one**, v. 18, n. 6, p. e0286744, 2023.

ISMAIEL, Adan A. et al. Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 16, p. 5097-5105, 1993.

JACOBSEN, Mette D. et al. Specificity of the osmotic stress response in *Candida albicans* highlighted by quantitative proteomics. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 14492, 2018.

JUROSZEK, Jean-Regis; FEUILLAT, Michel; CHARPENTIER, Claudine. Effect of ethanol on the glucose-induced movements of protons across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. **Canadian journal of microbiology**, v. 33, n. 2, p. 93-97, 1987.

Kallberg Y Oppermann U Jornvall H Persson B (2002) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). **Eur J Biochem**269: 4409–4417.

KIERS, Janine et al. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. **Yeast**, v. 14, n. 5, p. 459-469, 1998.

KIRCHHERR, Julian; REIKE, Denise; HEKKERT, Marko. Conceptualizing the circular economy: An analysis of 114 definitions. **Resources, conservation and recycling**, v. 127, p. 221-232, 2017.

KITAMURA, H. et al. Chronic mastitis caused by *Candida maltosa* in a cow. **Veterinary pathology**, v. 27, n. 6, p. 465-466, 1990.

KLEIN, Christopher JL; OLSSON, Lisbeth; NIELSEN, Jens. Glucose control in

Saccharomyces cerevisiae: the role of Mig1 in metabolic functions. **Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 13-24, 1998.

KOK, L.; WURPEL, G.; TEN WOLDE, A. Unleashing the power of the circular economy. 2013.

KOMAGATA, KAZUO; NAKASE, TAKASHI; KATSUYA, NOBORU. Assimilation of hydrocarbons by yeasts I. Preliminary screening. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 313-321, 1964.

KORKHIN, Yakov et al. NADP-dependent bacterial alcohol dehydrogenases: crystal structure, cofactor-binding and cofactor specificity of the ADHs of Clostridium beijerinckii and Thermoanaerobacter brockii. **Journal of molecular biology**, v. 278, n. 5, p. 967-981, 1998.

KRASSOWSKI, T. et al. Evolutionary instability of CUG-Leu in the genetic code of budding yeasts. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

LAMBA, Harchitwan Kaur; KUMAR, Nived S.; DHIR, Sanjay. Circular economy and sustainable development: a review and research agenda. **International Journal of Productivity and Performance Management**, v. 73, n. 2, p. 497-522, 2024.

LEMUS, Monica Rosas et al. The role of glycolysis-derived hexose phosphates in the induction of the Crabtree effect. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 33, p. 12843-12854, 2018.

LIN, Yuping et al. The alcohol dehydrogenase system in the xylose-fermenting yeast Candida maltosa. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. e11752, 2010.

LITI, Gianni; LOUIS, Edward J. Yeast evolution and comparative genomics. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 59, n. 1, p. 135-153, 2005.

LIU, Zhi-Hua; CHEN, Hong-Zhang. Simultaneous saccharification and co-fermentation for improving the xylose utilization of steam exploded corn stover at high solid loading. **Bioresource technology**, v. 201, p. 15-26, 2016.

MALINA, Carl et al. Adaptations in metabolism and protein translation give rise to the Crabtree effect in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 51, p. e2112836118, 2021.

MARTINEZ-ORTIZ, Cecilia et al. SNF1 controls the glycolytic flux and mitochondrial respiration. **Yeast**, v. 36, n. 8, p. 487-494, 2019.

MAUERSBERGER, S. et al. The content of cytochrome P-450 in yeast cells growing on hexadecane (Russ). **Mikrobiologiya** 49: 571-577, 1980

MAUERSBERGER, S. et al. *Candida maltosa*. In: WOLF, K. (Ed.). *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag, 1996

MERICO, Annamaria et al. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **The FEBS journal**, v. 274, n. 4, p. 976-989, 2007.

MERICO, Annamaria et al. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **The FEBS journal**, v. 274, n. 4, p. 976-989, 2007.

MEYER, S. A. et al. Physiological and DNA Characterization of *Candida maltosa*, a Hydrocarbon-Utilizing Yeast Arch. **Microbiol Springer-Verlag**, 1975

MOLENAAR, Douwe et al. Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. **Molecular systems biology**, v. 5, n. 1, p. 323, 2009.

