**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Seleção de leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol

Marcus Venicius de Mello Lourenço

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2009**

Marcus Venicius de Mello Lourenço
Biólogo

Seleção de leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol

Orientador:
Prof. Dr. **LUIZ CARLOS BASSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Lourenço, Marcus Venicius de Mello

Seleção de leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol / Marcus Venicius de Mello
Lourenço. - - Piracicaba, 2009.

76 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Candida 2. Fermentação aeróbica 3. Leveduras - Isolamento e purificação 4. Sequência do DNA I. Título

CDD 660.62
L892s

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, pela oportunidade, confiança, e pelo privilegio de fazer parte da sua equipe de pesquisa.

Aos meus pais Advair Carlos Lourenço e Regina Lúcia de Mello Lourenço e ao meu irmão Mario Vitor de Mello Lourenço pelo apoio, educação, carinho e convivência quase sempre harmônica.

Aos meus avos Angelina Luma Lourenço, Antonio Lourenço (*in Memoriam*), Therezinha Aparecida Fernandes de Mello e Venicio Bruno de Mello - Zuzu (*in memoriam*)

Aos Prof. Dr. Luiz Humberto Gomes e Prof. Dra Kelia Maria Roncato Duarte pela amizade, paciência, oportunidade, incentivo, viagens e pelos ensinamentos.

Aos Dr. Fernando Dini Andreote pela paciência e colaboração em diversas etapas do desenvolvimento desse trabalho e Dr. Itamar Soares de Melo pela ajuda e gentileza concedidas na EMBRAPA meio ambiente.

Ao Prof Dr. Luiz Coutinho Hermam e Dra. Nirlei pela inestimável colaboração no sequenciamento das minhas amostras.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica do dep. de Ciências Biológicas da ESALQ: Luiz Lucatti (Cometa), Nara Bortolazo, Renata Cristofoleti, Stafania, Natalia Alexandrino, Thalita Peixoto Basso, Juliana Bueno da Silva pela amizade, ajuda durante esse período.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos do dep. de genética da ESALQ, Msc. Ana Paula Pallu, Msc. Maria Beatriz C. Rodrigues, Manuela Nóbrega, Msc. Michele Silva, Dra. Priscila Rosseto, Msc. Maria Carolina Quenice, Fernanda

Sebastianes, Fernanda Bernardes, Renata Assis, Msc. Andréa Bogas, Dr. Rodrigo Mendes, Msc. Marise Suzuki, Dr. Uira Belmonte, José Antonio da Silva (Zezo), Msc. Mariele Porto, Msc. Anderson Ferreira, Msc. Danice Mazzer Luvizotto, Prof. Dr. João Lucio de Azevedo, Prof. Dra. Aline Aparecida Pizzirane-Kleiner, Dr. Wellington Luiz de Araújo em especial aos amigos Ms. Laura de Castro Assumpção, Francisco Dini Andreote, Dr. Fernando Dini Andreote, Msc. Armando Dias Cavalcante, Msc. Cristiane Cipolla Fasanella Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava pela amizade, ajuda e convivência

Aos amigos do Laboratório de Genética de Leveduras do dep. de genética da ESALQ: Msc. Marina Gumieire Alves, Lia Matelli, Ana Maria Brancalion Giacomelli, Marcos Gorga, Prof. Dr. Gildenberg Amorim Leal Junior, Prof. Dr. Luiz Humberto Gomes, Prof. Dra. Keila Maria Roncato Duarte, Elisa Domingues, Felipe Gabriel Andrino, Rebeca Duarte Gomes, Sara Duarte Gomes, Ana Carolina Peroni Gomes pela ajuda, incentivos, passagens aéreas, viagens, churrascos, risadas e agradabilíssima convivência.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Bioquímica de plantas do dep. de genética da ESALQ: Dra. Priscila Lupino Gratão, Carolina, Daiane, Dr. Vanderlei Varisi, Paula e Gika.

Aos colegas do Laboratório de Açúcar e Alcool do dep. de agroindústria alimentos e nutrição da ESALQ: Prof. Dr. André Ricardo Alcarde, Silvino, Pedrinho, Bruno (portuga) e Paula Araujo pela convivência, amizade e risadas.

Aos meus grandes amigos de colégio Guilherme Giovanonni e família, Msc. Fernanda Bhürer Rizzato e família, Kelly Cristiane Galesi e família, por todos esses anos de amizade.

Aos meus grandes amigos de graduação: Fabiana Sinicato, Julio César Ciriaco de Camargo, André Ometo Belleza, Dra. Kamila Cristina Silva, Msc. Camila Cerboni Pinto, Msc. Ana Luiza Beraldo, Cristiane Fumagali, Daiane Nardini pela amizade, carinho, baladas, viagens, e agradável convivência.

A Ms. Carlos Ivan Aguiar-Vildoso, Dr. Fernando Dini Andreote, Msc. Marina Gumieire Alves, Prof. Dr. Luiz Humberto Gomes pela amizade, criticas construtivas, apoio nas analises estatísticas, disposição de sempre ajudar e pelas dicas na conclusão a dissertação.

Aos meus grandes amigos Dr. Rafael Tozadori, Dra. Ana Letica Bertolo Dr. Fernando Dini Andreote, Dr. Walter Fernando Bernardi pela grande amizade, jantares, cervejadas, viagens e convivência.

As grandes amizades construidas nesses dois anos, as codornas Msc.Cristiane Cipola Fasanela, Msc Laura de Castro Assumpção, Msc Júlia Ronzela Ottoni, Msc Lílian Beloti, Natalia Nardeli, pelas risadas, jogatinas, viagens e companhias.

A FERMENTEC pelo apoio financeiro

A CAPES pela bolsa concedida

Aos Professores Dr. Luiz Antonio Rochele e Dra. Adriane Palanchi pelas cartas de recomendação

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

OBRIGADO A TODOS!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 DESENVOLVIMENTO	15
2.1 Revisão de Literatura	15
2.1.1 Leveduras.....	15
2.1.2 Leveduras do gênero <i>candida</i>	16
2.1.3 Metabolismo de D-xilose em leveduras.....	18
2.1.4 Resíduos lignocelulosicos	20
2.1.5 Xilitol.....	22
2.1.6 Produção de xilitol por microrganismos.....	25
2.1.7 Identificação molecular.....	27
2.2 Material e métodos.....	31
2.2.1 Coleta de amostra da biomassa de torta de filtro	31
2.2.2. Isolamento e purificação das leveduras	31
2.2.3 Conservação das leveduras	32
2.2.4. Extração de DNA das colônias isoladas.....	32
2.2.5 Amplificação e sequenciamento	32
2.2.6 Análises filogenéticas	33
2.2.7 Fermentações	33
2.2.7.1 Microrganismos utilizados	33
2.2.7.2 Preparo do pré inoculo	34
2.2.7.3 Preparação do meio de cultivo e condições da fermentação	34
2.2.7.4 Metodos analiticos.....	34
2.2.7.5 Análise estatística.....	35
2.2.8 Determinação dos parâmetros fermentativos.....	35
2.2.8.1 Fator de conversão de D-xilose e xilitol (Yp/s)	35
2.2.8.2 Produtividade volumétrica (Qp)	35
2.2.8.3 Eficiência de conversão (η)	36

2.2.8.4 Fator de conversão de D-xilose em biomassa (Y_x/s).....	36
2.3. Resultados e discussão	37
2.3.1 Ensaio fermentativo.....	37
2.3.2 Alinhamento das sequências de DNA e construções das árvores filogenéticas.	43
2.3.3 Utilização de D-xilose e produção de xilitol em meio UPX.....	46
3 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS.....	73

RESUMO

Seleção de leveduras para a bioconversão de D-xilose em xilitol

Espécies microbianas, em especial as leveduras, são de grande importância para a produção de xilitol. A produção de xilitol envolve uma complicada regulação metabólica, incluindo o transporte de D-xilose, produção de enzimas fundamentais e cofator de regeneração. Assim, a triagem de microorganismos que consomem naturalmente D-xilose se torna uma maneira viável e eficaz para se obter organismos com possível aplicação industrial para a produção de xilitol. Neste trabalho foram isoladas vinte e oito leveduras provenientes do ambiente industrial da produção de etanol (torta de filtro) com habilidade de consumir D-xilose. O seqüenciamento e a identificação pela análise da região D1/D2 do gene do rDNA 26S demonstraram que todas pertencem ao gênero *Candida*, sendo 24 linhagens (85.71%) *C. tropicalis* e 4 linhagens (14.29%) *C. rugosa*. Das 28 linhagens isoladas, cinco linhagens de leveduras foram escolhidas aleatoriamente para o ensaio de bioconversão de D-xilose em xilitol devido ao fato das mesmas apresentarem velocidade de crescimento em D-xilose semelhantes. As linhagens selecionadas para o ensaio foram: *Candida tropicalis* MVP 03, *Candida tropicalis* MVP 16, *Candida rugosa* MVP 17, *Candida rugosa* MVP 21, *Candida tropicalis* MVP 40, pois representam bem a amostragem. Três leveduras pertencentes à coleção do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ / USP (*kluveromyces marxianus* IZ 1339, *Candida tropicalis* IZ 1824 e *Candida guilliermondii* FTI 20037) foram utilizadas nos ensaios para obtenção de xilitol a partir da bioconversão da D-xilose como controle positivo. Para a formação de xilitol em meio sintético utilizando D-xilose como única fonte de carbono. Foram realizados ensaios da cinética de crescimento durante 96 horas de fermentação. Na primeira triagem, para a avaliação da melhor condição nutricional para o ensaio, as leveduras foram cultivadas em três meios quimicamente definidos: YNB 6.7 g L⁻¹, UPX (uréia 2.3 g L⁻¹ e peptona 6.6 g L⁻¹) MCX (KH₂PO₄ 0,62 g L⁻¹; K₂HPO₄ 2,0 g L⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 1,0 g L⁻¹ MgSO₄ 1,1 g L⁻¹, extrato de levedura 0.5 g L⁻¹) acrescidos de 20 g L⁻¹ de D-xilose, a 30 °C e 120 rpm. O meio UPX apresentou o melhor rendimento, com uma produtividade volumétrica (Q_p) entre 0,004 a 0,09, fator de conversão de xilose em xilitol (Y_p/s) entre 0,23 a 0,28 g g⁻¹, fator de conversão de D-xilose em biomassa (Y_x/s) entre 0.20 a 0.24 g g⁻¹, com uma eficiência de

conversão (η) entre 21% a 26%. As leveduras *C. tropicalis* MVP 03; *C. tropicalis* MVP 16; *C. rugosa* MVP 17; *C. rugosa* MVP 21; *C. tropicalis* MVP 40 foram avaliadas em uma triagem, em meio UPX, com padronização do inóculo inicial. Para os cinco isolados, a produção de xilitol variou de 5,76 a 32,97 g L⁻¹, a partir de 50 g L⁻¹ de D-xilose com produtividade (Q_p) de 0,06 a 0,35 g L⁻¹ h⁻¹, fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{p/s}$) de 0,14 a 0,65 g g⁻¹, fator de conversão de D-xilose em biomassa ($Y_{x/s}$) de 0,08 a 0,29 g g⁻¹ e a eficiência de conversão (η) entre 6% e 61% que foi calculado segundo Barbosa et al 1988. Destacou-se a levedura *C. tropicalis* 16, produzindo 32,97 g L⁻¹ de xilitol com um Q_p de 0,35 g L⁻¹ h⁻¹, $Y_{p/s}$ de 0,65 g g⁻¹, $Y_{x/s}$ de 0,11 g g⁻¹ e eficiência de conversão (η) de 61 %.

Palavras chave: Leveduras; D-xilose; Xilitol; rDNA 26S

ABSTRACT

Yeast selection for bioconversion of D-xylose to xylitol

Microbial species, particularly yeast, are of great importance for the production of xylitol. The xylitol production involves complicated metabolic regulation, including the transport of D-xylose, production of key enzymes and cofactor regeneration. Thus, screening of microorganisms that consume D-xylose naturally becomes a viable and effective way to obtain organisms with industrial application for the production of xylitol. In this work we isolated twenty-eight yeasts from the environment of the industrial production of ethanol (filter cake) with capacity to consume D-xylose. The sequencing and identification by analysis of the D1/D2 region of 26S rDNA gene showed that all belong to the genus *Candida*, and 24 strains (85.71%) *C. tropicalis* and 4 strains (14.29%) *C. rugosa*. Of the 28 isolates, five strains of yeast were selected randomly to test the bioconversion of D-xylose to xylitol due to the fact that they present rate of growth in D-xylose similar. The lines selected for testing were: *Candida tropicalis* MVP 03, *Candida tropicalis* MVP 16, *Candida rugosa* MVP 17, *Candida rugosa* MVP 21, *Candida tropicalis* MVP 40, and they represent a sampling. Three yeasts from the collection of the Department of Biological Sciences, ESALQ / USP (*Kluyveromyces marxianus* IZ 1339, *Candida tropicalis* IZ 1824 and *Candida guilliermondii* FTI 20037), used were the tests to obtain xylitol from the bioconversion of D-xylose as positive control, for the formation of xylitol in a synthetic medium using D-xylose as sole carbon source. Assays were performed in the kinetics of growth during 96 hours of fermentation. In the first evaluation, the evaluation of the best nutritional condition in the test, yeast cells were grown in three chemically defined media: YNB 6.7 g L⁻¹, UPX (urea 2.3 g L⁻¹ peptone and 6.6 g L⁻¹) MCX (KH₂PO₄ 0.62 g L⁻¹, K₂HPO₄ 2.0 g L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g L⁻¹ MgSO₄ 1.1 g L⁻¹, yeast extract 0.5 g L⁻¹) plus 20 g L⁻¹ D-xylose at 30°C and 120 rpm. Mean UPX showed the best performance with a volumetric productivity (Q_p) from 0.004 to 0.09, the conversion factor of xylose to xylitol (Y_p/s) between 0,23 to 0,28 g g⁻¹ conversion factor D-xylose in biomass (Y_x/s) between 0.20 to 0.24 g g⁻¹ Yeasts 0,20 to 0,24 g g⁻¹, with a conversion efficiency (η) between 21% to 26%. *C. tropicalis* MVP 03, *C. tropicalis* MVP 16, *C. rugosa* MVP 17, *C. rugosa* MVP 21, *C. tropicalis* MVP 40 were evaluated in a screening, in media UPX, with standardization of initial inoculation. For

five isolates, the production of xylitol varied from 5.76 to 32.97 g L⁻¹, from 50 g L⁻¹ D-xylose with productivity (Qp) of 0.06 to 0,35 g L⁻¹ h⁻¹, the conversion factor of xylose to xylitol (Yp/s) 0.14 to 0.65 g g⁻¹, the conversion factor of D-xylose in biomass (Yx/s) from 0.08 to 0.29 g g⁻¹ and conversion efficiency (η) between 6% and 61% which was calculated according to Barbosa et al 1988. They outlined the yeast *C. tropicalis* MVP16, yielding 32.97 g L⁻¹ of xylitol with a Qp of 0.35 g L⁻¹ h⁻¹, Yp/s to 0.65 g g⁻¹, Y x/s of 0.11 g g⁻¹ and conversion efficiency (η) of 61%.

Keywords: Yeast; D-xylose; Xylitol; rDNA 26S

1 INTRODUÇÃO

A importância econômica e social do xilitol, que o coloca como produto de elevado valor agregado, reside em seu alto poder adoçante, sua propriedade anticariogênica e metabolismo insulina-independente que garantem sua aplicação nas indústrias de alimento e farmacêutica.

