UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

SARAH DE SOUZA QUEIROZ

Identificação e quantificação da expressão dos genes envolvidos no transporte de xilose
na levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037

Lorena
2019

SARAH DE SOUZA QUEIROZ

Identificação e quantificação da expressão dos genes envolvidos no transporte de xilose
na levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Industrial na
área de concentração de Microbiologia
Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças
de Almeida Felipe

Versão Corrigida

Lorena
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Queiroz, Sarah de Souza

Identificação e quantificação da expressão dos genes envolvidos no transporte de xilose na levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 / Sarah de Souza Queiroz; orientadora Maria das Graças de Almeida Felipe - Versão Corrigida. - Lorena, 2019.
103 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Xilose. 2. Glicose. 3. Proteínas transportadoras. 4. Xilitol. 5. *Candida tropicalis*.
I. Título. II. Felipe, Maria das Graças de Almeida, orient.

Dedico à minha mãe e avó, mulheres que me inspiram!
E aos meus irmãos, com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, avó e irmãos, por serem o que tenho de mais precioso no mundo, por todo amor, carinho e apoio em todos os momentos.

A todos os meus familiares que mesmo de longe, estão sempre comigo quando preciso, e sempre dispostos a tudo por mim! Muito obrigada!

A Escola de Engenharia de Lorena e a Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora, professora Maria das Graças de Almeida Felipe, pela dedicação e confiança, pelos ensinamentos valiosos, pela oportunidade de aprendizado e amizade durante a realização dos trabalhos.

A professora Tatiane da Franca por toda orientação, oportunidade, ensinamentos constantes e receptividade. Sua contribuição foi fundamental para o desenvolvimento da dissertação.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Fermentações da EEL/USP, Fanny, Andrés e Henrique, pela amizade, companheirismo e ajuda sempre! Estarei sempre aqui para o que precisarem!

Aos amigos que conheci no Laboratório de Genômica Funcional e Biotecnologia Vegetal da EEL/USP, meus sinceros agradecimentos por toda colaboração e ajuda.

As amigas que foram fundamentais durante esse tempo em São Paulo. Em especial Ana Maria, Amanda, Caio, Gaby, Mariana, Livia, Sophia, Tainã e Uira! Sem vocês esses anos não teriam sido repletos de tantos bons momentos!

Aos colegas que conheci no Departamento de Biotecnologia, e cruzaram meu caminho, obrigada pelas risadas nos ônibus, nos corredores do DEBIQ, e por todo apoio durante a pesquisa!

Aos professores que estiveram presentes na minha formação, técnicos e funcionários do Departamento de Biotecnologia pela colaboração.

A todos que torceram por mim durante toda essa etapa, minha sincera gratidão!

“No começo eu era só certezas.
No meio eu era só dúvidas.
Agora é o final
e eu só duvido.”
Mário Quintana

RESUMO

QUEIROZ, Sarah de Souza. **Identificação e quantificação da expressão dos genes envolvidos no transporte de xilose na levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037.** 2019. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Biomassas lignocelulósicas são abundantes no planeta e fontes ricas em carboidratos que podem ser empregadas na indústria biotecnológica e então aproveitadas em diferentes bioprocessos, a exemplo da produção de xilitol. Os processos industriais que empregam microrganismos capazes de promover a bioconversão desta matéria prima são majoritariamente concentrados na utilização de hexoses advindas da fração celulósica, enquanto a fração hemicelulósica, rica em pentoses, principalmente xilose, necessita de melhorias para o estabelecimento de um bioprocessos industrial. As leveduras do gênero *Candida*, que possuem a maquinaria metabólica necessária para metabolizar a molécula de xilose, possuem a capacidade de conversão desta molécula em xilitol, um açúcar-álcool de grande valor comercial. No metabolismo de xilose é importante considerar a proporção de NAD(P)H:NAD(P)^+ , uma vez que ao manter o poder redutor, será favorecida a atividade da xilose redutase (XR), enzima chave no primeiro passo da conversão de xilose a xilitol que necessita da forma reduzida como cofator. Sendo assim, em meios formulados com a mistura de pentoses e hexoses, a exemplo de hidrolisados hemicelulósicos, é importante considerar a presença da molécula de glicose, e a proporção entre estes dois açúcares no meio, em função dos efeitos gerados na assimilação destes monossacarídeos. Avanços das pesquisas envolvendo genética molecular e sinalização celular evidenciaram a existência de uma relação entre o transporte de açúcares e o fluxo metabólico, cuja importância foi demonstrada partir da identificação de proteínas transportadoras de xilose de alta afinidade em leveduras capazes de metabolizar pentoses. Considerando a potencialidade de *Candida guilliermondii* FTI 20037 na bioconversão de xilose em xilitol, este trabalho teve o objetivo de identificar e quantificar a expressão dos genes envolvidos no transporte de xilose nesta levedura. No entanto, como ponto de partida, foram realizados experimentos de confirmação de espécie, com base na sequência região do rDNA, foi encontrado que a linhagem *Candida guilliermondii* FTI 20037 utilizada na pesquisa se trata da espécie *Candida tropicalis*. Sendo assim, após a posterior aplicação de ferramentas de bioinformática/utilização de bancos de dados *in silico*, foram identificadas 16 possíveis proteínas transportadoras de xilose no genoma de *Candida tropicalis*. A relação filogenética entre elas foi construída, sendo duas proteínas potenciais transportadoras selecionadas (CtGX2 e CtXUT1). Ensaios de cinética de consumo de xilose pela levedura realizados sob diferentes condições de fontes de carbono xilose, glicose e a mistura destes monossacarídeos como composição principal do meio de cultivo permitiram a avaliação do padrão de consumo e posterior determinação da expressão relativa dos genes codificantes das respectivas proteínas via qPCR. Foi determinado que o intervalo de 21-36h de fermentação é correspondente ao pico de absorção de xilose pela *C. tropicalis* e a correlação obtida a partir destes dados com os resultados de expressão gênica apontaram que, ambos os genes selecionados são capazes de transportar a molécula de xilose, embora com afinidades distintas, sendo que *CtXUT1* apresentou indícios de especificidade para o transporte de xilose ao ser expresso apenas na condição de depleção de glicose do meio de cultivo.