NAKASE, T. et al. A comparative study on two forms of *Candida tropicalis*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 349-363, 1972.

NESS, David. Sustainable urban infrastructure in China: Towards a Factor 10 improvement in resource productivity through integrated infrastructure systems. **The International Journal of Sustainable Development & World Ecology**, v. 15, n. 4, p. 288-301, 2008.

NG, Tzu Shan et al. Growth, biofilm formation, antifungal susceptibility and oxidative stress resistance of *Candida glabrata* are affected by different glucose concentrations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, p. 331-338, 2016.

NG, Tzu Shan et al. SNF3 as high affinity glucose sensor and its function in supporting the viability of *Candida glabrata* under glucose-limited environment. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1334, 2015.

NILSSON, A.; NIELSEN, J. Metabolic Trade-offs in Yeast are Caused by F1F0-ATP synthase. **Sci. Rep.** 6, 22264 [em linha]. 2016.

NORDSTRÖM, K. U. R. T. Yeast growth and glycerol formation. **Acta chemica scandinavica**, v. 20, n. 4, p. 1016-1025, 1966.

OHKUMA, Moriya et al. Evolutionary position of n-alkane-assimilating yeast *Candida maltosa* shown by nucleotide sequence of small-subunit ribosomal RNA gene. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 57, n. 10, p. 1793-1794, 1993.

OPULENTE, Dana A. et al. Genomic factors shape carbon and nitrogen metabolic niche breadth across Saccharomycotina yeasts. *Science*, v. 384, n. 6694, p. eadj4503, 2024.

OTTERSTEDT, Karin et al. Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO reports**, v. 5, n. 5, p. 532-537, 2004.

PAPAPETRIDIS, Ioannis et al. Improving ethanol yield in acetate-reducing *Saccharomyces cerevisiae* by cofactor engineering of 6-phosphogluconate dehydrogenase and deletion of ALD6. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 67, 2016.

PARAPOULI, Maria et al. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1, 2020.

PATEL, Alok et al. An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 434, 2020.

PEREIRA, Leonel et al. Influence of glucose concentration on the structure and quantity of biofilms formed by *Candida parapsilosis*. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 5, p. fov043, 2015.

PETRIK, Magdalena; KPPELI, Othmar; FIECHTER, Armin. An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short-and long-term regulation. **Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 43-49, 1983.

PFEIFFER, Thomas; MORLEY, Annabel. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 1, p. 17, 2014.

PFEIFFER, Thomas; SCHUSTER, Stefan; BONHOEFFER, Sebastian. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. **Science**, v. 292, n. 5516, p. 504-507, 2001.

PIŠKUR, Jure et al. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?. **TRENDS in Genetics**, v. 22, n. 4, p. 183-186, 2006.

PRONK, Jack T.; YDE STEENSMA, H.; VAN DIJKEN, Johannes P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 12, n. 16, p. 1607-1633, 1996.

RATLEDGE, C. R.; WYNN, J. The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms. In: **Advances in Applied Microbiology**, v. 51. Copyright 2002.

REID, Matthew F.; FEWSON, Charles A. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. **Critical reviews in microbiology**, v. 20, n. 1, p. 13-56, 1994.