No Brasil, as indústrias estão começando a incluir o xilitol na formulação de produtos, atraídas pelo seu efeito refrescante e, sobretudo, pela sua ação anticariogênica. Entre os produtos com xilitol que já se acham disponíveis no mercado brasileiro, na área de comestíveis, as gomas de mascar, balas, confeitos, compotas, caramelos, chocolates, geléias, sobremesas e pudins, e na área de dentifrícios, os cremes dentais e as soluções para lavagem bucal. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o xilitol é um aditivo alimentar do tipo umectante, que pode ser empregado na quantidade necessária para se obter o efeito desejado (*"quantum satis"*), uma vez que este não afeta a identidade e a genuinidade dos alimentos.

Na indústria farmacêutica, o xilitol pode ser empregado como adoçante ou excipiente na formulação de xaropes, tônicos e vitaminas. Entretanto, como seu preço é relativamente alto (custo de produção cerca de 10 vezes superior ao da sacarose ou do sorbitol), ele é normalmente utilizado em combinação com outros polióis que servem como agente de corpo da mistura.

O uso de xilitol em produtos industrializados já foi aprovado em mais de quarenta países. Na Escandinávia e em outras partes da Europa, o xilitol vem sendo amplamente utilizado nesses três setores industriais há mais de 20 anos.

O xilitol é obtido industrialmente por via química, a partir da redução de D-xilose derivada de hidrolisados lignocelulósicos. Esta produção é assegurada por patentes e envolve desde a hidrólise da matéria-prima de resíduos lignocelulósicos ricos em xilana, até a hidrogenação catalítica de D-xilose a xilitol.

Entretanto, o rendimento da conversão é baixo (50 a 60%), e são necessárias várias operações como troca iônica, descoloração e fracionamento cromatográfico para purificação até o produto final, aumentando, assim, o preço de comercialização do xilitol.

A produção microbiana é uma alternativa ao processo químico, com a vantagem de ser conduzida em condições de temperatura e pressão brandas, portanto, com menor gasto de energia e, devido à especificidade da bioconversão, são obtidos rendimentos mais levados, com baixo custo de separação/purificação, e efluentes mais limpos.

A seleção de microrganismos que fermentam D-xilose a xilitol é o primeiro passo para o desenvolvimento de um processo de bioconversão com alta produtividade e rendimento. Os fungos filamentosos, a maioria das leveduras e algumas bactérias são capazes de realizar essa bioconversão. A maioria das pesquisas sobre produção microbiana de xilitol utiliza leveduras, destacando-se o gênero *Candida*.

A produção de xilitol, assim como outros processos de bioconversão, são influenciados pelas condições ambientais. Fatores como temperatura, concentração de xilose, pH do meio de cultivo, concentração do inóculo, estado fisiológico do inóculo e taxa de aeração.

Neste estudo, foram isoladas e avaliadas linhagens de leveduras capazes de fermentar D-xilose a xilitol com alta produtividade e rendimento, sendo avaliados alguns meios sintéticos de cultivo para o processo de bioconversão.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 LEVEDURAS

As leveduras constituem um grupo de microrganismos eucarióticos (Fig.1.) integrado no Reino *Fungi*, domínio *Eukarya*, caracterizado por um crescimento vegetativo predominantemente unicelular e pela possibilidade de formação de estruturas sexuais não contidas em corpos de frutificação (PHAFF et al., 1978; KURTZMAN, 1994). Terão evoluído de uma forma ancestral unicelular (BANDONI, 1987; OBERWINKLER, 1987), compreendendo atualmente representantes dos Filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* (SWANN; TAYLOR 1995; ERIKSSON; WINKA 1997).

Figura 1 - Representação esquemática de uma célula de levedura (adaptado de <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/beer/yeast/yeast2.htm>)

As leveduras, como microrganismos quimio-organo-heterotróficos, são capazes de utilizar diferentes fontes de carbono e de energia tais como D-glucose, D-galactose, D-xilose, glicerol, sorbitol, entre muitos outros. A seleção por determinado nutriente poderá determinar a diversidade de espécies em diferentes nichos, sendo que, as leveduras podem ser altamente especializadas por habitat (PHAFF et al., 1978).

As leveduras têm sido isoladas de ambientes muito diversos: terrestres, aquáticos e aéreos. As plantas parecem constituir os nichos mais comuns, Por outro lado, no filoplano predominam as leveduras de afinidade basidiomiceta, em particular do gênero *Erythrobasidium* e *Rhodotorula* (INÁCIO et al., 2002). Águas doces e salgadas são ambientes onde se encontram freqüentemente leveduras do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Debaryomyces*. Foram encontradas leveduras marinhas (essencialmente do gênero *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*) em sedimento recolhido de profundidades entre 6.400 e 11.000 metros (NAGAHAMA et al., 2001). A concentração de leveduras em águas do mar pode passar de um número típico de 10-100 UFC (unidades formadoras de colônias) por litro para valores pelo menos duas ordens de grandeza mais elevadas nas regiões de estuário – região de contato entre água doce e salgada (WALKER, 1998).

Para muitas leveduras, o solo é o único reservatório conhecido. *Lipomyces* e *Schwanniomyces* são gêneros de leveduras exclusivamente isoladas do solo. Os solos pobres poderão ter poucas leveduras, mas em solos usados na agricultura poderão ter até 4×10^4 UFC por grama (WALKER, 1998).

2.1.2 LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

São descritas atualmente 197 espécies do gênero *Candida* pertencentes ao Reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes e família Cryptococcaceae, embora haja algumas espécies classificadas da subdivisão Ascomycotina (KREEGEN – VAM RIJ 1982.; LACAZ et al., 1998.; SIDRIM; ROCHA.; 2004)

As leveduras do gênero *Candida* apresentam em meio sólido colônias úmidas, cremosas de aspecto liso ou rugoso, e coloração branco/amarelada. Microscopicamente, as células são globosas, ovaladas ou ovaladas alongadas medindo

em média de 3 a 14 μm . (KREEGEN – VAM RIJ 1982.; LACAZ et al., 1998; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Candida é um gênero de levedura ascomiceto que se apresenta, geralmente, na forma unicelular, porém muitas espécies desenvolvem hifas, como as que podem ocorrer em infecções oportunistas. A espécie patogênica ao homem mais conhecida é a *Candida albicans* que se desenvolve na pele, na mucosa oral ou vaginal. A virulência da espécie de *Candida* spp. é atribuída ao diformismo, à aderência, secreção de enzimas, diversidade de fenótipos e variabilidade de antígenos (GILFILLAN et al., 1998).

Além da importância para a saúde pública, o gênero *Candida* apresenta diversos outros interesses. Por exemplo, *Candida guilliermondii* pode ser usada para a produção de xilitol (MUSSATO, SILVA, ROBERTO, 2006), em biorremediação *Candida digboiensis* por ser capaz de assimilar e metabolizar hidrocarbonetos (SOOD; LAL 2009), *Candida antarctica* e *Candida tropicalis* são empregadas na produção de ácidos dicarboxílicos, matéria prima para a fabricação de perfumes, poliamida, poliéster, adesivos e antibióticos (PICATAGGIO et al., 1991; CRAFT et al., 2003). Contudo uma das principais aéreas de aplicação das leveduras do gênero *Candida* é na indústria alimentícia (Tabela 1). Mesmo podendo ser patogênicas oportunistas a agência de controle de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos – US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) tem permitido o uso de *Candida guilliermondii* e *Candida lipolytica* na produção de ácido cítrico.

Tabela 1 - Espécies de *Candida* com aplicação na indústria de alimentos (continua)

Processo	Microorganismo	Referência
Glutamato monossódico	<i>C. lipolytica</i> , <i>C. utilis</i> , <i>C. krusei</i>	Oki et al 1971
Ácido cítrico	<i>C. lipolytica</i>	Pazouki et al 2000

Tabela 1 - Espécies de *Candida* com aplicação na indústria de alimentos (continuação)

Processo	Microorganismo	Referência
Ácido ascorbico	<i>C. norvegensis</i> e <i>C. antártica</i>	Cayle et al 1986
Riblofavina (vitamina B2)	<i>C. guilliermondii</i>	Ghamen et al 1992
L- arabitól	<i>C. entomaea</i>	Saha; Bothast 1996
Xilitol	<i>C. tropicalis</i> e <i>C. guilliermondii</i>	Meyrial et al 1991 Yahashi et al 1996

Dentre as espécies já estudadas, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii* são as mais promissoras apresentando produtividade cima de 0,7 g de xilitol por grama de xilose consumida. O processo de produção de xilitol por *Candida tropicalis* foi patenteado nos EUA e no Japão por Kim et al. (1999 e 2000).

A variabilidade na produção de xilitol existente em *C. tropicalis* é explorada em programas de seleção, já que diferenças foram encontradas quanto aos parâmetros fermentativos entre *C. guilliermondii* FTI 20037 e *C. tropicalis* (GIMENES et al., 2002),

2.1.3 METABOLISMO DE D-XILOSE EM LEVEDURAS

Algumas leveduras são capazes de transformar xilose em D-xylulose através de uma rota de oxido-redução consistindo em duas reações seqüenciais. Na primeira, xilose-redutase (XR), na presença de NADH e/ou NADPH, transforma D-xilose em xilitol, embora a relativa estabilidade deste produto leva a questionar se xilitol é um intermediário, um produto ou ambos (TAYLOR et al., 1990).

Em uma reação subsequente, o xilitol é transformado em D-xilulose por qualquer NAD^+ ou NADP^+ ligada a xilitol desidrogenase (XDH) (SKOOG; HAHN-HÄGERDAL, 1988; GIRIO et al., 1990, PRIOR et al 1989). A Figura 2 mostra um esquema simplificado do metabolismo de D-xilose em levedura com base nos dados de Prior et al. (1989).

Leveduras diferentes mostram diferentes habilidades para fermentação de D-xilose em etanol ou em xilitol (JEFFRIES, 1983; GONG et al., 1983), entre eles *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. roixxi*, *Schyzosaccharomyces pombe*, *Candida mogii*, *C. melibiosica* (UENG et al. 1981).

Em ambas condições, as anaeróbias e as de oxigênio em condições limitadas, as leveduras com as atividades de XR ligadas aos dois NADH e NADPH (como em *Pichia stipitis*) regeneram o NAD^+ consumido na segunda etapa do metabolismo de D-xilose. Neste caso, produto principal é o etanol e não ha acumulação de xilitol devido ao equilíbrio redox entre os cofatores XR e XDH.

Em contrapartida, as leveduras que consomem D-xilose apenas por atividade de XR dependente de NADPH (com completa ausência de NADH ligada a XR) na primeira etapa do metabolismo de D-xilose (como em *Debaryomyces hansenii*) acumulam xilitol (AMARAL-COLLAÇO et al., 1989; GIRIO et al, 1990). Na segunda etapa, xilitol é oxidado por XDH, geralmente na presença de NAD^+ (BRUINENBERG et al., 1984; DITZELMULLER et al., 1984; GIRIO et al., 1989; VANDESKA et al., 1995).

Kruse; Schfigerl (1996) observaram que NAD^+ dependente, aumenta a atividade de XDH durante fermentação por *P tannophilus*, enquanto o NADP^+ dependente diminui a atividade de XDH .

Em condições aeróbicas, o NADH formado nesta etapa podem ser reoxidadas na via respiratória, mas sob condições semi-aeróbicas, um desequilíbrio redox limita a taxa de oxidação levando ao acúmulo de xilitol (DITZELMULLER et al., 1984; PRIOR et al., 1989).

Figura 2 - Esquema simplificado do metabolismo de D-xilose em leveduras

2.1.4 RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos são os recursos orgânicos renováveis mais abundantes da terra, representam a maior porção do carbono total fixado por fotossíntese (ARISTIDOU; PENTTILÄ 2000; CACCHIO et al., 2001) e possuem imenso potencial de uso como matérias-primas em processos industriais para a produção de alimentos, biocombustíveis, insumos químicos, enzimas, biofertilizantes e bens de consumo diversos (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998; KADAM et al., 2000; KRISHNA et al., 2001; LATIF; RAJOCA, 2001; TENGERTDY; SZAKACS, 2003). Esta biomassa inclui materiais oriundos das atividades de exploração agro-industrial e florestal tais como palhas de arroz e trigo, sabugo de milho, casca de aveia, bagaço de cana-de-açúcar, aparas de eucalipto entre outros.

Os resíduos agroindustriais, ou lignocelulósicos são constituídos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. As hemiceluloses podem ser classificadas como xilanas, mananas, arabinoxilanas, arabinogalactanas e arabinanas (du TOIT et al., 1984; BIELY, 1985; KERN et al., 1997; AGUIAR et al., 1999). A xilana é hidrolisada em açúcares monômeros constituintes (glicose, xilose, arabinose, galactose, manose e outros oligossacarídeos) usando ácido diluído, álcali, explosão a vapor, explosão com amônio (AFEX) (HOLTZAPPLE et al., 1991) ou uma mistura de tratamentos enzimáticos (amilase, xilanase e celulase) (HESPELL et al., 1997, SAHA et al.). Devido à estrutura heterogênea e ao baixo grau de polimerização, xilana é facilmente hidrolisada. Na hidrólise ácida, a massa do material hemicelulósico é tratada com solução de ácido diluído, sob pressão e temperatura altas, para hidrolisar a hemicelulose e precipitar a lignina. Os açúcares monoméricos dissolvem-se no meio de reação, juntamente com outros solutos. A ocorrência de inespecificidade e sítios deficientes de reação levam à formação de subprodutos indesejáveis, como furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético que trazem restrição ao uso da hidrólise ácida (HYVÖNEM et al., 1982), sendo necessária a purificação parcial do hidrolisado (ROBERTO et al., 1994; SILVA et al., 1994; ROBERTO et al., 1996; PREZIOSI-BELLOU et al., 1997; ALVES et al., 1998; GURGEL et al., 1998; SILVA et al., 1998; CONVERTI et al., 1999; DOMINGUEZ et al., 1999; RAMOS, 1999; CRUZ et al., 2000).

Em razão de sua maior especificidade e condições reacionais brandas, a hidrólise enzimática preserva a integridade dos açúcares que compõem a hemicelulose, evitando a formação de compostos de degradação, e pode substituir a hidrólise química que requer alta pressão e alta temperatura (HYVÖNEM et al., 1982).

Outras técnicas são utilizadas para obtenção de hidrolisado de resíduos lignocelulósicos ricos em xilana, tais como: autohidrólise “steam explosion” (MARCHAL et al., 1986; PREZIOSI-BELLOU et al., 1997; PREZIOSI-BELLOU et al., 2000) e extração, utilizando-se soluções alcalinas (du TOIT et al., 1984).

D-xilose, o principal produto da hidrólise de xilanas, pode ser convertida em proteína microbiana e em uma gama de substâncias de interesse industrial, tais como: combustíveis e solventes (etanol, butanol, 2,3-butanodiol, acetona e 2-propanol), alditóis (xilitol e glicerol) e ácidos orgânicos (ácido láctico, acético e butírico), podendo também

ser utilizada como substrato para produção de glicose isomerase (MARCHAL et al., 1986; FRAZER; MCCASKEY, 1989; FOGARTY; KELLY, 1990; AGUIAR et al., 1999).

De acordo com Parajó et al. (1998), a separação simultânea dos três principais grupos de polímeros da biomassa lignocelulósica em suas formas poliméricas não é possível com o uso de procedimentos de separações convencionais como a cristalização, precipitação ou extração. Pelo menos um dos polímeros é degradado pelos tratamentos baseados nas diferenças entre suas propriedades químicas. Ainda segundo estes autores, celulose e hemicelulose são menos suscetíveis à oxidação do que a lignina, mas ambas podem ser hidrolisadas por ácidos, ao contrário da fração fenólica (lignina) que permanece como um resíduo sólido no meio ácido; e a hemicelulose é mais suscetível do que a celulose à ação hidrolítica de catalisadores devido a sua estrutura ramificada e aberta. O fato de o catalisador ter sua difusão facilitada dentro da cadeia polimérica da hemicelulose, por esta apresentar uma estrutura aberta aliada à sua estrutura heterogênea e baixo grau de polimerização, proporciona um melhor rendimento em condições mais amenas e faz com que este constituinte da biomassa seja bastante atrativo para uso em processos fermentativos (JEFFRIES et al., 1983; MAGGE; KOSARIC, 1985).