Palavras-chave: Xilose. Glicose. Proteínas transportadoras. Xilitol. *Candida tropicalis*.

ABSTRACT

QUEIROZ, Sarah de Souza. **Identification and quantification of the expression of genes involved in xylose transport in *Candida guilliermondii* FTI 20037**. 2019. 105p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Lignocellulosic biomass is an abundant source of carbohydrates in the planet that can be used by biotechnology industry in several bioprocesses, having the production of xylitol as an example. Industrial processes that employ microorganisms able to promote the bioconversion of this raw material are limited to the utilization of hexoses, provided by the cellulosic fraction of the material, while the hemicellulosic fraction (rich in pentoses, specially xylose) still need improvements before being implemented in industrial bioprocesses. Yeasts belonging to the *Candida* genre have the required metabolic machinery for the metabolization of the xylose molecule, converted in the xylitol molecule, a commercial highly valued sugar-alcohol. It is important to consider, in the xylose metabolism, the proportion of NAD(P)H:NAD(P)^+ , once the activity of the xylose reductase, key enzyme in the first step in the bioconversion of xylose into xylitol, is favored by the maintenance of reduction power, provided by the reduced form of this cofactor. In that context, in mediums composed by the blend of both pentoses and hexoses, as in hemicellulosic hydrolysates, it is important to consider the presence of the glucose molecule and its proportion in relation to xylose, in regard of the affects generated by their assimilation. Advances in research involving molecular genetics and metabolomics have evidenced a hypothetic correlation between the transportation of sugars and metabolic flux, whose importance was demonstrated by the identification of xylose carrier proteins in yeasts able to metabolize pentoses. Considering the potential of *Candida guilliermondii* FTI 20037 in the bioconversion of xylose to xylitol, the objective of the following research was to identity and quantify the expression of genes involved in the transport of xylose in this yeast. As a starting point, species-confirming experiments were conducted and, based on rDNA sequences, it was identified that the lineage of *Candida guilliermondii* FTI 20037 used in this study was a *Candida tropicalis* lineage. Posterior application of bioinformatics and data banks in situ, 16 possible xylose carrier proteins were found in *Candida tropicalis* genome. The phylogenetic relation between them was constructed and appointed two potential transporting proteins selected (CtGX2 and CtXUT1). Kinetic assays of xylose consumption by the yeast in different carbon sources conditions (xylose, glucose and blends of both monosaccharides) allowed the evaluation of consumption patterns and posterior determination of relative gene expression of the respective proteins by qPCR. It was determined that peak xylose absorption occurred in the 21h-36h interval and the correlation of this and gene expression data appointed that both genes are capable of transport xylose with distinct affinities, while *CtXUT1* presented selective behavior to the transportation of xylose once it was only expressed in a glucose depleted medium situation.

Keywords: Xylose. Glucose. Transporter proteins. Xylitol. *Candida tropicalis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema geral da obtenção de bagaço e palha de cana-de-açúcar como subprodutos gerados do setor sucroalcooleiro e principais monômeros carboidratos obtidos a partir da solubilização das frações constituintes.....	21
Figura 2 - Esquema simplificado da via metabólica de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 para a produção de xilitol em meio contendo mistura de xilose e glicose.....	27
Figura 3 - Modelo de membrana Mosaico Fluido.....	30
Figura 4 - Exemplos de mecanismos de transporte de açúcares e outras biomoléculas através da membrana plasmática das células de levedura.....	31
Figura 5 - Topologia dos transportadores de açúcar de levedura. Geralmente, transportadores de monossacarídeos em leveduras possuem 12 domínios transmembrana hidrofóbicos (representados como cilindros). A posição dos cinco motivos conservados que foram reconhecidos nos transportadores de açúcar é representada na figura pelas letras (A-E)	32
Figura 6 - Representação esquemática região rDNA de organismos pertencentes ao Reino Fungi.	43
Figura 7 - Gel de agarose 1% m/v das reações de PCR realizadas a partir da extração de DNA genômico de <i>C. guilliermondii</i> FTI20037 para confirmação da espécie. (A) Linha 1: Marcador 1 kb ladder; lnhas 3 a 5 fragmento de PCR correspondente à região do ITS; linhas 6 a 8 fragmento de PCR utilizando os primers CTR1 e 2 específicos para <i>C. tropicalis</i> . (B) Linha 1: Marcador 1 kb ladder; linha 2: fragmento de PCR da região do ITS e linha 3: amplificação utilizando os primers XR(F) e XR(R).....	57
Figura 8 - Árvore filogenética construída com os transportadores de <i>S. stipitis</i> , <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. intermedia</i> , depositados no banco de dados NCBI. As sequências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (EMBL-EBI); Árvore foi construída utilizando o programa MEGA7.0 com reamostragem de 1000 replicações de bootstrap.....	60
Figura 9 - Árvore filogenética construída com os transportadores de <i>C. tropicalis</i> , identificados no banco de dados NCBI. As sequências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (EMBL-EBI); Árvore foi construída utilizando o programa MEGA7.0 com reamostragem de 1000 replicações de bootstrap.	61
Figura 10 - Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos das proteínas transportadoras HXT1-7, GAL2 de <i>S. cerevisiae</i> , GXF1 e GXS1 de <i>C. intermedia</i> e SUT1-4 de <i>S. stipitis</i> . O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin. As posições putativas do primeiro segmento transmembrana (TMN1) em destaque, assim como a sequência consenso GG-XXX-G relacionado ao transporte de monossacarídeos no box.....	64
Figura 11 - Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos das proteínas transportadoras XUT1-7 de <i>S. stipitis</i> . O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin. As posições putativas do primeiro segmento transmembrana (TMN1) em destaque, assim como a sequência consenso GG-XXX-G relacionado ao transporte de monossacarídeos no box.....	65
Figura 12 - Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos das proteínas transportadoras GXT1-6 de <i>C. tropicalis</i> . O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin. As posições putativas do primeiro segmento transmembrana (TMN1) em destaque, assim como a sequência consenso GG-XXX-G relacionado ao transporte de monossacarídeos no box.....	65
Figura 13 - Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos das proteínas transportadoras XUT1,4,6,8,9,10 de <i>C. tropicalis</i> . O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin. As posições putativas do primeiro segmento transmembrana (TMN1) em destaque, assim como a sequência consenso GG-XXX-G relacionado ao transporte de monossacarídeos no box.....	66