- RIEGE, P. et al. Influence of oxygen and substrate supply on the metabolism of *Candida maltosa* during cultivation on n-alkanes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 101-107, 1989.
- RÖBER, B. Katabole Repression bei aerobem und O₂-limitiertem Wachstum—energetische und stoffliche Bilanz des Kohlenhydratmetabolismus bei Hefen. **Journal of basic microbiology**, v. 25, n. 9, p. 581-590, 1985.
- RÓBER, B.; REUTER, G. Biosynthese der Zellwand-Polysaccharide Mannan und Glucan als Spiegelbild unterschiedlicher Abbauwege der Glucose durch *Candida spec.* **H. Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie**, v. 19, n. 3, p. 187-194, 1979.
- RÖBER, B.; REUTER, G. REGULATION OF GLUCOPOLYSACCHARIDE BIOSYNTHESIS IN THE SEP YEAST *CANDIDA-MALTOSA-H* BY PRECURSOR PREPARATION. **ZEITSCHRIFT FÜR ALLGEMEINE MIKROBIOLOGIE**, v. 24, n. 3, p. 167-177, 1984.
- RODAKI, Alexandra et al. Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Molecular biology of the cell**, v. 20, n. 22, p. 4845-4855, 2009.
- ROZPEĐOWSKA, Elzbieta et al. *Candida albicans*—a pre-whole genome duplication yeast—is predominantly aerobic and a poor ethanol producer. **FEMS yeast research**, v. 11, n. 3, p. 285-291, 2011.
- SÁNCHEZ, Benjamín J. et al. Improving the phenotype predictions of a yeast genome-scale metabolic model by incorporating enzymatic constraints. **Molecular systems biology**, v. 13, n. 8, p. 935, 2017.
- SCANES, K. T.; HOHMANN, S.; PRIOR, B. A. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. 1998.
- SCHAUER, Frieder. Zur Physiologie des Kohlenwasserstoffabbaus in *Candida maltosa*. 1988. Tese de Doutorado.
- SILVA, J. et al. Detection of opportunistic yeast pathogens in hospitalized immunocompromised patients. 1990.
- SLONIMSKI, P. P. (1956). Adaptation respiratoire: développement du système hémoprotéique induit par l'oxygène. Proc. 3rd int. Congr. **Biochem.** p. 242.
- SOEDER, Daniel J. Fossil fuels and climate change. In: Fracking and the Environment: A scientific assessment of the environmental risks from hydraulic fracturing and fossil fuels.

Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 155-185.

STOLF, Rubismar; OLIVEIRA, Ana Paula Rodrigues de. The success of the Brazilian alcohol program (PROÁLCOOL)-a decade-by-decade brief history of ethanol in Brazil. **Engenharia Agrícola**, v. 40, n. 2, p. 243-248, 2020.

SUN, Hong-Wei; PLAPP, Bryce V. Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family. **Journal of Molecular Evolution**, v. 34, n. 6, p. 522-535, 1992.

SUSSMAN, Ilene; ERECIŃSKA, Maria; WILSON, David F. Regulation of cellular energy metabolism. The Crabtree effect. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 591, n. 2, p. 209-223, 1980.

SWANSON, Wilbur H.; CLIFTON, C. E. Growth and assimilation in cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 56, n. 1, p. 115-124, 1948.

THORPE, R. F.; RATLEDGE, C. Fatty acid distribution in triglycerides of yeasts grown on glucose or n-alkanes. **Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 151-158, 1972

UNICA Histórico de Produção e Moagem Por Produto, Dados de Produção. Available online: <https://observatoriodacana.com.br/> (accessed on 5 November 2025).

UniProt: the universal protein knowledgebase in 2025. **Nucleic acids research**, v. 53, n. D1, p. D609-D617, 2025.

UPADHYAY, Arvind et al. Exploring barriers and drivers to the implementation of circular economy practices in the mining industry. **Resources Policy**, v. 72, p. 102037, 2021.

VAN DIJKEN, Johannes P.; SCHEFFERS, W. Alexander. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology reviews**, v. 1, n. 3-4, p. 199-224, 1986.

VASCONCELOS, Bruno et al. Oleaginous yeasts for sustainable lipid production—from biodiesel to surf boards, a wide range of “green” applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 9, p. 3651-3667, 2019.

VEGA, Montserrat et al. Hexokinase 2 is an intracellular glucose sensor of yeast cells that maintains the structure and activity of Mig1 protein repressor complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 14, p. 7267-7285, 2016.

WING, Scott L.; BOUCHER, Lisa D. Ecological aspects of the Cretaceous flowering plant radiation. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 26, n. 1, p. 379-421, 1998.

YOKOYAMA, Shozo et al. Molecular evolution of the zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenase genes. **Molecular biology and evolution**, v. 7, n. 2, p. 143-154, 1990.

ZEUTHEN, Marie L. et al. Ethanol tolerance and the induction of stress proteins by ethanol in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 134, n. 5, p. 1375-1384, 1988.