2.1.5 XILITOL

O nome xilitol relaciona-se à xilose, o açúcar da madeira, a partir da qual o xilitol foi obtido pela primeira vez (MÄKINEN, 2000). Na nomenclatura química, o xilitol é classificado similarmente ao sorbitol e ao manitol, ou seja, como um açúcar-álcool ou um poliol. (álcool-poli-hidroxilado ou açúcar álcool), cuja fórmula molecular é $C_5H_{12}O_5$ (1,2,3,4,5-pentaidroxipentano), De estrutura aberta, a molécula de xilitol possui cinco grupos hidroxila (OH^-), cada um deles ligado a um átomo de carbono (figura 3), razão pela qual esse composto é conhecido como poli-hidroxiálcool acíclico ou pentitol (MÄKINEN, 2000). É descrito como um pó cristalino branco com poder edulcorante equivalente ao da sacarose e superior ao de outros polióis como o manitol e o sorbitol (NINGAN; SINGH 1995). As propriedades físicas e químicas do xilitol estão relacionadas na tabela 2. As propriedades especiais de xilitol encontram uso em alimentos e indústria farmacêutica (BEUTLER, 1984).

Figura 3 - Estrutura química do xilitol.

Tabela 2 - Características e propriedades físico químicas do xilitol (HEYVONEN et al., 1982 e BAR, 1991) (continua)

Propriedades	Características ou valores
Fórmula empírica	C ₅ H ₁₂ O ₅
Massa molar	152,15 g/mol
Aparência	Pó cristalino
Cor	Branca
Sabor	Doce
Odor	nenhum
Ponto de fusão	92-96 °C
Ponto de ebulição	126 °C
pH (solução aquosa 10%)	5-7
Densidade (solução aquosa 10%)	1,03 g/mL
Solubilidade em água a 20 °C	63 g/100 g solução
Índice de refração (25 °C)	1,3471 (solução aquosa 10%)
Viscosidade (solução aquosa 10%)	1,23 cP a 20 °C

Tabela 2 - Características e propriedades físico químicas do xilitol
(HEYVONEN et al 1982 e BAR 1991) (continuação)

Propriedades	Características ou valores
Valor calórico	2,4 Kcal/g
Higroscopicidade	Em elevada umidade relativa é mais higroscópico que a sacarose e menos que o sorbitol
Pode adoçante	Similar ao da sacarose, superior ao do manitol e sorbitol
Estabilidade	Estável a 120 °C (não carameliza)

Açúcares alcoóis são uma classe de polióis derivados da carbonila (aldeído ou cetona) e é reduzida para o correspondente grupo hidroxila primário ou secundário (AKINTERINWA, KHANKAL, CIRINO 2008). Açúcares álcoois encontram muitas aplicações na indústria (SILVEIRA, 2002), tendo características semelhantes ao açúcar e são utilizados para melhorar o perfil nutricional dos produtos alimentares devido às propriedades promotoras de saúde, tais como menor teor calórico, anticariogenicidade, baixos índices glicêmicos e resposta à insulina (GRANSTROM et al., 2007; SCHIWECK, 2003).

O xilitol é um poliol naturalmente encontrado em diversas frutas e vegetais, porém em baixa concentração (900mg/100g) (PARAJÓ et al., 1988) sendo também um intermediário metabólico normal de mamíferos, produzido no metabolismo humano na proporção entre 5 a 15 g por dia tendo no sangue uma concentração de 0,03 a 0,06 mg/100 mL (PEPPER; OLINGER, 1988). Em humanos o xilitol é metabolizado por vias metabólicas insulino-independente. (KO et al 2007). Possui um poder adoçante similar à sacarose contendo 40% de calorias a menos. É obtido principalmente da Bétula e outras espécies de árvores, própria dos países escandinavos (TRINDADE, 2005). Pode também ser produzido industrialmente a partir de sabugo de milho, cana de açúcar, casca de sementes e de nozes (MAKINEN, 2000; CUNHA, 2003). A síntese química de xilitol pela redução da xilose a partir de fontes naturais é um processo de alto custo. Primeiro devido à baixa disponibilidade inicial de açúcar e em segundo lugar, devido às

extensas etapas de purificação e separação – medidas necessárias a fim de eliminar os subprodutos formados durante a reação (LÓPES et al., 2004). A vantagem de não exigir um xarope puro de xilose no início do processo para a produção microbiológica, como a síntese química exige, torna o processo microbiológico interessante devido ao baixo custo de hidrolisados hemicelulósicos que são potenciais substratos. (ROSEIRO et al., 1991).

Atualmente, a produção mundial de xilitol ultrapassa 75.000 toneladas por ano (TAPIAINEN et al., 2002; MAKINEN, 2000; TAPIAINEN et al., 2002b). O mercado anual do xilitol é estimado em 340 milhões dólares, com preço em US \$ 4-5 kg⁻¹ (KADAM et al., 2008).

2.1.6 PRODUÇÃO DE XILITOL POR MICRORGANISMOS

O xilitol é um intermediário no metabolismo de D-xilose em microrganismos e se torna uma alternativa atrativa para a sua produção (PARAJÓ et al 1997).

Microrganismos assimilam e fermentam mais facilmente glicose que xilose. No entanto, embora em pequeno número, existem bactérias, leveduras e fungos capazes de assimilar e fermentar xilose a xilitol, etanol e outros compostos (BARNETT et al; 2003).

Diversas bactérias (YOSHITAKE et al., 1971; IZUMORI; TUZAKI, 1988), fungos filamentosos (DAHIYA 1991), e leveduras (MEYRIAL et al., 1991; NISHIO et al., 1989; GONG et al. 1983; VANDESKA et al., 1996), são conhecidas por produzirem xilitol.

Algumas bactérias, como *Corynebacterium* sp. (YOSHITAKE et al., 1971) *Enterobacter liquefaciens* (YOSHITAKE et al., 1971; YOSHITAKE, 1973) e *Mycobacterium smegmatis* (IZUMORI; TUZAKI, 1988), foram estudadas para a produção de xilitol. No entanto devido às pequenas quantidades de xilitol formado, a produção de xilitol por bactérias não é muito atrativa. No que diz respeito aos fungos, existem estudos quanto à produção de xilitol por *Petromyces albertensis* (DAHIYA, 1991). *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Glicoladium*, *Byssoschlamyza*, *Myrothecium*, e *Neurospora* sp. (CHIANG; KNIGHT, 1961), *Apergillus niger*, *P. roqueforti*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *penicillium crustosum*, *P. expansum*, *P. griseo roseum*, *P. italicum*, *P. janthinellum*, *P. purpurogenum* (SAMPAIO et al., 2003).

No entanto tais estudos demonstraram produzir pequenas quantidades de xilitol, em meio contendo D-xilose.

Ueng e Gong (1982) detectaram pequenas quantidades de xilitol na fermentação de *Mucor* sp, na fração hemicelulose de bagaço de cana hidrolisado. Suihko (1984) relatou a produção de xilitol em uma cultura de *Fusarium oxysporum*.

Leveduras que naturalmente utilizam D-xilose produzem grandes quantidades de xilitol como principal produto do metabolismo de xilose (GIRIO et al., 1989). A acumulação de xilitol em meio de cultura varia de acordo com a levedura e as condições de cultura utilizadas (SAHA; BOTHAST, 1997). A conversão microbiológica de xilose em xilitol é influenciada por diversos fatores: concentração do inóculo inicial, pressão osmótica, idade do inóculo, linhagem celular, condições de cultura (pH, aeração, temperatura), tipo de fermentação, composição do meio (substratos sintéticos ou compostos ou lignocelulósico hidrolisados), presença de compostos inibidores e a influência de outros açúcares (WATSON et al., 1984; PAREKH et al., 1987; BJORLING; LINDMAN, 1989; GIRIO et al., 1990; WINKELHAUSAN; KUZMANOVA, 1998; ROBERTO et al., 1999; HAHN-HAGERBAHL, 1994; VAN DIJKEN; SCHEFERS 1986; NOLLEAN, 1995).

A capacidade de produção de xilitol como um produto metabólico normal tem sido frequentemente observado em diversas leveduras, em particular para espécies de *Candida* (LATIF; RAJOKA, 2001; SILVA; ROBERTO, 2001; WALTHER et al., 2001; FARIA et al., 2002).

Em geral, entre os microrganismos, as leveduras são consideradas as melhores produtoras de xilitol e, portanto, a maioria das publicações menciona esses microrganismos. Quarenta e quatro cepas de levedura de cinco gêneros *Candida*, *Hansenula*, *Kluveromyces*, *Pichia* e *Pachysolen* foram selecionados por sua habilidade de converter D-xilose em xilitol por Barbosa et al (1988). *Candida guilliermondii* e *Candida tropicalis* foram relatadas como boas produtoras de xilitol (AZUMA et al., 2000; SHEU et al., 2003).

Leveduras do gênero *Candida* fermentam cerca de 40% de D-xilose em 24-48 h (ONISHI; SUZUKI et al., 1966). Em outro experimento Gong et al. (1983) avaliou 20 linhagens de onze espécies de *Candida*, 21 linhagens de oito espécies de

Saccharomyces e 8 linhagens de *Schizosaccharomyces pombe*. A *Candida* sp. obteve um rendimento em xilitol de 10 a 15% w/v. *Debaryomyces hansenii* obteve um rendimento mais elevado do que várias outras leveduras selecionadas para fermentação de pentoses utilizando materiais lignocelulósicos (AMARAL-COLLAÇO et al., 1989). Vandeska et al. (1995) selecionou *Debaryomyces hansenii*, que apresentou um alto rendimento (0,47-0,48 g g⁻¹) em relação a outras leveduras. *Candida mogii* apresentou o maior rendimento (0.7 g g⁻¹) em comparação com outras onze leveduras estudadas por Sirisansaneeyakul; Rizziz (1995).

Em um experimento realizado por Dominguez et al. (1996) comparando seis linhagens de leveduras, *D. hansenii* apresentou um rendimento de 0,71 g g⁻¹. A taxa de produção de 2,67 g L h⁻¹ de xilitol com D-xilose como substrato foi obtida utilizando *C. tropicalis* por Horitsu et al. (1996). Outras espécies *Candida* foram avaliadas entre elas *Candida pelliculosa* (KITPREECHSVANISCH et al., 1984 e NISHIO et al., 1989), *Candida boidinii* (VONGSUVANLERT et al., 1989), *Candida guilliermondii* (BARBOSA et al., 1988; LEE, 1988 e MEYERIAL et al., 1991), *Candida shehatae* (DU PREEZ et al., 1986) e *Candida tropicalis* (BARBOSA et al., 1988).

2.1.7 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Na identificação de leveduras através da caracterização fenotípica podem surgir dificuldades devidas a leituras não conclusivas, seja dos exames morfológicos quer dos testes bioquímicos e fisiológicos. Por outro lado, estes métodos são laboriosos, morosos e podem não ser adequado para diferenciar espécies próximas (DEÁK, 1995; LOPANDIC et al., 2006). Ao longo das últimas décadas, foram sendo introduzidos diferentes métodos moleculares baseados em estudos comparativos de DNA que asseguram uma caracterização e identificação de leveduras mais confiável, sensível e rápida. As aplicações destes métodos tornaram mais evidentes as ambigüidades e inconsistências dos sistemas de classificação baseados essencialmente em critérios fenotípicos (KURTZMAN; PHAFF, 1987; FELL, 1995).

Em leveduras, assim como noutros eucariontes, os genes do RNA ribossômico (rRNA) estão organizados numa unidade de DNA ribossômico (rDNA) que se repete sequencialmente, podendo ocorrer em várias dezenas de cópias por genoma haplóide.

Muitas leveduras apresentam os genes do rDNA das subunidades ribossômicas pequena (17-18S) e grande (26S, 5,8S e 5S) numa unidade comum, embora o gene do rDNA 5S possa ser transcrito separadamente.

A unidade de rDNA tem regiões estruturais altamente conservadas, na maioria situadas nos genes de rDNA, e domínios mais variáveis, geralmente localizados nas regiões intergênicas. Estas diferenças têm permitido estabelecer relações evolutivas entre indivíduos e a sua distinção a vários níveis da hierarquia taxonômica (KURTZMAN; FELL, 1998).

A utilização de rDNA na identificação molecular tem uma série de vantagens: (i) os ribossomas estão presentes em todos os organismos; (ii) são estruturas homólogas do ponto de vista funcional e evolutivo; (iii) parecem partilhar uma origem evolutiva comum, pois, apesar de serem muito conservados, revelam diferentes níveis de evolução, podendo funcionar como cronômetros moleculares; (iv) os genes do rRNA parecem não variar entre indivíduos contemporâneos, refletindo somente as relações evolutivas entre os organismos; (v) a totalidade de mais de 6.000 nucleotídeos contidos nas sequências dos genes de rDNA (26S, 18S, 5,8S e 5S) é suficientemente elevada para apreciar filogenias e fazer a respectiva análise estatística; (vi) a utilização de primers, para amplificação por PCR, beneficia de fácil acesso a qualquer zona da unidade de rDNA, simplificando, deste modo, o estudo de um grande número de amostras (FELL et al., 2000); e (vii) a existência de bases de dados públicas de rDNA (e.g., GenBank) permite a comparação de sequências de muitos e diversos organismos (GUÉHO et al., 1989; PETERSON; KURTZMAN, 1991; VAN DE PEER et al., 1999).

Atualmente, o método molecular de uso mais generalizado em estudos de taxonomia e para identificação de leveduras baseia-se na comparação de sequências da região D1/D2 do gene do rDNA 26S e/ou do gene do rDNA 18S.

Outras regiões da unidade de rDNA também têm sido analisadas, como as regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) e IGS (InterGenic Spacer). As sequências D1/D2 de todas as leveduras conhecidas têm a vantagem de estar acessíveis em bases de dados públicas, tais como o NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL (<http://www.embl-heidelberg.de>) e DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>).

A investigação intensiva que foi desenvolvida nas últimas décadas evidenciou que a região D1/D2 exibe diferenças suficientes entre leveduras para que se possa avaliar relações intra- e inter-específicas (KURTZMAN; ROBNETT, 1998; FELL et al., 2000). Geralmente, estirpes da mesma espécie não apresentam diferenças nucleotídicas superiores a 1-1,5% (PETERSON; KURTZMAN, 1991; KURTZMAN; ROBNETT, 1998). Por outro lado, Fell et al. (2000) sugerem que dois nucleotídeos de diferença nos 600 pb da região D1/D2 serão suficientes para considerar que leveduras do filo basidiomycetos representam espécies diferentes.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento experimental foi dividido em duas fases:

- Isolamento, purificação, e caracterização molecular de leveduras obtidas de torta de filtro para a obtenção de xilitol.
- Testes de fermentação dos microrganismos usando-se meio sintético.

2.2.1 COLETA DE AMOSTRA DA BIOMASSA DE TORTA DE FILTRO

Para o isolamento das leveduras, as amostras de torta de filtro, foram coletados no mês de outubro de 2007 em uma usina, localizada no município de Piracicaba, e colocados em sacos plásticos esterilizados. Os sacos plásticos foram acondicionados em gelo e transportados até o laboratório de Bioquímica de Fermentações Alcoólicas, na ESALQ/USP.

2.2.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

As amostras de torta de filtro (5g em 50 ml de água destilada esterilizada), com auxílio de uma alça, foram colocadas em homogenizador durante 2 minutos.

Em seguida, com o intuito de se obter colônias isoladas, foram realizadas diluições em série, em água peptonada, destas amostras (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) e 0,1 ml de cada diluição foi assepticamente transferida para o centro da placa contendo meio sólido YEPX (extrato de levedura 1%, peptona 1%, xilose 2%) acrescido de clorafenicol e tetraciclina na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, procedendo-se à semeadura com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 30°C durante 24 horas. Para cada diluição foram empregadas três placas de Petri.