Figura 14- Consumo de glicose (■), produção de etanol (◆), crescimento celular (●) e variação de pH (●) durante fermentação com <i>C. tropicalis</i> realizada em meio semi-definido contendo Glicose como fonte de carbono.....	67
Figura 15- Consumo de xilose (▲), produção de xilitol (★), crescimento celular (●) e variação de pH (●) durante fermentação com <i>C. tropicalis</i> realizada em meio semi-definido contendo Xilose como fonte de carbono.....	68
Figura 16- Consumo de xilose (▲), glicose (▼), produção de xilitol (★), etanol (◆), crescimento celular (●) e variação de pH (●) durante fermentação com <i>C. tropicalis</i> realizada em meio semi-definido contendo Glicose e Xilose como fontes de carbono.	70
Figura 17- Esquema simplificado dos tempos determinados para a coleta de amostras e extração de RNA total em cada condição de fermentação de acordo com a cinética fermentativa.....	73
Figura 18- Perfil de expressão dos genes <i>CtGXT2</i> e <i>CtXUT1</i> de <i>C. tropicalis</i> durante fermentações utilizando apenas xilose como fonte de carbono. A barra hachurada é referente ao experimento contendo apenas glicose como fonte de carbono. A quantificação relativa foi medida por qPCR. As letras e asteriscos indicam a diferença significativa entre as médias calculadas analisadas pelo teste de Bonferroni de Comparações Múltiplas, com $P < 0.05$. Os valores de referem as médias de triplicatas biológicas e técnicas de cada condição. A expressão dos genes <i>ACT1</i> e <i>PDA1</i> foram utilizadas como normalizador de cada amostra.	75
Figura 19- Perfil de expressão dos genes <i>CtGXT2</i> e <i>CtXUT1</i> de <i>C. tropicalis</i> durante fermentações utilizando glicose e xilose como fonte de carbono. A barra hachurada é referente ao experimento contendo apenas glicose como fonte de carbono. A quantificação relativa foi medida por qPCR. As letras e asteriscos indicam a diferença significativa entre as médias calculadas analisadas pelo teste de Bonferroni de Comparações Múltiplas, com $P < 0.05$. Os valores de referem as médias de triplicatas biológicas e técnicas de cada condição. A expressão dos genes <i>ACT1</i> e <i>PDA1</i> foram utilizadas como normalizador de cada amostra.	76
Figura 20- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente ao ITS da levedura <i>C. guilliermondii</i> FTI20037 utilizando o primer ITS1 e a região do ITS de <i>C. tropicalis</i> obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.....	99
Figura 21- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente ao ITS da levedura <i>C. guilliermondii</i> FTI20037 utilizando o primer ITS4 e a região do ITS de <i>C. tropicalis</i> obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.....	99
Figura 22- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente ao ITS da levedura <i>C. guilliermondii</i> FTI20037 utilizando o primer ITS1 e a região do ITS de <i>C. guilliermondii</i> obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.	100
Figura 23- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente ao ITS da levedura <i>C. guilliermondii</i> FTI20037 utilizando o primer ITS4 e a região do ITS de <i>C. guilliermondii</i> obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.	100
Figura 24- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente a enzima XR da levedura <i>C. guilliermondii</i> FTI20037 utilizando o primer XR(f) e a sequência da XR de <i>C. tropicalis</i> obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.....	101
Figura 25- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente a enzima XR da levedura <i>C. guilliermondii</i> FTI20037 utilizando o primer XR(r) e a sequência da XR de <i>C. tropicalis</i> obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.....	101

Figura 26- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente a enzima XR da levedura <i>C. guilliermondii</i> FTI20037 utilizando o primer XR(f) e a sequência da XR de <i>C. guilliermondii</i> obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.	102
Figura 27- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente a enzima XR da levedura <i>C. guilliermondii</i> FTI20037 utilizando o primer XR(r) e a sequência da XR de <i>C. guilliermondii</i> obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.	102
Figura 28- Especificidade da reação de amplificação de qPCR. (A) Curva de Melting dos genes de referência (<i>ACT1</i> e <i>PDA1</i>). (B) Curva de Melting dos genes candidatos (<i>CtGXT2</i> e <i>CtXUT1</i>).	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência dos primers utilizados no experimento e suas respectivas temperaturas de melting (Tm)	47
Tabela 2- Proteínas pertencentes à família Sugar Porter (SP) relacionadas ao transporte de xilose em leveduras.....	49
Tabela 3- Identidade das sequências obtidas após o sequenciamento da região do ITS da levedura <i>Candida guilliermondii</i> FTI20037. Em destaque maiores matches obtidos.....	56
Tabela 4- Proteínas transportadoras identificadas em <i>Candida tropicalis</i> MYA-3404. Proteínas que possuíam o domínio incompleto foram marcadas em vermelho.	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Biorrefinaria como modelo de sustentabilidade: desafios no aproveitamento de xilose	19
2.2 Metabolismo de xilose	25
2.3 Transporte de açúcares através da membrana plasmática	29
2.3.1 Proteínas transportadoras de açúcares em leveduras	32
2.3.2 Transporte de monossacarídeos: glicose e xilose	33
2.3.2.1 Proteínas responsáveis pelo transporte de glicose e xilose através da membrana plasmática	35
2.4 Sinalização celular e regulação do transporte de glicose	39
2.4.1 Proteínas sensoras de glicose extracelular: SNF3 e RGT2	40
2.5 <i>Candida guilliermondii</i> e <i>Candida tropicalis</i>	41
2.5.1 Relação filogenética e linhagens de leveduras	42
3 OBJETIVOS	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2 Objetivos específicos	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Microrganismo	46
4.2 Sequenciamento da região do rDNA e das enzimas Xilose Redutase (XR) e Xilitol Desidrogenase (XDH) e análises das sequências	46
4.3 Identificação das proteínas relacionadas ao transporte de xilose no genoma de <i>Candida tropicalis</i>	48
4.4 Análises das sequências e filogenia	50
4.4.1 Análise das sequências e busca pelo motivo consenso	50
4.5 Desenho dos primers	50
4.6 Perfil de expressão dos genes relacionados ao transporte de xilose em resposta às condições fermentativas	51
4.6.1 Meio e condições de fermentação	51
4.6.2 Parâmetros Cinéticos	52
4.6.3 Extração de RNA, síntese do cDNA e análise dos dados de Real-Time PCR	53
4.7 Métodos Analíticos	54
4.7.1 Análises das concentrações de açúcares	54
4.7.2 Quantificação de concentração celular, determinação da viabilidade celular e pureza da cultura	54