As colônias isoladas crescidas, com características macroscópicas e microscópicas de levedura foram semeadas, com auxílio de uma alça estéril, por esgotamento em placas de Petri contendo meio sólido YEPX (extrato de levedura 1%, peptona 1%, D-xilose 2%) adicionado do antibiótico clorafenicol e tetraciclina na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As placas foram colocadas em estufa a 30°C durante 24 horas.

As colônias puras obtidas, ou seja, isentas de qualquer contaminação, foram identificadas utilizando números cardinais e transferidas para tubos de ensaio contendo meio líquido YEPX 2% e colocadas em estufa a 30 °C durante 24 horas.

2.2.3 CONSERVAÇÃO DAS LEVEDURAS

Colônias representativas de cada levedura pura isolada foram acondicionadas em tubos contendo glicerol (15% concentração final) e mantidos em freezer - 80 °C.

2.2.4 EXTRAÇÃO DE DNA

As leveduras foram transferidas para tubos de cultura contendo 10 ml de meio YEPD líquido (extrato de levedura 1%, peptona 1%, glicose 2%) e incubadas a 30 °C durante 24 horas em shaker. Amostras de 1,5 mL foram transferidas para microtubos de 2,0 mL e centrifugadas a 5.000g durante 5 minutos. Essa operação foi repetida 2 vezes. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensado em 0,2 mL de tampão A (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 8; 1mM EDTA, pH 8). Adicionou-se 200mg de pérolas de vidro 0,1 mm (*glass beads* Biospec products TM ®) e 0,2 mL clorofane (25 mL fenol: 24mL clorofórmio: 1mL álcool isoamílico) e agitado em vortex durante 3 minutos. Em seguida os microtubos foram centrifugados por 5 minutos a 15000g e o sobrenadante transferido a um novo tubo. Adicionou-se a este novo tubo 1 mL de etanol PA e o mesmo foi centrifugado a 15.000 g por 2 minutos. Em seguida o pellet foi ressuspensado em 0,4 mL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 100mM EDTA) e adicionou-se 10µL de acetato de amônio 4M e 1 mL de etanol PA e homogenizou-se e em seguida centrifugou-se a 15.000g por 2 minutos e o pellet foi ressuspensado em 50µL de tampão TE.

2.2.5 AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Para a amplificação dos domínios divergentes D1/D2 da sub unidade 26S do rDNA foram utilizados 5,0 mM tampão PCR, 3,0 mM MgCl₂, 1,0 U de taq DNA polimerase, 1,0 mM dNTP, 20 pmol de iniciadores, NL1 - (5`GCCATATCAATAAGCGGAGG 3`) e NL4 - (5`GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3`), água deionizada esterilizada para volume final de 50 µL como descrito por O'Donell

(1993). O termociclador utilizado foi PTC-100 MJ – Research, nas seguintes condições: para um ciclo de desnaturação inicial de 94°C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, anelamento a 55°C durante 1 minuto e extensão de 72°C durante 1 minuto com um ciclo de extensão final de 72°C durante 7 minutos. O tamanho do fragmento encontrado foi de 600pb.

Os produtos da amplificação foram purificados com polietileno glicol (PEG 8000 20% e NaCl 2,5 mM). A eletroforese dos fragmentos purificados foi realizada em gel de agarose 1.2% em tampão TBE. Os fragmentos foram corados com brometo de etídio (TBE 1X/EtBr 0.5µg/mL- (SAMBROOK et al., 1989), visualizados em transluminador de UV.

Os domínios D1/D2 da região 26S de rDNA das espécies de leveduras foram seqüenciados utilizando Kit Dinamic GE. Para a identificação de cada isolado foi feito um BLAST nucleotídeo a nucleotídeo. As seqüências destas leveduras foram comparadas com as seqüências disponíveis no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov-national-center-for-biotechnology-information>)

2.2.6 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Os alinhamentos das seqüências de DNA foram realizados com o programa informático MegAlign (DNASStar), e visualmente inspecionadas. Foram obtidas árvores filogenéticas com o programa informático MEGA, versão 4.0, usando o método Neighbor-Joining. As distâncias entre as seqüências foram determinadas usando o modelo Kimura's two-parameter. Foi testado o suporte estatístico das árvores filogenéticas obtidas com uma análise de bootstrap, utilizando 1000 réplicas.

2.2.7 FERMENTAÇÕES

2.2.7.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Cinco linhagens de leveduras, *C. tropicalis* MVP 03, *C. tropicalis* MVP 16, *C. rugosa* MVP 17, *C. rugosa* MVP 21, *C. tropicalis* MVP 40, e três leveduras pertencentes à coleção do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ / USP (*kluveromyces marxianus* IZ 1339, *Candida tropicalis* IZ 1824 e *Candida guilliermondii* FTI 20037),

foram avaliadas para a formação de xilitol em meio sintético utilizando D-xilose como única fonte de carbono. Foram realizados ensaios da cinética de crescimento durante 96 horas de fermentação.

2.2.7.2 PREPARO DO PRÉ-INÓCULO

Para a obtenção do pré-inóculo da fermentação, 1 mL da suspensão estoque de célula foi transferida do eppendorf para um frasco de erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL com meio sintético YEPD (10 g L^{-1} de extrato de levedura, 10 g L^{-1} de peptona e 20 g L^{-1} de glicose) e incubados sob agitação de a 150 rpm durante 24 horas a temperatura de 30°C .

Após este tempo mensurou-se a densidade óptica em espectrofotômetro a 600 nm. A concentração celular foi determinada, a partir de uma curva de calibração relacionado à densidade ótica com a concentração de células g L^{-1} de (massa seca). Em seguida as suspensões padronizadas foram utilizadas para se inocular os frascos contendo o meio de fermentação, sendo a concentração inicial de cada linhagem de aproximadamente $0,1 \text{ g L}^{-1}$.

2.2.7.3 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO E CONDIÇÕES DA FERMENTAÇÃO

Os ensaios de fermentação foram efetuados em erlenmeyers de 125 mL com 50 ml de meio UPX contendo a seguinte formulação: Uréia ($2,3 \text{ g L}^{-1}$), Peptona ($6,6 \text{ g L}^{-1}$) e Xilose (50 g L^{-1}). O pH do meio foi ajustado para 6.0 e os frascos erlenmeyers foram incubados em shaker orbital com rotação de 150 rpm a temperatura de 30°C . Amostras, em triplicata, foram retiradas nos intervalos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas para as análises da produção de xilitol, biomassa e consumo de D-xilose.

2.2.7.4 METODOS ANALITICOS

A concentração celular foi determinada em espectrofotômetro A 600nm, a partir de uma curva de calibração relacionando-se a densidade ótica com a concentração da massa seca de células g L^{-1} (48 horas a $65\text{-}70^\circ\text{C}$). As concentrações de xilitol e xilose foram determinadas em HPLC com detector de índice de refração, utilizando-se uma coluna HPX-87H (300 x 7,8 mm) empregando-se H_2SO_4 5mM como eluente a um fluxo

de 0,6 mL/minuto. As amostras foram previamente centrifugadas durante 5 minutos a 10,000 rpm, diluídas 100 vezes em água MQ e o sobrenadante filtrado em membrana milipore de 02 µm.

2.2.7.5 ANALISE ESTATISTICA

As análises estatísticas foram realizadas no programa ESTAT sendo realizada uma comparação de médias com variância de 5% e o experimento foi baseado em um delineamento fatorial 5 x 3 em blocos casualizados com três repetições.

2.2.8 DETERMINAÇÃO DOS PARAMETROS FERMENTATIVOS

2.2.8.1 FATOR DE CONVERSÃO DE D-XILOSE EM XILITOL ($Y_{p/s}$)

O fator de conversão, o qual expressa a massa de xilitol produzida por massa de xilose consumida, em gramas, foi calculado pela seguinte equação:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta p}{\Delta s} = \frac{Pf - Pi}{Sf - Si} \quad (1)$$

Onde P_i e P_f as concentrações inicial e final de xilitol ($g\ L^{-1}$) e S_i e S_f correspondem as concentrações inicial e final de xilose ($g\ L^{-1}$).

2.2.8.2 PRODUTIVIDADE VOLUMETRICA DE XILITOL (Q_p)

A produtividade volumétrica de xilitol, a qual expressa a quantidade de xilitol produzida (g/L) por tempo (h) foi calculada de acordo coma seguinte equação:

$$Q_p = \frac{\Delta p}{\Delta t} = \frac{Pf - Pi}{Tf - Ti} \quad (2)$$

Onde P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g L^{-1}) e T_i e T_f correspondem aos tempos inicial e final de fermentação.

2.2.8.3 EFICIÊNCIA DE CONVERSÃO (η)

Este parâmetro fermentativo expresso em % representa a razão entre o fator de conversão ($y_{p/s}$) obtido experimentalmente e o fator de correção teórico de 0,917 $\text{g}_{\text{xol}}/\text{g}_{\text{xse}}$ calculado segundo Barbosa et al. (1988).

2.2.8.4 FATOR DE CONVERSÃO DE D-XILOSE EM BIOMASSA ($Y_{x/s}$)

Esse parâmetro expressa a massa de células (g_{cel}) produzida por massa de xilose consumida, em gramas, e foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{X_f - X_i}{S_f - S_i} \quad (3)$$

Onde S_i e S_f correspondem às concentrações iniciais e finais de xilose (g L^{-1}) e X_i e X_f correspondem à concentração inicial e final de biomassa celular (g L^{-1}).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos tradicionalmente utilizados em ecologia microbiana, baseados na cultura e isolamento dos microrganismos a partir de amostras ambientais, são trabalhosos e mais ou menos seletivos para determinados grupos de microrganismos. Além disso, os isolados obtidos utilizando meios de cultura sólidos poderão constituir apenas uma fração da população devido à presença de células não viáveis ou não cultiváveis nos meios de isolamento, supondo-se que um grande número dos microrganismos, por vezes dominantes nos respectivos habitats, são ainda desconhecidos (MOREIRA; LÓPEZ-GARCÍA 2002).

A metodologia de isolamento tradicional utilizada neste trabalho, devido à sua extrema simplicidade e baixo custo, e embora trabalhosa, constituiu em um excelente ponto de partida para um estudo preliminar sobre as populações de leveduras, consumidoras de D-xilose, presentes em nichos naturais ou industriais, permitindo o isolamento de espécies diversas.

Esta metodologia apresenta, no entanto, algumas limitações: (i) a possibilidade de espécies minoritárias passarem despercebida (com uma densidade celular abaixo dos níveis de detecção), (ii) a composição dos meios de cultura laboratoriais utilizados para o isolamento (ANDREWS; HIRANO 1991).

A partir da torta de filtro resuspendida em água e diluída, foram isoladas vinte e oito leveduras provenientes do ambiente industrial da produção de etanol, com capacidade de consumir D-xilose.

2.3.1 ENSAIOS FERMENTATIVOS

Numa primeira etapa, baseado nos dados de cariotipagem, que identificou vinte e oito isolados como pertencentes ao gênero *Candida*, cinco linhagens, aleatoriamente, foram testadas em três diferentes meios de fermentação sendo escolhidas as seguintes: MVP 03, MVP 15, MVP 16, MVP 22 e MVP 40.

Esses microrganismos foram cultivados em três diferentes meios quimicamente definidos: YNB 6,7 g L⁻¹ acrescido de 20 g L⁻¹ de xilose, UPX (6,6 g L⁻¹ de peptona e 2,3 g L⁻¹ de uréia acrescido de 20 g L⁻¹ de xilose) MCX (KH₂PO₄ 0,62 g L⁻¹

1; $K_2 HPO_4$ 2,0 g L⁻¹; $(NH_4)_2SO_4$ 1,0 g L⁻¹ $MgSO_4$ 1,1 g L⁻¹, extrato de levedura 0.5 g L⁻¹) acrescidos de 20 g L⁻¹ de D-xilose, a 30 °C e 120 rpm.

Neste ensaio foram avaliados a produção de biomassa, consumo de D-xilose, expresso em porcentagem, concentração de xilitol conversão de xilose em xilitol (Y_p/s), produtividade volumétrica de xilitol (Q_p), conversão de D-xilose em biomassa (Y_x/s) e a eficiência de conversão (η) que foi calculado segundo Barbosa et al (1988). Em todos os meios às linhagens testadas produziram xilitol, embora com taxas e rendimentos variados.

O meio de cultura MCX apresentou o melhor produção de biomassa seca, com uma taxa de produção onde a linhagem com a menor produção apresentou 5.68 e a de maior produção foi de 6.43 g L⁻¹ (Figura 6), com uma taxa de produção de xilitol entre 4.35 a 5.36 g L⁻¹ produtividade volumétrica (Q_p) entre 0.04 e 0.07 g L⁻¹ h⁻¹, rendimento (Y_p/s) de 0.11 a 0.21 g g⁻¹, Y_x/s de 0.30 e 0.34 g g⁻¹ e a eficiência de conversão (η) entre 10% a 19% (Tabela 5).

O meio UPX apresentou o melhor rendimento em xilitol, com uma taxa de produção entre 4.35 a 5.36 g L⁻¹ (Figura 7), produtividade volumétrica (Q_p) entre 0.07 e 0.09 g L⁻¹ h⁻¹, rendimento (Y_p/s) de 0.23 a 0.27 g g⁻¹, Y_x/s de 0.20 e 0.24 g g⁻¹ e a eficiência de conversão (η) entre 21 a 26% (Tabela 4). A menor produção de biomassa neste meio de cultura se da devido maior produção de xilitol, por isso definimos que o meio UPX fosse utilizado como base para o próximo ensaio de fermentação.

O meio de cultura YNB em todos os parâmetros apresentou resultados inferiores aos meios MCX e UPX, sendo considerado ineficiente para a produção de xilitol. Os resultados podem ser observados na Tabela 6.

Em todos os meios de cultura testados, o consumo de D-xilose pelas linhagens testadas, variou de 95 % a 100% (Figura 8).

Figura 4 - Produção de biomassa seca em g L^{-1} nos meios de cultura UPX (6,6 g L^{-1} de peptona e 2,3 g L^{-1} D-xilose 20 g L^{-1}); MCX (KH_2PO_4 0,62 g L^{-1} ; K_2HPO_4 2,0 g L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g L^{-1} MgSO_4 1,1 g L^{-1} , extrato de levedura 0.5 g L^{-1} , D-xilose 20 g L^{-1}), YNBX (YNB 6,7 g L^{-1} D-xilose 20 g L^{-1}) a 30°C e 120 rpm, no período de 60 horas de fermentação

Figura 5 - Produção de xilitol em g L⁻¹ nos meios de cultura UPX (6,6 g L⁻¹ de peptona e 2,3 g L⁻¹, D-xilose 20 g L⁻¹); MCX (KH₂PO₄ 0,62 g L⁻¹; K₂ HPO₄ 2,0 g L⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 1,0 g L⁻¹ MgSO₄ 1,1 g L⁻¹, extrato de levedura 0.5 g L⁻¹, D-xilose 20 g L⁻¹), YNBX (YNB 6,7 g L⁻¹ D-xilose 20 g L⁻¹) a 30°C e 120 rpm, no período de 60 horas de fermentação

Figura 6 - Consumo de xilose em g L^{-1} , expresso em porcentagem, nos meios de cultura UPX (6,6 g L^{-1} de peptona e 2,3 g L^{-1} , D-xilose 20 g L^{-1}); MCX (KH_2PO_4 0,62 g L^{-1} ; K_2HPO_4 2,0 g L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g L^{-1} MgSO_4 1,1 g L^{-1} , extrato de levedura 0.5 g L^{-1} , D-xilose 20 g L^{-1}), YNBX (YNB 6,7 g L^{-1} D-xilose 20 g L^{-1}) a 30°C e 120 rpm no período de 60 horas de fermentação

Tabela 4 - Fator de conversão de xilose em xilitol (Y_p/s), produtividade volumétrica de xilitol (Q_p), o fator de conversão de D-xilose me biomassa (Y_x/s) e eficiência de conversão (η) para o cultivo da levedura isoladas *Candida tropicalis* 03; 15; 16; 22; 40 em meio UPX (uréia 2,3 g L⁻¹, peptona 6,6 g L⁻¹, xilose 20 g L⁻¹) a 120 rpm e 30 °C no tempo 60 horas de fermentação

Linhagem	Y_p/s^a	Q_p^b	Y_x/s^c	η^d
<i>C. tropicalis</i> 03	0.27	0.08	0.24	24%
<i>C. tropicalis</i> 15	0.28	0.09	0.23	26%
<i>C. tropicalis</i> 16	0.29	0.09	0.24	26%
<i>C. tropicalis</i> 22	0.23	0.07	0.24	21%
<i>C. tropicalis</i> 40	0.27	0.08	0.20	25%

^a Y_p/s (g g⁻¹) g xilitol produzida /g xilose consumida.

^b Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) produtividade volumétrica de xilitol

^c Y_x/s (g g⁻¹) g massa celular produzida / g de xilose consumida

^d eficiência calculado assumindo que o máximo teórico de 0.917 g g⁻¹ (BARBOSA et al.; 1988).

Tabela 5 - Fator de conversão de xilose em xilitol (Y_p/s), produtividade volumétrica de xilitol (Q_p), o fator de conversão de D-xilose me biomassa (Y_x/s) e eficiência de conversão (η) para o cultivo das leveduras isoladas *Candida tropicalis* 03; 15; 16; 22; 40 em meio MCX (KH₂PO₄ 0,62 g L⁻¹; K₂HPO₄ 2,0 g L⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 1,0 g L⁻¹ MgSO₄ 1,1 g L⁻¹, extrato de levedura 0.5 g L⁻¹ xilose 20 g L⁻¹) a 120 rpm e 30 °C no tempo 60 horas de fermentação

Linhagem	Y_p/s^a	Q_p^b	Y_x/s^c	η^d
<i>C. tropicalis</i> 03	0.19	0.06	0.32	18%
<i>C. tropicalis</i> 15	0.15	0.05	0.30	14%
<i>C. tropicalis</i> 16	0.13	0.04	0.34	12%
<i>C. tropicalis</i> 22	0.11	0.04	0.34	10%
<i>C. tropicalis</i> 40	0.21	0.07	0.33	19%

^a Y_p/s (g g⁻¹) g xilitol produzida /g xilose consumida.

^b Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) produtividade volumétrica de xilitol

^c Y_x/s (g g⁻¹) g massa celular produzida / g de xilose consumida

^d eficiência calculado assumindo que o máximo teórico de 0.917 g g⁻¹ (BARBOSA et al.; 1988).

Tabela 6 - Fator de conversão de xilose em xilitol (Y_p/s), produtividade volumétrica de xilitol (Q_p), o fator de conversão de D-xilose em biomassa (Y_x/s) e eficiência de conversão (η) para o cultivo das leveduras isoladas *Candida tropicalis* 03; 15; 16; 22; 40 em meio YNBX (YNB 6,7 g L⁻¹, xilose 20 g L⁻¹) a 120 rpm e 30°C no tempo 60 horas de fermentação

Linhagem	Y_p/s^a	Q_p^b	Y_x/s^c	η^d
<i>C. tropicalis</i> 03	0.10	0.03	0.36	9%
<i>C. tropicalis</i> 15	0.10	0.00	0.31	9%
<i>C. tropicalis</i> 16	0.14	0.04	0.30	12%
<i>C. tropicalis</i> 22	0.12	0.03	0.28	11%
<i>C. tropicalis</i> 40	0.14	0.04	0.23	13%

^a Y_p/s (g g⁻¹) g xilitol produzida / g xilose consumida.

^b Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) produtividade volumétrica de xilitol

^c Y_x/s (g g⁻¹) g massa celular produzida / g de xilose consumida

^d eficiência calculado assumindo que o máximo teórico de 0.917 g g⁻¹ (BARBOSA et al.; 1988).

O método de cariotipagem apresenta uma eficiência de identificação ao nível de gênero, e como as vinte e oito leveduras isoladas foram classificadas como pertencentes ao mesmo gênero, com o intuito de refinar a classificação, os vinte e oito isolados foram posteriormente identificados pela análise baseada na comparação de sequências da região D1/D2 do gene do rDNA 26S, sendo que 100% dos isolados pertencentes ao gênero *Candida*, 24 (85.71%) *Candida tropicalis* e 4 (14.29%) *Candida rugosa*.

2.3.2 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS DE DNA E CONSTRUÇÃO DE ÁRVORES FILOGENÉTICAS

Na identificação molecular, o sequenciamento da região D1/D2 do gene do rDNA 26s das leveduras isoladas de torta de filtro obteve-se uma sequência média de 412 pb. Ao realizar o alinhamento simples com as sequências disponíveis no GenBank, com auxílio do BLASTn, os isolados apresentaram 99% a 100% de variação na identidade e similaridade com as espécies *C. tropicalis* ou *C. rugosa* e E-value de 0 a 3e⁻¹⁶⁰ (tabela 3).

Tabela 3 – Identificação dos isolados comparando com as sequencias do Gen bank

Isolado	Identificação	Gen bank	Coverage	e-value	Max ident.
MVP 03*	<i>C.tropicalis</i>	FJ947158	100%	0.0	100%
MVP 15	<i>C.tropicalis</i>	FJ947158	99%	0.0	99%
MVP 06	<i>C.tropicalis</i>	FJ947158	100%	0.0	99%
MVP 16*	<i>C.tropicalis</i>	FJ516747	99%	0.0	99%
MVP 07	<i>C.tropicalis</i>	AB500889	99%	0.0	99%
MVP 09	<i>C.tropicalis</i>	AB500889	100%	0.0	99%
MVP 10	<i>C.tropicalis</i>	AB500210	100%	3e-160	100%
MVP 26	<i>C.tropicalis</i>	AB500889	100%	0.0	98%
MVP 34	<i>C.tropicalis</i>	AB438119	99%	0.0	98%
MVP 27	<i>C.tropicalis</i>	AB499016	99%	0.0	99%
MVP 35	<i>C. rugosa</i>	AB437389	100%	0.0	99%
MVP 28	<i>C.tropicalis</i>	FJ665620	100%	0.0	99%
MVP 29	<i>C.tropicalis</i>	FJ665624	100%	0.0	99%
MVP 37	<i>C.tropicalis</i>	AB500889	100%	0.0	98%
MVP 30	<i>C.tropicalis</i>	AB500210	100%	0.0	98%
MVP 39	<i>C.tropicalis</i>	AB499016	100%	0.0	99%
MVP 17*	<i>C. rugosa</i>	AB437389	100%	0.0	99%
MVP 40*	<i>C.tropicalis</i>	FJ947158	100%	0.0	98%
MVP 19	<i>C.tropicalis</i>	FJ665620	99%	0.0	99%
MVP 12	<i>C.tropicalis</i>	FJ827136	100%	0.0	99%
MVP 13	<i>C.tropicalis</i>	AB500889	100%	0.0	99%
MVP 21*	<i>C. rugosa</i>	AB498988	100%	0.0	99%
MVP 14	<i>C.tropicalis</i>	FJ483907	100%	0.0	99%
MVP 22	<i>C.tropicalis</i>	AB498989	100%	0.0	99%
MVP 23	<i>C.tropicalis</i>	FJ485700	100%	0.0	99%
MVP 24	<i>C. rugosa</i>	AB437389	100%	0.0	99%
MVP 32	<i>C.tropicalis</i>	EF550184	99%	0.0	98%
MVP 25	<i>C.tropicalis</i>	EU293420	99%	0.0	99%
MVP 33	<i>C.tropicalis</i>	AB498989	100%	0.0	98%

* isolados usados nos ensaios de fermentação.

Figura 5 - Árvore filogenética baseada na análise da sequência nucleotídica da região D1/D2 do gene rDNA 26S de membros o gênero *candida* obtida com o método *neighbor-joining*, com um bootstrap com 1000 repetições

2.3.3 UTILIZAÇÃO DE D-XILOSE E PRODUÇÃO DE XILITOL EM MEIO UPX

Num segundo ensaio para a fermentação de D-xilose foi realizado utilizando cinco leveduras selecionadas baseado no sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S rDNA sendo elas: *Candida tropicalis* MVP 03, *Candida tropicalis* MVP 16, *Candida tropicalis* MVP 40 e *Candida rugosa* MVP 17, *Candida rugosa* MVP 21 e três leveduras pertencentes a coleção do laboratório de bioquímica de fermentação do departamento de ciências biológicas da ESALQ/USP sendo elas: *Candida guilliermondii* FTI 20037, *Kluyveromyces marxianus* IZ 1339 e *Candida tropicalis* IZ 1824 como controle positivo descritas na literatura.

A fermentação de xilose pelas várias linhagens selecionadas acima, foram realizadas em meio UPX e os parâmetros utilizados para a avaliação do processo foram, produção de biomassa, consumo de D-xilose e concentração final de xilitol. A máxima produção de biomassa seca foi verificada na levedura isolada *Candida tropicalis* MVP 16 que apresentou $6,47 \text{ g L}^{-1}$ e a menor produção foi encontrada na levedura isolada *Candida rugosa* MVP 17 que apresentou $3,72 \text{ g L}^{-1}$ dados referente ao tempo de 72 horas de fermentação. (Figura 9).

Figura 7 - Produção de biomassa seca em g L^{-1} em meio UPX (uréia $2,3 \text{ g L}^{-1}$, peptona $6,6 \text{ g L}^{-1}$, xilose 50 g L^{-1}), nos tempos 24, 48, 72, 96 horas de fermentação.

A maior produção de xilitol foi observada na levedura *Candida tropicalis* MVP 16, que apresentou uma produção de $33,67 \text{ g L}^{-1}$, durante 72 horas de fermentação (Figura 10), tempo esse onde a D-xilose foi 100% consumida (Figura 11). A diminuição na concentração de xilitol no tempo 96 horas se deve ao fato de o xilitol ter sido consumido pela levedura *Candida tropicalis* MVP 16 para produção de outros metabólitos. A levedura *Candida rugosa* MVP 17 apresentou o menor rendimento em xilitol, apresentando uma produção máxima de $1,01 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 10), no tempo de 72 horas e onde a D-xilose ainda não havia sido totalmente consumida (Figura 11).

Figura 8 - Produção de xitol pelas leveduras *C. tropicalis* IZ 1824, MVP 03, MVP 16, MVP 40, *Cândida rugosa* MVP 17 e 21, *K. marxianus* IZ 1339 e *C. guilliermondii* em meio UPX (uréia $2,3 \text{ g L}^{-1}$, peptona $6,6 \text{ g L}^{-1}$, xilose 50 g L^{-1}), nos tempos 24, 48, 72, 96 horas de fermentação

Das oito leveduras testadas, quatro (*C. tropicalis* MVP 03; MVP 16; MVP 40 e *C. guilliermondii* FTI-20037) consumiram 100% da D-xilose em 72 horas de fermentação (Figura 11). As outras quatro linhagens mostraram-se menos eficientes na utilização do

substrato, apresentou um consumo muito lento variando entre 33% a 80% num período de 96 horas de fermentação. *C. rugosa* MVP 17 apresentou o pior desempenho consumindo apenas 33% do substrato.

Figura 9 - Consumo de D-xilose, expresso em porcentagem, pelas leveduras *C. tropicalis* IZ 1824, MVP 03, MVP 16, MVP 40, *Cândida rugosa* MVP 17 e 21, *K. marxianus* IZ 1339 e *C. guilliermondii* em meio UPX (uréia 2,3 g L⁻¹, peptona 6,6 g L⁻¹, xilose 50 g L⁻¹) nos tempos 24, 48, 72, 96 horas de fermentação

Para os cinco isolados, *Candida tropicalis* MVP 03, *Candida tropicalis* MVP 16, *Candida tropicalis* MVP 40 e *Candida rugosa* MVP 17, *Candida rugosa* MVP 21, a produção de xilitol variou de 5,76 a 35,36 g L⁻¹, a partir de 50 g L⁻¹ de D-xilose com produtividade volumétrica (QP) entre 0,06 a 0,35 g L⁻¹ h⁻¹, fator de conversão de xilose em xilitol (Yp/s) entre 0,14 a 0,65 g g⁻¹ e fator de conversão de D-xilose em biomassa (Yx/s) entre 0,08 a 0,29 g g⁻¹. Destacou-se a levedura *C. tropicalis* 16, produzindo 32,36 g L⁻¹ de xilitol com produtividade volumétrica (Qp) de 0,35 g L⁻¹ h⁻¹, fator de conversão de xilose em xilitol (Yp/s) 0,65 g g⁻¹, fator de conversão de D-xilose em biomassa (Yx/s) de 0,11 g g⁻¹ e fator de conversão (η) de 62%.

Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 7; 8; 9 e 10. As maiores produções de xilitol, juntamente com uma eficiência de 100% na utilização de D-xilose no período de 72 horas, foram encontrados nos isolados *Candida tropicalis* MVP03, *Candida tropicalis* MVP16, *Candida tropicalis* MVP40.

Esses rendimentos em xilitol foram substancialmente superior, nessas condições de cultivo, aos coeficientes de rendimentos Y_p/s de $0,51 \text{ g g}^{-1}$; Y_x/s de $0,09 \text{ g g}^{-1}$; Q_p de $0,27 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e um fator de conversão (η) 47% encontrado com a cepa de referência *C. guilliermondii* FTI 20037 uma das leveduras mais utilizadas ate agora para a produção de xilitol.

Tabela 7 - Parâmetros fermentativos para o cultivo das linhagens em meio UPX (uréia $2,3 \text{ g L}^{-1}$, peptona $6,6 \text{ g L}^{-1}$ e xilose 50 g L^{-1}) a 120 rpm e 30°C no tempo 24 horas de fermentação

Linhagens	Y_p/s^a	Q_p^b	Y_x/s^c	η^d
<i>K. marxianus</i> IZ 1339	0.45 ± 0.071	0.23 ± 0.065	0.22 ± 0.057	24 %
<i>C. tropicalis</i> IZ 1824	0.16 ± 0.019	0.18 ± 0.010	0.09 ± 0.024	41 %
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	0.61 ± 0.011	0.63 ± 0.012	0.10 ± 0.002	56 %
<i>C. tropicalis</i> MVP 03	0.69 ± 0.012	0.68 ± 0.017	0.10 ± 0.006	63 %
<i>C. tropicalis</i> MVP 40	0.67 ± 0.033	0.57 ± 0.019	0.13 ± 0.003	62 %
<i>C. tropicalis</i> MVP 16	0.74 ± 0.090	0.52 ± 0.08	0.18 ± 0.020	57 %
<i>C. rugosa</i> MVP 17	0.05 ± 0.006	0.01 ± 0.002	0.46 ± 0.065	8 %
<i>C. rugosa</i> MVP 21	0.04 ± 0.008	0.01 ± 0.001	0.54 ± 0.059	3 %

^a Y_p/s (g g^{-1}) g xilitol produzida /g xilose consumida.

^b Q_p ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) produtividade volumétrica de xilitol

^c Y_x/s (g g^{-1}) g massa celular produzida / g de xilose consumida

^d eficiência calculado assumindo que o máximo teórico de 0.917 g g^{-1} (BARBOSA et al.; 1988).