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
<u>5.1</u> Confirmação de espécie da levedura <i>Candida guilliermondii</i> FTI20037.....	56
<u>5.2</u> Seleção de genes relacionados ao transporte de xilose possivelmente presentes na espécie de levedura <i>Candida tropicalis</i>	58
<u>5.3.1</u> <i>Análise das sequências e busca pelo motivo consenso</i>	62
<u>5.4</u> Cultivo de <i>Candida tropicalis</i> em meio semi-definido.....	66
<u>5.4.1</u> <i>Desempenho fermentativo de Candida tropicalis em meio semi-definido contendo Glicose como fonte de carbono</i>	67
<u>5.4.2</u> <i>Desempenho fermentativo de Candida tropicalis em meio semi-definido contendo Xilose como fonte de carbono</i>	68
<u>5.4.3</u> <i>Desempenho fermentativo de Candida tropicalis em meio semi-definido contendo Glicose e Xilose como fontes de carbono na proporção 1:5.</i>	70
<u>5.5</u> Análises de expressão dos genes <i>XUT1</i> e <i>GXT2</i> de <i>C. tropicalis</i> em resposta à fonte de carbono disponível e tempo de fermentação.....	72
6 CONCLUSÕES	78
7 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	79
REFERÊNCIAS	80
ANEXO A	99
ANEXO B.....	103

1 INTRODUÇÃO

O crescimento e desenvolvimento de bioprocessos industriais, os quais dependem de microrganismos como principal tecnologia para geração de bioprodutos, demandam de pesquisas que impliquem na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na assimilação de nutrientes e formação de biomoléculas. Nas últimas décadas, avanços nos conceitos sobre a genética de microrganismos foram adquiridos, devido à introdução de novas ferramentas como o sequenciamento genômico. Este fato alterou de forma significativa o foco das pesquisas científicas, incentivando ainda mais a busca pela inovação e ampliação da eficiência dos bioprocessos.

No modelo de uma biorrefinaria, a tecnologia envolvida na conversão e geração de biomoléculas, segue a tendência de inclusão ao novo conceito de integração, ou seja, maximizar o aproveitamento da matéria prima em sua totalidade, aliada ao fator da sustentabilidade, minimizando perdas e descartes durante as etapas do processo. No setor sucroalcooleiro, em particular, sabe-se que o Brasil, como maior produtor de cana de açúcar do mundo, a representatividade desta cultura possui destaque. Tratando-se do bagaço e palha de cana, subprodutos advindos deste setor, a glicose representa o monômero de hexose que possui composição majoritária da biomassa lignocelulósica, no entanto, aproximadamente 30% desta biomassa, correspondente à fração hemicelulósica, a qual é composta principalmente da pentose, xilose.

O alto teor de xilose presente na hemicelulose de uma gama de biomassas lignocelulósicas faz com que as biomassas bagaço e palha se enquadrem como matéria prima de grande potencial para assimilação por microrganismos em diferentes bioprocessos. Entretanto, ainda existem desafios, como a necessidade de fermentar pentoses, pois nem todos microrganismos possuem a capacidade intrínseca de metabolizar estes carboidratos. Também, considerando as leveduras que possuem intrinsecamente esta capacidade de assimilação, quando expostas a uma mistura de glicose e xilose, a pentose é mais facilmente assimilada na condição de depleção/baixa concentração de glicose. Este fato ocorre devido ao fenômeno conhecido como repressão catabólica exercido pela glicose. Esta repressão atinge diversos níveis de regulação, sendo que, de forma a garantir a oferta e disponibilidade de nutrientes contínua no interior da célula, a primeira etapa limitante na assimilação de xilose seria representado pela regulação do seu mecanismo de transporte.

Nesse contexto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo modelo que apresenta uma gama de aplicações em bioprocessos industriais, devido às suas características

naturais, tem sido alvo de inúmeras pesquisas de modificação genética e desenvolvimento de novas estirpes eficientes na produção de biomoléculas. A aplicação de *S. cerevisiae* como levedura capaz de assimilar xilose consiste na expressão heteróloga dos genes que codificam xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) ou xilulokinase (XK), enzimas provenientes de outros organismos e responsáveis pelas primeiras etapas no metabolismo de xilose. O sucesso alcançado na clonagem destas enzimas em *S. cerevisiae* levou os pesquisadores a supor que a levedura possuía moléculas capazes de transportar xilose do meio extracelular para dentro da célula. No entanto, novas pesquisas revelaram que esta levedura não possui transportadores específicos para a pentose, sendo este monômero transportado por um sistema compartilhado, ou seja, utilizando transportadores de alta afinidade por hexoses, os quais são expressos apenas na condição de baixa concentração/ausência de glicose.

Como muitos transportadores de açúcares são membros da grande superfamília de facilitadores (MFS), estudos realizados com os transportadores de hexose da levedura *S. cerevisiae* são valiosos na compreensão da estrutura, função e regulação dos transportadores de carboidratos. Dentro da MFS existe a família dos transportadores de hexoses (HXT) composta por 20 membros sendo que apenas 7 codificam transportadores funcionais de glicose, os quais possuem a função de carrear a molécula através da membrana. Já no caso do transporte de xilose, essencialmente, em leveduras naturalmente capazes de metabolizar esta pentose, este processo pode ser realizado através de dois sistemas de transporte distintos: (a) baixa afinidade, sistema de difusão facilitada de alta capacidade e (b) alta afinidade, sistema de simporte de prótons de baixa capacidade, em que a força próton-motriz é usada para o transporte ativo de xilose na célula.

Diversas leveduras do gênero *Candida* têm se mostrado eficientes no metabolismo de pentoses, uma vez que muitas delas são capazes de transportar xilose por um mecanismo diferenciado em relação a *S. cerevisiae*, aliado ao fato de naturalmente expressarem enzimas envolvidas no metabolismo de pentoses. Considerando este cenário, a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, a qual foi classificada entre as melhores assimiladoras de xilose, após novos estudos moleculares, foi indicado que esta linhagem da espécie em estudo se trate na verdade de uma estirpe da espécie *Candida tropicalis*. Ainda assim, o conhecimento do mecanismo de internalização destas pentoses nas respectivas leveduras ainda não é bem esclarecido, assim como a possível conexão com o fluxo metabólico dependente ou não das concentrações de açúcares no meio externo, a exemplo de meios formulados a partir de biomassas vegetais os quais possuem mistura de C6 e C5.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biorrefinaria como modelo de sustentabilidade: desafios no aproveitamento de xilose

Os materiais lignocelulósicos constituem uma classe de matéria prima que desperta grande interesse no seu aproveitamento integral em bioprocessos (CARVALHEIRO et al., 2008). Um dos principais aspectos a ser considerado é sua riqueza constitucional de carboidratos, o que a torna uma biomassa promissora na geração de novos produtos, como ácidos succínico, ferúlico e vanílico, de alto valor agregado na indústria (MENON; RAO, 2012). Tais produtos ganham destaque na visão moderna da bioeconomia, a qual destaca a importância da utilização de materiais renováveis para o desenvolvimento de novos processos sustentáveis e eficientes (SCARLAT et al., 2015).

Com base nesse contexto, e considerando as principais fontes de biomassa lignocelulósica disponíveis no Brasil, tem-se que a cultura da cana-de-açúcar é representativa e estabelecida como principal fonte de matéria prima que alimenta a indústria sucroalcooleira (DIAS et al., 2012). O país é o principal produtor mundial de cana, e sua colheita na safra de 2019/2020 é estimada em 615,98 milhões de toneladas (CONAB, 2019). Este setor possui grande influência na economia do país, de fato, atendendo as demandas energéticas de produção do etanol combustível e no gerenciamento da indústria açucareira nos diversos estados (MAPA, 2019).

Com o objetivo de produzir biocombustíveis aliado à geração de novos produtos de interesse comercial (energia, insumos químicos, biocombustíveis, materiais e produtos químicos) a partir da biomassa lignocelulósica, a biorrefinaria surge como um conceito emergente, que engloba a conversão de biomassas para obtenção de energia e de um amplo espectro de produtos de valor agregado (RAGAUSKAS et al., 2006; MENON; RAO, 2012; BOTERO et al., 2017; DONG et al., 2019). Este sistema se aplica à cana-de-açúcar em associação a estratégias de uso sustentável, que tem como objetivo a busca pelo aproveitamento destas biomassas em sua totalidade (DIAS et al., 2012; CHANDEL et al., 2019). Sendo assim, uma grande sinergia entre a biorrefinaria e a química verde no que diz respeito à minimização de resíduos e de impactos ambientais ganharam destaque no âmbito industrial (VAZ JÚNIOR, 2011).

Seguindo essa proposta de valorização de resíduos gerados a partir do processamento convencional da biomassa lignocelulósica cana-de-açúcar, rica em carboidratos em uma biorrefinaria, o bagaço e a palha de cana, os quais representam exemplos de subprodutos

gerados das usinas de açúcar e etanol, ao serem incorporados como fonte de matéria prima, se encaixa perfeitamente nesta estratégia de utilização de subprodutos (ALONSO-PIPO et al., 2008; HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016). Estas frações podem ser obtidas em função da extração do caldo de cana-de-açúcar e da colheita mecanizada, respectivamente.

O bagaço estocado corresponde a um subproduto de baixo valor econômico, e o destino convencional de escape deste material consiste na incineração em caldeiras para fornecer energia e vapor em moinhos de açúcar domésticos, e/ou para a cogeração de energia no próprio setor (KIATKITTIPONG; WONGSUCHOTO; PAVASANT, 2009). Já a palha consiste de uma cobertura de resíduos vegetais formada de pedaços de colmo cortados, triturados e lançados sobre a superfície do solo, os quais não são comumente reaproveitados (CERRI et al., 2011). Ainda que esta palha sirva de fonte de carbono e nutrientes para o solo, auxiliando na manutenção para evitar a erosão e perda de água (CARDOSO et al., 2015), ao mesmo tempo é prejudicial para a próxima colheita, podendo inviabilizar ou prejudicar a maquinaria atuante, provocando entupimento das máquinas (CONAB, 2018), desta forma uma alternativa seria seu aproveitamento parcial em bioprocessos.

A conversão da biomassa lignocelulósica em produtos de alto valor agregado, a exemplo da química fina, através da rota bioquímica, requer várias etapas de processamento (VALDIVIA et al., 2016). A finalidade desta conversão é a valorização da lignocelulose e sua variedade de carboidratos constituintes como, por exemplo, a fração hemicelulósica (CARVALHEIRO et al., 2008; MOHAMAD et al., 2015). A flexibilidade de pré-tratamentos e a diversidade de processos devem ser considerados para a recuperação máxima de carboidratos e sua subsequente conversão em produtos finais de interesse (LANGE, 2007; VALDIVIA et al., 2016). Um esquema geral para os principais produtos obtíveis a partir da biomassa de cana-de-açúcar pode ser evidenciado na Figura 1.