Tabela 8 - Parâmetros fermentativos para o cultivo das linhagens em meio UPX (uréia 2,3 g L⁻¹, peptona 6,6 g L⁻¹ e xilose 50 g L⁻¹) a 120 rpm e 30 °C no tempo 48 horas de fermentação

Linhagens	Yp/s ^a	Qp ^b	Yx/s ^c	η ^d
<i>K. marxianus</i> IZ 1339	0.35 ± 0.086	0.14 ± 0.016	0.19 ± 0.030	32 %
<i>C. tropicalis</i> IZ 1824	0.22 ± 0.004	0.13 ± 0.010	0.12 ± 0.049	20 %
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	0.65 ± 0.128	0.60 ± 0.051	0.09 ± 0.010	59 %
<i>C. tropicalis</i> MVP 03	0.61 ± 0.014	0.61 ± 0.008	0.09 ± 0.004	55 %
<i>C. tropicalis</i> MVP 40	0.60 ± 0.056	0.53 ± 0.086	0.11 ± 0.005	55 %
<i>C. tropicalis</i> MVP 16	0.72 ± 0.020	0.65 ± 0.05	0.11 ± 0.005	66 %
<i>C. rugosa</i> MVP 17	0.06 ± 0.010	0.01 ± 0.002	0.28 ± 0.018	6 %
<i>C. rugosa</i> MVP 21	0.07 ± 0.005	0.01 ± 0.001	0.38 ± 0.045	9 %

^a Yp/s (g g⁻¹) g xilitol produzida /g xilose consumida.

^b Qp (g L⁻¹ h⁻¹) produtividade volumétrica de xilitol

^c Yx/s (g g⁻¹) g massa celular produzida / g de xilose consumida

^d eficiência calculado assumindo que o máximo teórico de 0.917 g g⁻¹ (BARBOSA et al.; 1988).

Tabela 9 - Parâmetros fermentativos para o cultivo das linhagens em meio UPX (uréia 2,3 g L⁻¹, peptona 6,6 g L⁻¹ e xilose 50 g L⁻¹) a 120 rpm e 30 °C no tempo 72 horas de fermentação

Linhagens	Yp/s ^a	Qp ^b	Yx/s ^c	η ^d
<i>K. marxianus</i> IZ 1339	0.29 ± 0.013	0.10 ± 0.003	0.16 ± 0.012	26 %
<i>C. tropicalis</i> IZ 1824	0.14 ± 0.009	0.07 ± 0.002	0.11 ± 0.025	13 %
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	0.47 ± 0.035	0.33 ± 0.026	0.09 ± 0.001	43 %
<i>C. tropicalis</i> MVP 03	0.55 ± 0.031	0.39 ± 0.021	0.09 ± 0.002	51 %
<i>C. tropicalis</i> MVP 40	0.58 ± 0.008	0.41 ± 0.005	0.10 ± 0.002	53 %
<i>C. tropicalis</i> MVP 16	0.68 ± 0.020	0.47 ± 0.02	0.12 ± 0.010	62 %
<i>C. rugosa</i> MVP 17	0.06 ± 0.013	0.01 ± 0.001	0.28 ± 0.053	6 %
<i>C. rugosa</i> MVP 21	0.09 ± 0.009	0.02 ± 0.001	0.35 ± 0.016	8 %

^a Yp/s (g g⁻¹) g xilitol produzida /g xilose consumida.

^b Qp (g L⁻¹ h⁻¹) produtividade volumétrica de xilitol

^c Yx/s (g g⁻¹) g massa celular produzida / g de xilose consumida

^d eficiência calculado assumindo que o máximo teórico de 0.917 g g⁻¹ (BARBOSA et al.; 1988).

Tabela 10 - Parâmetros fermentativos para o cultivo das linhagens em meio UPX (uréia 2,3 g L⁻¹, peptona 6,6 g L⁻¹ e xilose 50 g L⁻¹) a 120 rpm e 30°C no tempo 96 horas de fermentação

Linhagens	Yp/s ^a	Qp ^b	Yx/s ^c	η ^d
<i>K. marxianus</i> IZ 1339	0.26 ± 0.029	0.09 ± 0.008	0.13 ± 0.009	24 %
<i>C. tropicalis</i> IZ 1824	0.14 ± 0.005	0.06 ± 0.003	0.10 ± 0.007	13 %
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	0.51 ± 0.023	0.27 ± 0.014	0.09 ± 0.007	47 %
<i>C. tropicalis</i> MVP 03	0.61 ± 0.028	0.33 ± 0.018	0.08 ± 0.003	56 %
<i>C. tropicalis</i> MVP 40	0.60 ± 0.040	0.32 ± 0.023	0.09 ± 0.005	55 %
<i>C. tropicalis</i> MVP 16	0.67 ± 0.040	0.34 ± 0.020	0.11 ± 0.002	61 %
<i>C. rugosa</i> MVP 17	0.06 ± 0.005	0.01 ± 0.001	0.22 ± 0.001	6 %
<i>C. rugosa</i> MVP 21	0.09 ± 0.008	0.02 ± 0.001	0.28 ± 0.011	8 %

^a Yp/s (g g⁻¹) g xilitol produzida /g xilose consumida.

^b Qp (g L⁻¹ h⁻¹) produtividade volumétrica de xilitol

^c Yx/s (g g⁻¹) g massa celular produzida / g de xilose consumida

^d eficiência calculado assumindo que o máximo teórico de 0.917 g/g (BARBOSA et al.; 1988).

O presente estudo demonstrou que todas as leveduras testadas foram capazes de produzir quantidades variadas de xilitol no meio de cultura UPX. Isto indica que a produção de xilitol é uma característica comum entre as leveduras que utilizam D-xilose, tal como sugerido por outros trabalhos. (GONG et al., 1983).

Meyral et al., 1991, avaliaram a fermentação em *C. guilliermondii* com concentrações de D-xilose variando de 10 g L⁻¹ a 300 g L⁻¹. O aumento na concentração inicial de D-xilose resultou no aumento correspondente na produção de xilitol, sendo que os melhores resultados obtidos foram com 300 g L⁻¹. Bons resultados foram obtidos em triagem realizada por Ikeuchi et al (1999). *Candida* sp 559-9 destacou-se com produção de 204 g L⁻¹ de xilitol a partir de 250 g L⁻¹ de D-xilose após 5 dias de incubação, com uma eficiência de conversão igual a 92,7% (considerando o valor teórico de produção de xilitol a partir de D-xilose, pelo balanço das equações do metabolismo, igual a 0,912). Silva e Roberto (1999) demonstraram que aumentos na concentração de D-xilose de 60 para 120 g L⁻¹ reduziram drasticamente a produção de xilitol em *C. guilliermondii*. Tal

redução foi atribuída a efeitos osmofílicos, repressão das enzimas que metabolizam D-xilose e a presença de substâncias inibitórias no hidrolisado hemicelulósico. A pressão osmótica exercida por concentrações de D-xilose acima de 300 g L^{-1} pode interferir com a produção de xilitol (SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998).

Um rendimento (Y_p/s) de $0,62 \text{ g g}^{-1}$ na produção de xilitol foi registrado para *Candida mogii* ATCC 18364 e, segundo Sirisansaneeyakul et al. (1995), esta levedura foi considerada como boa produtora de xilitol. *Candida tropicalis* ASM III (NRRL-Y 27290), isolada de silagem de milho demonstrou ser uma promissora linhagem para a produção de xilitol com um rendimento (Y_p/s) de $0,88 \text{ g g}^{-1}$ (ALTAMIRANO, 2000). Experimentos conduzidos por Chun-Han Ko et al., (2008) apresentou *Candida tropicalis* com o maior rendimento (Y_p/s) de $0,79 \text{ g g}^{-1}$ em 48 horas de fermentação. Fermentações adicionais com *Candida tropicalis* alcançaram valores (Y_p/s) de $0,60$ e $0,39 \text{ g g}^{-1}$ após 96 e 72 horas, usando uréia e farelo de soja como fontes de nitrogênio, respectivamente. Uma cultura de *Candida guilliermondii* cultivada em meio com 300 g L^{-1} de xilose acumulou 221 g de xilitol em 406 horas de fermentação, a uma taxa (Q_p) de $0,54 \text{ g L h}^{-1}$ e um rendimento (Y_p/s) de $0,73 \text{ g g}^{-1}$ (MEYRIAL et al., 1991). Esta parece ser a maior concentração de xilitol alcançada em meio sintético e o maior crescimento relativo (ZAGUSTINA et al 2001). A maior taxa de produção de xilitol foi conseguida com a utilização de *Candida tropicalis*: 94 g L^{-1} após 32 horas, em uma concentração de xilose de 150 g L^{-1} em fermentador de 3 litros, a máxima produção de xilitol por *Candida peltala* NRRL-Y 6888 foi observada em 50 g L^{-1} de D-xilose, pH 6,0 e 28°C (SAHA; BOTHAST, 1999). A produção de xilitol por *Candida parapsilosis* foi investigada em regime de batelada alimentada, usando substratos açucarados de composição simples (xilose) e apresentou um rendimento (Y_p/s) de $0,23 \text{ g g L}^{-1}$ (FURLAN; CASTRO, 2001). Espécies de leveduras *Candida* foram examinadas por West (2009) quanto a sua capacidade de produção de xilitol a partir de um meio contendo hidrolisado de capim. Das espécies selecionadas, *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. guilliermondii* ATCC 20216 apresentaram as maiores taxas de produção de xilitol após 120 horas de fermentação.

Em seus estudos Barbosa et al. (1988) avaliaram 44 linhagens de cinco gêneros diferentes para a produção de xilitol, em meio de cultura YNB acrescido de 30 g L^{-1} de D-xilose, a 30°C e agitação de 150 rpm durante 48 horas de fermentação. Dentre essas

as leveduras *Candida guilliermondii* FTI 20037 apresentou uma produção 16 g L⁻¹ de xilitol, 10 g L⁻¹ de biomassa, com um consumo de 100% da D-xilose, *Candida tropicalis* IZ 1824 apresentou uma produção 15 g L⁻¹ de xilitol, 11 g L⁻¹ de biomassa, com um consumo de 100% da D-xilose e *Kluyveromyces marxianus* IZ 1339 não foi determinada a produção de xilitol, com um consumo de 91% da D-xilose e 11 g L⁻¹ de biomassa.

Neste trabalho a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 apresentou uma produção 28.86 g L⁻¹ de xilitol, 4,39 g L⁻¹ de biomassa, com um consumo de 94% da D-xilose. *Candida tropicalis* IZ 1824 apresentou uma produção 6.18 g L⁻¹ de xilitol, 3.71 g L⁻¹ de biomassa, com um consumo de 56% da D-xilose. *Kluyveromyces marxianus* IZ 1339 apresentou uma produção 6.50 g L⁻¹ de xilitol, 3.77 g L⁻¹ de biomassa, com um consumo de 37% da D-xilose no período de 48 horas de fermentação.

Apesar de várias triagens já realizadas, não podemos comparar os resultados obtidos ao considerar que os meios e as condições do cultivo são diferentes para cada trabalho. Nesta primeira etapa do trabalho, o rendimento de xilitol obtido na triagem foi alto e justifica-se a utilização das leveduras isoladas do ambiente industrial de produção de etanol (torta de filtro) na produção de xilitol em maior escala. Entretanto, é possível melhorar este processo, definindo e otimizando as condições reguladoras da bioconversão.

Os resumos cinéticos das fermentações estão apresentados nas tabelas 11; 12; 13. As cinéticas demonstram que as leveduras *Candida tropicalis* MVP 03 e *Candida guilliermondii* FTI 20037 possuem as mesmas características fermentativas confirmando a reclassificação de *Candida guilliermondii* FTI 20037 como sendo uma *Candida tropicalis* proposta por Lima et al. (2003).

Tabela 11 - Tempo estimado em horas para o consumo total de D-xilose UPX (uréia 2,3 g L⁻¹, peptona 6,6 g L⁻¹ e xilose 50 g L⁻¹) a 120 rpm e 30°C

LEVEDURAS	HORAS
<i>Kluyveromyces marxianus</i> IZ 1339	153
<i>Candida tropicalis</i> IZ 1824	107
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	51
<i>Candida tropicalis</i> MVP 03	51
<i>Candida tropicalis</i> MVP 40	58
<i>Candida tropicalis</i> MVP 16	61
<i>Candida rugosa</i> MVP 17	114
<i>Candida rugosa</i> MVP 21	260

Tabela 12 - Tempo estimado em horas para a máxima produção de xilitol em meio UPX (uréia 2,3 g L⁻¹, peptona 6,6 g L⁻¹ e xilose 50 g L⁻¹) a 120 rpm e 30°C

LEVEDURAS	HORAS
<i>Kluyveromyces marxianus</i> IZ 1339	24
<i>Candida tropicalis</i> IZ 1824	43
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	46
<i>Candida tropicalis</i> MVP 03	46
<i>Candida tropicalis</i> MVP 40	47
<i>Candida tropicalis</i> MVP 16	52
<i>Candida rugosa</i> MVP 17	NÃO POSSUI
<i>Candida rugosa</i> MVP 21	NÃO POSSUI

Tabela 13 - Tempo estimado em horas para estabilização da produção de biomassa em meio UPX (uréia 2,3 g L⁻¹, peptona 6,6 g L⁻¹ e xilose 50 g L⁻¹) a 120 rpm e 30 °C

LEVEDURAS	HORAS
<i>Kluyveromyces marxianus</i> IZ 1339	26
<i>Candida tropicalis</i> IZ 1824	56
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	47
<i>Candida tropicalis</i> MVP 03	47
<i>Candida tropicalis</i> MVP 40	55
<i>Candida tropicalis</i> MVP 16	73
<i>Candida rugosa</i> MVP 17	47
<i>Candida rugosa</i> MVP 21	49

3 CONCLUSÃO

- O isolamento de leveduras de resíduos agroindustriais (torta de filtro) apresentou grande potencial na obtenção de leveduras adaptadas para bioconversão de D-xilose em xilitol.

- As leveduras isoladas *C. tropicalis* MVP 03, *C. tropicalis* MVP 16 e *C. tropicalis* MVP 40, diante dos resultados obtidos se apresentam como excelentes produtoras de xilitol a partir de D-xilose.

- Apesar do potencial das linhagens isoladas, a produção de xilitol, somente será economicamente viável, diante de um processo de hidrólise de materiais lignocelulósicos eficiente e baixo custo, tanto para a hidrólise como para a aquisição da matéria prima.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, W.B.; ANDRADE, C.M.M.C.; ANTUNES, J.G.; ARAÚJO, O.Q.F.; BRITO, F.H.X.; DAMACO, M.C.T.; FARIA, L.F.; FONSECA, M.C.C.; GIMENES, M.A.P.; GUERRANTE, M.F.; LEAL, M.L.M.; LEMOS, J.L.S.; MOTTA, R.P.A.; NÓBREGA, R.; SÁ, M.C.A.; SILVA, M.L.A.; PEREIRA, N. BIOTECNOLOGIA DE HEMICELULOSE. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 4, Rio de Janeiro. 1999 p.71- 76.

AKINTERINWA, O., KHANKAL, R., CIRINO, P.C. Metabolic engineering for biproduction of sugar alcohols **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 19 n.5, pp. 461-467, 2008.

ALTAMIRANO, F.; VÁZQUEZ, L.I.C. Isolation and Identification of Xylitol-Producing Yeasts from Agricultural Residues **Folia Microbiology**, Prague, v. 45 n. 3, pp. 255-258, 2000.

ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A. E.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.70-72, p.89-97, 1998.

AMARAL-COLLAÇO, M. T., GIRIO, F. M. ; PEITO, M. A. In: COUGHLAN, M. P. **Enzyme systems for lignocellulosic degradation**. London : Elsevier, 1989. p. 221-230.

ANDREWS J. H.; HIRANO S. S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Elsevier, 1991. (Springer Series in Contemporary Bioscience)

ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 11, p. 187-198, 2000.

AZUMA M., IKEUCHI T., KIRITANI R., KATO J., OOSHIMA H. Increase in xylitol production by *Candida tropicalis* upon addition of salt. **Biomass and Bioenergy**, New York v. 19 p.129-135, 2000.