As características das biomassas bagaço e palha de cana no contexto de uma biorrefinaria são importantes considerando que biomassas lignocelulósicas representam a maior fonte de recurso orgânico renovável do mundo (LIMAYEM; RICKE, 2012). Sua constituição é basicamente composta de polímeros de celulose, juntamente com hemicelulose e lignina (ANWAR, 2014). A presença de açúcares ocorre na forma de polissacarídeos celulose (35-50%) e hemicelulose (20-35%), os quais podem estar física e quimicamente associados entre si e também com a lignina (15-20%) (HAGHIGHI MOOD et al., 2013; CARVALHO et al., 2016; HERNÁNDEZ-PÉREZ ; ARRUDA; FELIPE, 2016).

Figura 1 - Esquema geral da obtenção de bagaço e palha de cana-de-açúcar como subprodutos gerados do setor sucroalcooleiro e principais monômeros carboidratos obtidos a partir da solubilização das frações constituintes.

Fonte: Adaptado de Menon; Rao, (2012).

Enquanto a celulose é um polímero linear cuja unidade repetitiva é a celobiose, isto é, duas moléculas de glicose unidas por ligação glicosídica do tipo β -1,4 (FENGEL; WEGENER, 1983), a lignina é uma macromolécula aromática amorfa formada pela polimerização de radicais provenientes de unidades de álcool p-cumárico, coniferílico e sinapílico, sendo que estes, quando incorporados à lignina, passam a ser denominados p-hidroxifenilpropano (H), guaiacila (G) e siringila (S) (FENGEL; WEGENER, 1983).

As cadeias de celulose podem apresentar tanto interações do tipo *Van der Waals*, quanto ligações de hidrogênio, sendo estas últimas responsáveis pela estrutura cristalina do polissacarídeo, quando em grande extensão (FENGEL; WEGENER, 1983). A lignina funciona como uma matriz em volta dos polissacarídeos da parede celular das plantas, fornecendo resistência mecânica e tornando as paredes impermeáveis à água (FENGEL; WEGENER, 1983; LIMAYEM; RICKE, 2012).

Já a hemicelulose consiste de uma estrutura amorfa e variável, formada por heteropolímeros com ramificações curtas, composto tanto de hexoses quanto de pentoses, dentre eles D-arabinose, D-glicose, D-galactose e majoritariamente D-xilose (FENGEL; WEGENER, 1983). A quantidade e os tipos de ramificações que podem ser encontrados nas hemiceluloses dependem da natureza e fonte de matéria-prima (NAIDU; HLANGOTHI;

JOHN, 2018). Este polissacarídeo, diferentemente da celulose, associa-se quimicamente com a lignina por meio de ligações do tipo éter ou éster, formando complexos lignina-carboidratos (FENGEL; WEGENER, 1983). A ligação éster pode ocorrer entre ácidos hidroxicinâmicos e o carbono 5 de uma molécula de arabinose ligada à cadeia principal de hemicelulose ou ainda com uma molécula de ácido urônico (HATFIELD et al., 2010; BIAN et al., 2012).

A desconstrução do material lignocelulósico, com foco nas frações celulósicas e hemicelulósicas, em açúcares fermentescíveis constitui uma das etapas mais importantes do processo de geração de novas biomoléculas ou biocombustíveis a partir destas fontes (TIZAZU; MOHOLKAR, 2017). Este procedimento representa a liberação dos carboidratos em suas formas mais simples (oligossacarídeos ou unidades monoméricas) para que sejam utilizados, por exemplo, via microrganismos em bioprocessos (KUMAR et al., 2015).

A solubilização dos açúcares constituintes das biomassas vegetais pode ser feita através de diferentes procedimentos (SEIDL; GOULART, 2016). No caso de hidrólise por via enzimática, ocorre a partir da ação conjunta de enzimas, as quais de forma sinérgica são capazes de clivar os polímeros em monômeros e são produzidas por uma diversidade de microrganismos (PÉREZ et al., 2002). Já com foco no aproveitamento da xilose constituinte da fração hemicelulósica do bagaço e palha de cana-de-açúcar, a hidrólise ácido diluído tem sido comumente empregada (RODRIGUES et al., 2003; HERNÁNDEZ-PÉREZ ; ARRUDA; FELIPE, 2016; SILVA-FERNANDES et al., 2017) devido à sua alta atividade catabólica e eficiência de hidrólise (LIU; CHENG, 2010; CHENG et al., 2008).

Aproximadamente 80% de toda a hemicelulose é hidrolisada e a maior parte da celulose permanece na fase sólida (celulignina) (RODRIGUES et al., 2003; HERNÁNDEZ-PÉREZ ; ARRUDA; FELIPE, 2016; SILVA-FERNANDES et al., 2017). Neste caso, as condições de processo são bem estabelecidas, sendo temperatura de 121°C por 20 minutos em solução de 1% (m/v) de H_2SO_4 para o bagaço (ARRUDA et al., 2017) e palha de cana (HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015). No entanto, alguma degradação de monossacarídeos, especialmente xilose é inevitável. Devido a este fato, o tempo de reação deve ser corretamente ajustado, uma vez que, com a hidrólise sustentada, os açúcares podem ser degradados em produtos de decomposição como resinas de furfural, hidroximetilfurfural e furano (ZHAO; ZHOU; LIU, 2012).

A xilose e outros açúcares hemicelulósicos, como a arabinose e glicose, são facilmente liberados por hidrólise ácida. Segundo Arruda (2011), a composição química do hidrolisado hemicelulósico proveniente da hidrólise ácido diluído do bagaço de cana

encontrada foi de $1,82 \text{ gL}^{-1}$ de glicose, $15,73 \text{ gL}^{-1}$ de xilose, $1,45 \text{ gL}^{-1}$ de arabinose, $2,31 \text{ gL}^{-1}$ de ácido acético, $0,19 \text{ gL}^{-1}$ de furfural, $0,02 \text{ gL}^{-1}$ de 5-hidroximetilfurfural e $5,48 \text{ gL}^{-1}$ de compostos fenólicos, enquanto que para a palha Hernández-Pérez (2015) relatou valores de $3,7 \text{ gL}^{-1}$ de glicose, $18,6 \text{ gL}^{-1}$ de xilose, $3,9 \text{ gL}^{-1}$ de arabinose, $2,23 \text{ gL}^{-1}$ de ácido acético, $0,33 \text{ gL}^{-1}$ de furfural e $0,57 \text{ gL}^{-1}$ de 5-hidroximetilfurfural.

A presença de compostos tóxicos nos hidrolisados hemicelulósicos como furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido orgânicos, e compostos fenólicos junto aos carboidratos constituintes deve ser considerada quando há aplicação destes em bioprocessos devido à sua potencial ação inibitória destes no metabolismo, prejudicando o crescimento celular da levedura (KLINKE et al., 2004; LIU et al., 2015; HAROUN et al., 2016; HU et al., 2018).

Assim, em função da presença de compostos tóxicos nos hidrolisados hemicelulósicos, diferentes métodos de destoxificação têm sido empregados para remover ou reduzir a concentração desses tóxicos (CANILHA et al., 2010; ARRUDA et al., 2017). Dentre estes, destaca-se a alteração do pH do hidrolisado com óxido de cálcio (CaO) seguido de adsorção em carvão vegetal ativo (MARTON et al., 2006). O carvão ativado é um composto empregado para destoxificação de hidrolisados devido a sua alta afinidade por compostos orgânicos, principalmente para compostos fenólicos, pois apresenta grande área de superfície por unidade de massa, exibindo boa capacidade de adsorção (HAMDAOUI; NAFFRECHOUX, 2007; HUA et al., 2012).

Entre as novas diretrizes de aproveitamento de hidrolisados hemicelulósicos ricos em xilose na indústria biotecnológica, uma estratégia que se destaca é a obtenção biotecnológica de xilitol ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$). Esta é uma biomolécula, açúcar-álcool, com inúmeras aplicações cotidianas como no setor alimentício no qual é um adoçante natural em substituição ao açúcar convencional, devido ao seu similar poder adoçante aliado à vantagem de possuir baixo valor calórico (O'DONNELL; KEARSLEY, 2012; ALBUQUERQUE et al., 2014; HOLBAN; GRUMEZESCU, 2017).

Na natureza, o xilitol é encontrado em algumas frutas, vegetais e cogumelos, porém em pequenas quantidades. Os seres humanos e outros mamíferos também o produzem a partir do metabolismo de carboidratos, sendo encontrado cerca de 5 a 15 g por dia de xilitol em um ser humano adulto (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M., 1998; MUSSATTO et al., 2002). Ainda que seja encontrado na natureza, o xilitol não é extraído a partir de vegetais, uma vez que as quantidades produzidas são relativamente baixas (cerca de 1000 mg a 100 g) e variadas de acordo com a espécie (PENG et al., 2012; IRMAK et al., 2017).

A eficácia do xilitol vem sendo citada por diversos autores na literatura e sua utilização cada vez mais incentivada, devido ao surgimento de evidências que asseguram a sua utilização como benéfica para a saúde (MUSSATTO, et al., 2002; ELAMIN et al., 2012). O xilitol pode ser consumido por pacientes diabéticos, já que o seu metabolismo é independente da insulina (ISLAM, 2011), além de promover uma série de benefícios no tratamento de processos inflamatórios, anemia hemolítica, doenças do cólon, infecções respiratórias e tratamento odontológico (ALBUQUERQUE et al., 2014; LÓPEZ-LINARES et al., 2018).

A produção de xilitol pode ocorrer a partir da conversão por via química ou biotecnológica da molécula de xilose, abundante em biomassas vegetais. O processo atual de produção, a nível global de exportação ocorre por via química, por um mecanismo denominado hidrogenação catalítica (SINNER et al., 1988; RAO et al., 2016). Para que seja obtido um rendimento expressivo de xilitol ao final deste processo, são necessárias intensas etapas de purificação de xilose, e desta forma, evitar formação de produtos indesejados (ARCAÑO et al., 2018).

Assim, existe no processo químico de produção do xilitol (comercial) (SINNER et al., 1988) inúmeras desvantagens em termos de requisitos de equipamentos especializados e dispendiosos, extensas etapas intermediárias de purificação, recuperação de produtos, desativação e reciclagem de catalisadores (necessidade de homogeneidade de solução), com enormes exigências de energia que tornam o processo geral muito custoso (CANILHA et al., 2013; RAO et al., 2016).

O processo de obtenção de xilitol por via química é muito bem elucidado na patente de Melaja, Hamalainen (1977). Primeiramente deve ser obtida uma solução rica em xilose. O seguinte passo consiste em duas etapas de purificação do hidrolisado obtido, que consistem na remoção de quaisquer sais inorgânicos e a maior parte dos resíduos orgânicos e cromóforos através de técnicas de exclusão de íons e posterior retirada de coloração. A etapa de conversão de xilose em xilitol consiste em utilizar a solução purificada obtida anteriormente em um mecanismo de hidrogenação catalítica através do níquel de *Raney*. Desta maneira o processo de catálise química exige condições severas de temperatura e pressão, o que prejudica a eficiência e rentabilidade do processo (HOU-RUI, 2012).

Alternativamente, comparado ao processo químico, a via biotecnológica de produção possui grande potencial para se estabelecer como alternativa promissora, e com vantagens econômicas, em relação a produção de xilitol por via química, devido a várias características incluindo as condições mais amenas de formação de produto (WINKELHAUSEN;

KUZMANOVA, 1998; HOU-RUI, 2012). Além de representar uma fonte de aproveitamento efetiva de subprodutos do setor sucroalcooleiro, a bio-conversão de xilose a xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico, utilizando microrganismos capazes de metabolizar pentoses, busca alcançar um desempenho de baixo impacto ambiental (TADA et al., 2004; WANG et al., 2013; LI et al., 2015).

Entre os microrganismos que possuem como característica a produção da molécula de xilitol, as leveduras que se destacam são, principalmente, as do gênero *Candida* (CHANDEL et al., 2010). A utilização de leveduras que fermentam a xilose, dentre elas *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida maltosa*, *Kluyveromyces marxianus*, entre outras vêm sendo estudadas (SAMPAIO et al., 2004; GUO et al., 2006; MARTÍNEZ; SÁNCHEZ; BRAVO, 2012; DE ALBUQUERQUE et al., 2015; ERYASAR; KARASU-YALCIN, 2016).