BANDONI, R. J. Taxonomic overview of the Tremellales. **Studies in Mycology**, Utrecht, V. 30, p. 87-110, 1987

BAR, A. Xylitol. In: NABORS, L. O. ;GELARDI, R. C. 2 ed th. **Alternative sweetener**, New York., Marcel Dekker 1991.p. 349-379.

BARBOSA, M.F.S., M.B. DE MEDEIROS; I.M. DE MANCILHA; H. SCHNEIDER; H. LEE. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect

xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, San Diego, v. 3 p.241-251, 1988.

BARNETT, J.; PAYNE, R.; YARROW, D.. **Yeasts**: characteristics and identification. 4ed th. Cambridge: Cambridge University Press. 2003.

BEUTLER, H.O. Xylitol. In: BERGMAYER H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 3rd ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1984 v.6, p.484-490.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.3, n.11,p.286-289, 1985.

BJORLING, T.; B. LINDMAN.. Evaluation of xylose fermenting yeasts for ethanol production from spent sulfite liquor. **Enzyme and Microbiology Technology**, Oxford, V.11 p. 240-246. 1989.

BRUINENBERG, P., DE BOT, P. H. M.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.19, n.04, p.256-260, 1984.

CACCHIO, P.; ERCOLE, C.; VEGLIO, F.; LEPIDI, A. Cellulose enzymatic hydrolysis of wheat straw after solid-state pre-treatment by *Trametes trogii* a factorial study. **Annals of Microbiology**, Milan, v. 51, p. 215-224, 2001.

CAYLE, T., ROLAND,J., MEHNERT, D., DINWOODIE, R., LARSON,R., MATHERS, J., RAINES, M., ALM, W., MAAYEH, S., KIANG, S., SAUNDERS, R., production of L-ascorbic acid from whey, In: HARLANDE,S.K.; LABUZA , T.P. **Biotechnology in food processing**. New Jersey: Noyes Publication, 1986. p.157-169.

CHUN-HAN KO , PEI-CHUN CHIU , CHIN-LIN YANG , KENG-HAO CHANG - Xylitol conversion by fermentation using five yeast strains and polyelectrolyte-assisted ultrafiltration. **Biotechnology Letters**,Heideuberg, v. 30 p. 81–86, 2008.

CLAMP, M.; CUFF, J.; SEARLE, S.M.; BARTON, G.J. The jalview java alignment editor. **Bioinformatics**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 426-427, Fev. 2004.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMINGUEZ, J. M. Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton v. 82, p.141-151, 1999.

CRAFT D.L., MADDRURI, K.M., ESHOO, M., WILSON, C.R., identification and characterization of the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC20336, important for

conversion of fatty acids and alkanes to alpha, omega-dicarboxylic acids **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v.63 p. 5883-5891, 2003.

CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Xylitol production from barley bran hydrolysates by continuous fermentation with *Debaryomyces hansenii*. **Biotechnology Letters**, Heideuberg, n.22, p.1895-1898, 2000.

CUNHA, LSC. **Uso do xilitol como agente anticariogênico**. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru/Universidade de São Paulo. 2003.

DAHIYA J.S. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose. **Canadian Journal Microbiology**, Saskatoon, v.37, p.14-18, 1991.

DITZELMULLER, G., KUBICEK, C. P., WOHRER, W. & ROHR, M. Xylitol dehydrogenase from *Pachysolen tannophilus*. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 25, p.195-198, 1984.

DOMINGUEZ, J. M.; CRUZ, J. M.; ROCA, E.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Xylitol production from wood hydrolysates by entrapped *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.81, p.119-130, 1999.

DOMINGUEZ, J.M., N.J. CAO, C.S. GONG, AND G.T. TSAO.. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton v. 57/8 p. 49-56, 1996.

DU PREEZ, J.C., M. BOSCH, AND B.A. PRIOR.. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Clifton, v. 23 p. 228-233, 1986.

DU TOIT, P.J.; OLIVIER, S.P.; VAN BILJON, P.L. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide. Hemicellulose and amino acid composition. **Biotechnology and Bioengineering**, Berkeley, v.26, p.1071-1078, 1984.

DU TOIT, P.J.; OLIVIER, S.P.; VAN BILJON, P.L. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide. Hemicellulose and amino acid composition. **Biotechnology and Bioengineering**, Berkeley, v.26, p.1071-1078, 1984.

ELIASSEN, A., BOLES, E., JOHANSSON, B., OSTERBERG, M., B THEVELEIN, J.M., SPENCER-MARTINS, I., JUHNKE, H., AND HAHN-HAGERDAL, B., Xylulose fermentation by mutant and wild-type strains of *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Clifton, v. 53, no. 4, pp. 376–382, 2000.

ERIKSSON, O. E., WINKA, K.. Supraordinal taxa of Ascomycota. **Myconet**, Chicago v.1 p. 1-16, 1997.

FARIA L.F., GIMENES M.A., NOBREGA R. AND PEREIRA N.J.. Influence of oxygen availability on cell growth and xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 98 p. 449–458, 2002.

FELL, J. W., BOEKHOUT, T., FONSECA, Á., SCORZETTI, G., STATZELL-TALLMAN, A.. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Giessen, v. 50 p. 1351-1371, 2000.

FELL, J. W. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Giessen v. 51 p. 687-697, 2001.

FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. Glucoses isomerases. **Microbial Enzymes and Biotechnology**, ed.2, p.199-220, 1990

FRAZER, F. R.; MCCASKEY, T. A. Wood hydrolyzate treatments for improved fermentation of wood sugars to 2,3-butanediol. **Biomass and Bioenergy**, Oxford p.31-42, 1989.

FURLAN S. A.; CASTRO H.F Xylitol Production by *Candida parapsilosis* under Fed-Batch Culture. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, Curitiba, V. 44, n. 2 , pp. 125 – 128, 2001.

GHANEM K.M., SABRY S.A., GAMATI S.Y. Physiological study on riboflavin production by hydrocarbon utilizing *candida guilliermondii*. **International Journal of Medical Microbiology**, Berlin, V.147 n.3-4 pp. 283-287 1992.

GILFILLAN G.D. SULIVAN D.J. HAYNES K. PARKINSON T. COLEMAN D.C. GOW N.A.R.. 1998. *Candida dubliniensis* phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology**, Dublin , v.144 p. 829-838

GIMENES MA, CARLOS LC, FARIA LF, PEREIRA N JR,. oxygen uptake rate in production of xylitol by *candida guilliermondii* with different aeration rates and initial xilose concentration .**Applied Biochemistry And Biotechnology**, Berlin v.98-100 p.1049-1059, 2002.

GIRIO, F. M., PEITO, M. A.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Biomass for Energy and Industry, In GRASSI, G., GOSSE, G. DOS SANTOS, G (ed) New York. **Elsevier Applied Science**. 1990 v. 2.

GIRIO, F. M.; PEITO, M. A.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Enzymatic and physiological study of d-xylose metabolism by *Candida shehatae* **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin v.32, n.2, p.199-204 1989.

GONG C.S., CHEM L.F., TSAO G.T. Quantitative production of xylitol from d-xylose by a high xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis*, HXP 2. **Biotechnology Letters**, Heidelberg, v. 3 p.130–135, 1983.

GONG, C.S., CLAYPOOL, T.A., McCrackem, L.D., MAUN, C.M., VENG, P.P., TSAO, G.T. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, Berkeley, v.15 p. 85-102 1983.

GRANSTROM T.B., IZUMORI K.; LEISOLA M. A rare sugar xylitol. Part II. Biotechnological production and future applications of xylitol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin v. 74 p. 273–276 2007.

GUÉHO, E., KURTZMAN, C. P., PETERSON, S. W. Evolutionary affinities of heterobasidiomycetous yeasts estimated from 18S and 25S RNA sequence divergence. **Systematic and Applied Microbiology**, Freising, v.12, p. 230-236, 1989.

GURGEL, P. V.; FURLAN, S. A.; MARTINEZ, S. E. R.; MANCILHA, I. M. Evaluation of sugarcane bagasse acid hydrolyzate treatments for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo v.15, n.3, p. 309-312, 1998.

HAHN-HAGERDAL, B. H.; JEPPSON, K.; SKOOG, B.; A. PRIOR. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast. **Enzyme Microbiology and Technology** Atlanta, v.16 p.933-943, 1994

HESPELL, R. B., Q'BRYAN, P. J. ; MONIRUZZAMAN, M.; BOTHAST. R. J. Hydrolysis by commercial enzyme mixtures of AFEX-treated corn fiber and isolated xylans. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 62,,p. 87-96, 1997.

HOLTZAPPLE, M.T., J.-H. JUN, G. ASHOK, S.L. PATIBANDLA, B.E. DALE.. The ammonia freeze explosion (AFEX) process. A practical lignocellulose pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 28/29 p. 59-74, 1991.

HYVÖNEM, L.; KOIVISTONEN, P.; VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. **Advances In Food Research**, San Diego, v.28, p.373-403, 1982.

HYVÖNEM, L.; KOIVISTONEN, P.; VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. **Advances In Food Research**, San Diego, v.28, p.373-403, 1982.

IKEUCHI , T.; AZUMA, M.; KATO, J.; OOSHIMA, H. Screening of microorganisms for xylitol production and fermentations behaviour in high concentration of xylose. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 16, p. 333-336, 1999.

INÁCIO, J., PEREIRA, P., DE CARVALHO, M., FONSECA, Á., AMARAL-COLLAÇO, M. T., SPENCER-MARTINS, I. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal. **Microbiol Ecology**, New York , v. 44, p. 344-353, 2002.

IZUMORI, K. AND K. TUZAKI. Production of xylitol from D-xylose by *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Fermentation Technology**, New York, v..66,p. 33-36, 1988.

IZUMORI, K. AND K. TUZAKI.. Production of xylitol from D-xylose by *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Fermentation Technology**, New York. v.66 p. 33-36, 1988.

JEFFRIES, T.W.. Utilization of xylose by bacteria, yeast and fungi. **Advances in Biochemistry and Biotechnology**, New York, v.27 p.2-27, 1983.

KADAM K.L, CHIN CY, BROWN LW: Flexible biorefinery for producing fermentation sugars, lignin and pulp from corn stover. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 35 p.331-341, 2008.

KADAM, K.L.; FORREST, L.H.; JACOBSON, W.A. Rice straw as a lignocellulosic resource: collection, processing, transportation, and environmental aspects. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 18, p. 369-89, 2000

KERN, M.; HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D. Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS 4435. **FEMS Microbiology Letters**, Malden v.149, p.31-37, 1997.

KIM S.Y., OH D.K., JUNG S.R. **Fermentation process for preparing xylitol using candida tropicalis**. US N. 5.998.181, 1999..

KINTERINWA, O.; KHANKAL R. CIRINO P. C. Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.19 p. 461–467, 2008

KITPREECHSVANICH, V., M. HAYASHI, N. NISHIO. AND S. NAGAI.. Conversion of D-xylose into xylitol by xylose reductase from *Candida pelliculosa* coupled with oxido-reductase system of methanogen strain. **Biotechnology Letters** Dordrecht v. 6 p. 651-656, 1984 .

KO C.H., CHIU P.C., YANG C.L., CHANG K.H. Xylitol conversion by fermentation using five yeast strains and polyelectrolyteassisted ultrafiltration. **Biotechnology Letters**, Dordrecht,v.30 p.81-86, 2008.

KREEGEN – VAN RIJ. **The yeast**: a taxonomy study. Amsterdam: 1982.1082p.

KRISHNA, S.H.; REDDY, T.J.; CHOWDARY, G.V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using thermotolerant yeast. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, p. 193-6, 2001.

KRUSE, B.; SCHIIGERL, K. Investigation of ethanol formation by *Pachysolen tannophilus* from xylose and glucose/xylose co-substrates **Process Biochemistry**, London. v. 31, p. 389-407, 1996.

KURTZMAN, C. P. Molecular taxonomy of the yeasts. **Yeast**, New York, v.10 pp. 1727-1740 1994.

KURTZMAN, C. P., FELL, J. W.. **The yeasts** : a taxonomic study. 4th ed. New York:: John Wiley & Sons, 1998.

KURTZMAN, C. P., PHAFF, H. J. Molecular taxonomy. In: ROSE, H.; HARRISON, J. S. (Ed.), **The yeasts**. 2nd ed. London: Academic Press, 1987. v.1, p. 63-94.

KURTZMAN, C. P., ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, Delf v. 73 p. 331-371, 1998.

LACAZ C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACARRI, E.M.; MELO, N.T. **Guia para a identificação de fungos actinomicetos algas de interesse medico** São Paulo: Sarvier, 1998. 445 p.

LATIF F.; RAJOKA M.I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, Oxford, V. 77 pp. 57–63, 2001.

LEE, H.. The structures and function of yeast xylose (aldose) reductase. **Yeast**, New York, v.14 p. 977-984, 1998.

LIMA L.H.A., FELIPE M.G.A., TORRES F.A.G. reclassification of *Candida guilhermondii* FTI 200-37 as *Candida tropicalis* base don molecular phylogenetic analisys. **Brazilian Journal Of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n.1 p. 96-98, 2003.
London.

LOPANDIC, K.; ZELGER, S.; BÁNSZKY, L. K.; ELISKASES-LECHNER, F.; PRILLINGER, H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology**, London, v. 23 p. 341-350, 2006.

LÓPEZ F., DELGADO O. D., MARTÍNEZ M. A., SPENCER J. F.T. FIGUEROA L. I.C.. Characterization of a new xylitol-producer *Candida tropicalis* strain. **Antonie van Leeuwenhoek**, Delf, v. 85, p.281–286, 2004

MAGGE, R.J.; KOSARIC, N. Bioconversion of hemicellulosics. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, Baltemore, v. 32, p. 60-63, 1985.

MAKINEN KK. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? **Medical Hypotheses**, Edindurhg, v. 54 p. 603-13, 2000.

MARCHAL, R.; ROPARS, M.; VANDECASTELLE, J. P. Conversion in acetone and butanol of lignocellulosic substrates pretreated by steam explosion. **Biotechnology Letters**, Ghent, v.8, n.5, p.365-370, 1986.

MEYERIAL, C., DELEGENES J.P., MOLETTA R., NAVARRO J.M. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*: Fermentation behavior. **Biotechnology Letters**, Ghent, v.13 p. 281-286, 1991.

MOREIRA D., LÓPEZ-GARCIA P.. The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. **Trends in Microbiology**, London, v. 10 p. 31-38, 2002.

MUSSATTO S. I., SILVA C. J. S. M., ROBERTO I. C. Fermentation performance of *Candida guilliermondii* for xylitol production on single and mixed substrate media **Applied Microbiology and Biotechnology**, Prague, v. 72 p. 681–686, 2006

NAGAHAMA, T., HAMAMOTO, M., NAKASE, T., TAKAMI, H., HORIKOSHI, K. Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean. **Antonie van Leeuwenhoek**, Delf, v.80 p. 101–110, 2001..

NIGAM P AND SINGH D, Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 30 p. 117–124; 1995.

NISHIO N, SUGAWA K, HAYASE N, NAGAI S. Conversion of d-xylose into xylitol by immobilized cells of *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium* sp. HV. **Journal of Fermentation and Bioengineer**, London, v. 67 p.356–60, 1989.

NITU SOODA AND BANWARI LAL. Isolation of a novel yeast strain *Candida digboiensis* TERI ASN6 capable of degrading petroleum hydrocarbons in acidic conditions. **Journal of Environmental Management**, London, V. 90, n. 5, p. 1728-1736, 2009.

NOLLEAN V, PREZIOSI-BELLOY L, NAVARRO J. The reduction of Xylose to Xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis* incidence of oxygen, pH. **Biotechnology Letters**, Ghent, v. 51, p. 780–785, 1995

O'DONNELL K. *Fusarium* and its near relatives. REYNOLDS, D.R.; TAYLOR **The fungal holomorph**: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics .Wallingford, CAB International 1993.;p. 225–233.

OBERWINKLER, F.. *Heterobasidiomycetes* with ontogenic yeast-stages. Systematic and phylogenetic aspects. **Studies in Mycology**, Utrecht,. v. 30 p. 61-74, 1987.

OKI T, FUKISAWA-SHI, NISHIMURA,Y. YASHIROSHI,SAYAMA,Y, TAKEMI H.. **process for production L- glutamic acid by fermentation**. US. N. 3563857, 1971.

ONISHI, H., T. SUZUKI.. The production of xylitol, L-arabinose and ribitol by yeasts. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v 30 p.1139-1144, 1966.

PARAJÓ J.C., DOMINGUEZ H.; DOMINGUEZ J.M.. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**, Oxford, v.21 p.18–24, 1997.

PARAJÓ, J.C., DOMINGUEZ H.; DOMINGUEZ. J.M. . Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made with lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 66 p. 25-40 1998.

PAREKH, S.R., R.S. PAREKH, AND M.WAYMAN,. Fermentation of wood-derived acid hydrolysates in a batch bioreactor and in continuous dynamic immobilized cell bioreactor by *Pichia stipitis* R. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 22: p. 85-91, 1987.

PAZOUKI M., FELSE P.A., SINHA, J., PANDA, T.,. comparative studies on citric acid production by *aspergillus niger* and *candida lipolytica* using molasses and glucose. **Bioprocess engineering**, New York, v. 22, n.4, p. 353-361, 2000.

PEPPER, T., P.M. OLINGER,. Xylitol in sugar-free confections. **Food Technology**, Chicago, v. 10 p. 98-106, 1988.

PETERSON, S. W., KURTZMAN, C. P.. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v.14 p. 124-129, 1991.

PHAFF, H. J., MILLER, M. W., MRAK, E. M. The Life of Yeasts. 2nd edition, Harvard University Press, Cambridge London, 1978.

PICATAGGIO S., DEANDA K., MIELENZ J., determination of *candida tropicalis* acyl coenzyme a oxidase isozyme function by sequential gene disruption. **Molecular And Cellular Biochemistry**, Dordrecht, v.11 n.9, p. 4333-4339, 1991.

PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J.M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, n.21, p. 124-129, 1997.

PRIOR, B. A.; KILIAN, S. G. ; DU PREEZ, J. C. Fermentation of D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 89, p. 21-32, 1989.

RAMOS, R. M. **Tratamento de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com sais de alumínio para obtenção de xilitol por via fermentativa.** 1999. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa , 1999.

ROBERTO IC, MANCIHO IM, DE SATO S. Influence of KLa on bioconversion of rice straw and hemicellulose hydrolysate hydrolyrate to xylitol. **Bioprocess Engineering** Ammam, v. 21 p. 505–508, 1999..

ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; FELIPE, M. G. A.; SOUZA, C. A.; SATO, S.; CASTRO, H. F. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, Ghent, v.16, n.11, p.1211-1216, 1994.

ROBERTO, I.C.; SATO, S.; MANCILHA I.M.D. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolyzates by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, Hampshire,. v. 16 p. 348-350, 1996.

ROSEIRO J.C., PEITO M.A., GIRIO F.M. AND AMARAL-COLLAÇO M.T.. The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. **Archives of Microbiology**, Santa Cruz,. v.156 p. 484–490, 1991.

SAHA B. C.; BOTHAST R. J., **Microbial production of xylitol**. New York.: Springer Verlag, 1997 p. 307–319. (ACS Symposium Series).

_____.Production of xylitol by *Candida pellata*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Prague, V. 22 p. 633-636,1999.

_____.Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Beijing, v. 76 p. 65-77, 1999.

_____. Production of L-arabitol from L-arabinose by *Candida entomaea* and *Pichia guilliermondii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Prague, V. 45 p. 299-306, 1996.

SAMBROOK J.; FRITSCH E.F.;MANIATIS T.. Gel electrophoresis of DNA. In: FORD N., NOLAN ,C.; FERGUSON ,M. (Ed.), **Molecular cloning**; a laboratory manual .2nd ed. ., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

SAMPAIO F.C., SILVEIRA W.B., CHAVES-ALVES, V.M., PASSOS, F.M.L., COELHO J.L.C. Screening of filamentous fungi for production of xilitol from D-xilose. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34 p. 235-238, 2003.

SAROTE , MICHAEL STANISZEWSKI, AND MANFRED RIZZIZ.Screening of Yeasts for Production of Xylitol from D-Xylose **Journal of Fermentation And Bioengineering**, Osaka, v.. 80, n.6, p. 565-570, 1995.

SCHIWECK H, BA" R A, VOGEL R, SCHWARZ E, KUNZ M: Sugar alcohols. edn 6. Ullmann's **Encyclopedia of Industrial Chemistry** Wiley– VCH; 2003 p. 487–513.

SHEU D., DUAN K., JOU S., CHEN Y. , CHEN C. W.Production of xylitol from *Candida tropicalis* by using na oxidation-reduction potential-stat controlled fermentation. **Biotechnology Letters**, Ghent, v.25 p. 2065–2069, 2003.

SIDRIM J.J.C. ; ROCHA M.F.G. **Micologia médica a luz de autores contemporâneos**. 2. ed. Rio de Janeiro Guanabara koogam , 2004..p. 338.

SILVA C.J.S.M.; ROBERTO I.C.. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysates. **Letters in Applied Microbiology**, Budapest, V. 32 p. 248–252, 2001.

SILVA S.S., FELIPE M.G., MANCILHA I.M.: Factors that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts. A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 170-72 p. 331-339 1998,

SILVA, C.J.S.M.; ROBERTO, I.C. statistical screening method for selection of important variables in xilitol biosynthesis from rice straw hydrolyzate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Biotechnology techniques**, Dordrecht, v 13, p. 743-747, 1999.

SILVA, S. S.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A. Xilitol: Um adoçante alternativo para a indústria de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.5, p.109-117, 1994.

SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; MANCILA, I.M.; factors that affect the biosynthesis of xilitol by xylose-fermenting yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.70-72, p. 331-342, 1998

SILVEIRA M M; JONAS R. The biotechnological production of sorbitol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Prague, v. 59, p. 400-408, 2002.

SIRISANSANEEYAKUL, S., STANISZEWSKI, M.; M. RIZZI. Screening of Yeasts for Production of Xylitol from D-Xylose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, V. 80 p. 565-570, 1995.

SKOOG, K., B.HAHN-HAGERDAL.. Xylose fermentation. **Enzyme and Microbiology and Technology**, New York, New York, v.10 p. 66-80, 1988.

SWANN, E. C., TAYLOR, J. W.. Toward a phylogenetic systematics of the basidiomycota: Integrating yeasts and filamentous basidiomycetes using 18S rRNA gene sequences. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 38 p. 147-161, 1995.

TAPIAINEN T; RENKO M; KONTIOKARI T; UHARI M; LUOTONEN L. Xylitol administered only during respiratory infections failed to prevent acute otitis media. **Pediatrics**, Grove Village v. 19, p. 109, 2002

TAPIAINEN T; RENKO M; KONTIOKARI T; UHARI M. Xylitol concentration in the saliva of children after chewing xylitol gum or consuming a xylitol mixture. **European Journal of Clinical Microbiology Infection Diseases**. Berlin, v. 21 p. 53-55, 2002b .

TAYLOR, K. B., BECK, M. J., HUANG, D. H. & SAKAI, T. T. The fermentation of xylose: studies by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Industrial Microbiology**, Berlin v.6, p.29-41. 1990.

TENGERDY, R.P.; SZAKACS. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 13, p. 169-179, 2003.

TRINDADE C.P. **Efeito do uso de goma de mascar contendo xilitol sobre os níveis salivares de estreptococos do grupo mutans, sobre os genótipos de S. mutans e sobre a presença de amostras xilitol-tolerantes na saliva.** 2005. 111p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de odontologia de Bauru , Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

UENG, P. P., HUNTER, C. A., GONG, C. S. & TSAO, G. T. D-xylulose fermentation in yeasts. **Biotechnology Letters**, Ghent, v.3, n.6 , p. 315-320 1981.

VAN DE PEER, Y., ROBBRECHT, E., DE HOOG, S., CAERS, A., DE RIJK, P., DE WACHTER, P. Database on the structure of small subunit ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.27 p. 179-183, 1999.

VAN DIJKEN J.P, SCHEFERS W.A.S. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, Malden, v. 32 p. 199– 224, 1986.

VANDESKA E, AMARTEY S, KUZMANOVA S, JETTRIES TW. Fed batch culture for xylitol production by *Candida boidinii*. **Process Biochemistry**, Quebec, v.31 p. 265–270 1996.

VANDESKA E., AMARTEY S., KUZMANOVA S. JEFFRIES T.. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Seoul, v.11 p. 213–218, 1995.

VANDESKA, E., KUZMANOVA, S. JEFFRIES, T. W. Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida boidinii* under different oxygen transfer rates. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 80, p. 513-516, 1995.

VONGSUVANLERT. V.,: TANI. Xylitol production by a methanol yeast, *Candida boidinii* (*Kloeckera* sp.). **Journal Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 67 p. 35-39, 1989.

WALKER, G. M. Introduction to yeasts. **Yeast physiology and biotechnology**. Chicester: John Wiley & Sons, 1998.p 1-10.

WALTHER T, HANSIRISAK P, AGBLEVOR FA. The influence of aeration and hemicellulosic sugar on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Bioresearch Technology**, Fayetteville, v.76 p. 213–220, 2001.

WATSON, N. E., B. A. PRIOR, AND P.M. LATEGAN. Oxygen requirements for D-xylose fermentation to ethanol and polyols by *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme Microbiology Technology**, Atlanta, v. 6 p. 447-450, 1984.

WEST T. P. Xylitol production by *Candida* species grown on a grass Hydrolysate **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 25, n. 5, p. 913-916, 2009.

WINKELHAUSAN E, KUZMANOVA S. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. Microbial conversion of d-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 86 p. 1-14, 1998.

WINKELHAUSEN. E S. KUZMANOVA. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, V. 86 n.1, p. 1-14, 1998..

YAHASHI Y, HORITSU H, KAWAI K, SUZUKI, T., TAKAMIZAWA K.. Production of xylitol from d-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of d-glucose feeding. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 81 p. 142-148, 1996.

_____. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-xylose feeding. **Journal of Fermentation Technology**, New York, v.81 p. 148-152, 1996.

YOSHITAKE, J.; ISHIZAKI, H.; SHIMAMURA, M.; IMAI T.. Xylitol production by an *Enterobacter* species. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 37 p. 2261-2267, 1973.

YOSHITAKE, J., H. O.; SHIMAMURA M. Production of polyalcohol by a *Corynebacterium* sp. Part I. Production of pentol from aldopentose. **Agricultural and Biological Chemistry**, Osaka, v. 35 p. 905-911, 1971.

ZAGUSTINA, N. A.; RODIONOVA, N. M.; MESTECHKINA, V. D.; SHCHERBUKHIN, A. M. Xylitol production by a culture of *Candida guilliermondii* 2581. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New york, v. 37, n. 5, p. 489-492, 2001.

ANEXOS

Anexo A - Produção de biomassa de levedura em meio UPX em diferentes tempos a 30°C a 120 rpm

Tempo			Biomassa de leveduras (g/L)															
(horas)	IZ 1339 ¹		IZ 1824 ²		FTI 200-37 ³		MVP 03 ¹		MVP 40 ¹		MVP 16 ¹		MVP 17 ⁴		MVP 21 ⁴		Média	
0	0.16	Ca	0.21	C a	0.22	Ca	0.18	Ca	0.14	Ca	0.15	Da	0.08	Da	0.11	Da	0.16	D
24	2.83	Ba	1.76	Bbc	2.76	Bab	2.61	Bab	2.84	Ba	2.93	Ca	1.52	Cc	2.20	Cabc	2.43	C
48	3.77	ABab	3.71	Ab	4.39	Aab	4.47	Aab	4.73	Aa	4.53	Bab	2.70	Bc	3.86	Bab	4.02	B
72	4.13	Abc	4.15	Abc	4.93	Ab	4.56	Ab	4.39	Ab	6.00	Aa	3.29	ABc	4.88	Ab	4.61	A
96	4.47	Abcd	4.20	Acd	4.96	Abc	4.39	Abcd	4.90	Abc	6.47	Aa	3.72	Ad	5.20	Aab	4.72	A
Média	3.07	bc	2.81	c	3.45	b	3.24	b	3.40	b	4.02	a	2.26	d	3.25	b		

¹ *Kluyveromyces marxianus*; ² *Candida tropicalis*; ³ *Candida guilhermondii*; ⁴ *Candida rugosa*. Médias diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%) minúsculas para linhas e maiúsculas para coluna.

Anexo B - Concentração de xilose consumida em meio UPX em diferentes tempos a 30°C a 120 rpm

Tempo		Concentração de xilose (g/L)																	
		IZ 1339 ¹		IZ 1824 ²		FTI 200-37 ₃		MVP 03 ¹		MVP 40 ¹		MVP 16 ¹		MVP 17 ⁴		MVP 21 ⁴		Média	
0	51.03	Aa	51.03	Aa	51.03	Aa	51.03	Aa	51.03	Aa	49.58	Aa	49.46	Aa	49.46	Aa	50.44	A	
24	38.79	Bb	33.98	Bc	26.22	Be	27.08	Be	30.56	Bd	32.53	Bc	46.25	Ba	45.81	Ba	35.53	B	
48	32.39	Cb	22.67	Cc	3.63	Ce	3.06	Ce	8.92	Cd	5.96	Cd	39.92	Ca	40.16	Ca	19.94	C	
72	26.09	Db	14.24	Dc	0.41	Dd	0.00	Dd	0.00	Dd	0.04	Dd	37.70	Da	35.88	Da	14.30	D	
96	19.07	Eb	10.12	Ec	0.00	Dd	0.00	Dd	0.00	Dd	0.00	Dd	33.20	Ea	31.45	Ea	11.73	E	
Média	33.47	b	26.41	c	16.26	e	16.23	e	18.10	d	18.77	d	41.31	a	40.55	a			

¹ *Kluyveromyces marxianus*; ² *Candida tropicalis*; ³ *Candida guilhermondii*; ⁴ *Candida rugosa*. Médias diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%) minúsculas para linhas e maiúsculas para coluna.

Anexo C - Concentração de xilitol produzido em meio UPX em diferentes tempos a 30 °C a 120 rpm

Tempo		Concentração de xilitol (g/L)																	
(horas)	IZ 1339 ¹		IZ 1824 ²		FTI 200-37 ₃		MVP 03 ¹		MVP 40 ¹		MVP 16 ¹		MVP 17 ⁴		MVP 21 ⁴		Média		
0	0.00	Ca	0.00	Ba	0.00	Ea	0.00	Da	0.00	Da	0.00	Da	0.00	Aa	0.00	Aa	0.00	D	
24	5.52	Bc	4.38	Ac	15.04	Da	16.41	Ca	13.75	Ca	10.60	Cb	0.17	Ad	0.13	Ad	8.25	C	
48	6.50	ABc	6.18	Ac	28.86	Aa	29.15	ABa	25.49	Bb	28.62	Ba	0.53	Ad	0.69	Ad	15.75	B	
72	7.18	ABd	5.14	Ad	23.59	Cc	28.23	Bb	29.77	Aab	30.90	ABa	0.72	Ae	1.17	Ae	16.02	B	
96	8.44	Ac	5.76	Ac	26.18	Bb	31.31	Aa	30.78	Aa	32.36	Aa	1.01	Ad	1.55	Ad	16.99	A	
Média	5.53	c	4.29	d	18.73	b	21.02	a	19.95	a	20.49	a	0.49	e	0.71	e			

¹ *Kluyveromyces marxianus*; ² *Candida tropicalis*; ³ *Candida guilhermondii*;

⁴ *Candida rugosa*. Médias diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%) minúsculas para linhas e maiúsculas para coluna.