A espécie *Candida guilliermondii* FTI 20037 é conhecida por sua eficiência em converter xilose em xilitol (FELIPE, 2004; HERNÁNDEZ-PÉREZ ; ARRUDA; FELIPE, 2016; ARRUDA et al., 2017). Alguns parâmetros fermentativos para esta levedura já se encontram bem definidos, como temperatura de 30°C, pH 5,5, concentração de xilose próxima à 50 gL⁻¹, concentração e idade do inóculo de 0,1 a 1 gL⁻¹ e 16 a 24h, respectivamente, e já empregados para este bioprocessos em hidrolisados hemicelulósicos de diferentes biomassas (FELIPE et al., 1997; GURPILHARES et al., 2009; CAMARGO et al., 2015; HERNÁNDEZ-PÉREZ ; ARRUDA; FELIPE, 2016).

2.2 Metabolismo de xilose

A fermentação de xilose é essencial no alcance de um processo de bioconversão eficiente de hidrolisados ricos em pentoses até produtos finais, como biocombustíveis e químicos na indústria biotecnológica (JEFFRIES; JIN, 2004; LIMAYEM; RICKE, 2012; JIN; CATE, 2017). O microrganismo mais utilizado em processos industriais é a levedura *S. cerevisiae*, considerada um microrganismo “GRAS” (*Generally Regarded as Safe*). Esta é comumente empregada na produção industrial de vinho, fabricação de cerveja, processos de panificação e para a produção de bioetanol a partir de açúcares fermentescíveis (BARNETT, 2003; DONG; YI; LI, 2015), entretanto, não possui a capacidade natural de fermentar xilose como fonte de carbono (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). Este fato representa um dos desafios existentes que dificulta a viabilidade do aproveitamento de pentoses na indústria, e por outro lado, pode ser visto como uma oportunidade na pesquisa científica da

biotecnologia de fermentação de xilose (JEPPSSON et al., 2002; KWAK et al., 2019). Neste escopo, na tentativa de superar tais empecilhos, vários grupos de pesquisa se dedicam à engenharia genética de vias metabólicas e desenvolvimento de novas espécies recombinantes de levedura *S. cerevisiae* assim como a prospecção de novas espécies naturalmente capazes de realizar a fermentação eficiente de pentoses (LEE et al., 2008 ; MATSUSHIKA et al., 2009; VAN VLEET; JEFFRIES, 2009; KWAK et al., 2019).

Sabendo da existência de espécies naturalmente capazes de metabolizar açúcares C5, sua constituição gênica pode ser utilizada como base para alcançar o fenótipo desejado em um microrganismo modelo robusto como *S. cerevisiae* (JEFFRIES; JIN, 2004; HAHN-HAGERDAL et al., 2007; KIM et al., 2013; KOGJE et al., 2016; KWAK et al., 2019). Desta forma, o isolamento de genes envolvidos no metabolismo de xilose levou ao desenvolvimento de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*, e o destaque é dado à levedura *Scheffersomyces stipitis*, previamente conhecida como *Pichia stipitis* (KURTZMAN; SUZUKI, 2010). Esta levedura é capaz de atingir altos rendimentos de produção de etanol a partir de xilose, mas não apresenta a mesma robustez de *S. cerevisiae*, como alta tolerância à formação de etanol, tolerância à temperatura e adaptabilidade aos processos industriais (HAHN-HAGERDAL et al., 2001), o que limita sua utilização em escala industrial e aplicação em processos de conversão de material lignocelulósico.

Em organismos pertencentes ao Reino Fungi, a molécula de xilose é integrada ao metabolismo do carbono central através da conexão entre a via oxidorreductase e a via das pentoses fosfatadas (PPP) (JEFFRIES; JIN, 2004). A via das pentoses fosfatadas (PPP) é a rota bioquímica pela qual a xilose é incorporada ao metabolismo. Esta via é constituída de duas fases, sendo uma oxidativa que converte uma hexose, glicose-6-fosfato, em uma pentose, ribulose-5-fosfato com liberação de dióxido de carbono. Esta fase é responsável pela geração de D-ribose (que pode ser direcionada para a via de síntese de ácidos nucleicos), D-eritrose-4-fosfato (síntese de aminoácidos aromáticos) e NADPH (necessário para reações anabólicas). A segunda fase é denominada não-oxidativa, a qual recicla as pentoses fosfato à glicose-6-fosfato, que é o composto inicial da fase oxidativa que poderá iniciar um novo ciclo gerando novos cofatores reduzidos (NADPH) quando existe a necessidade. Esta via, PPP, é importante também, uma vez que é a via de integração de xilose no metabolismo e conexão as vias de assimilação de glicose (BENGTSSON et al., 2009; SCHWARTZ et al., 2012).

A via de oxido-redução é a primeira etapa do metabolismo de xilose, a qual consiste resumidamente na conversão de xilose à xilulose (ZHOU et al., 2012). Esta ocorre a partir do momento em que a xilose é absorvida pela célula. Outra rota existente utiliza apenas uma etapa de isomerização do açúcar diretamente em xilulose, por meio da enzima xilose isomerase (XI), presente em bactérias e alguns fungos filamentosos. A via de oxido-redução possui basicamente dois estágios, que envolvem duas reações consecutivas de oxidação e redução respectivamente (FELIPE, 2004; JEFFRIES et al., 2006; ZHOU et al., 2012). A primeira reação consiste na redução de xilose à xilitol, através da enzima xilose redutase (EC 1.1.1.21, XR), dependente de NADH ou NADPH como cofator (BRUINENBERG et al. 1983a, 1983b, 1984; VERDUYN et al. 1985a, 1985b; BRUINENBERG, 1986) dependendo do microrganismo de origem. A segunda reação corresponde à oxidação de xilitol à xilulose, catalisada pela enzima xilitol desidrogenase (EC1.1.1.9, XDH), gerando xilulose que será posteriormente fosforilada pela enzima xilulose kinase (XK) à xilulose-5-fosfato podendo ser levado aos intermediários glicolíticos como o gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) e frutose-6-fosfato (F6P) através da via das pentoses fosfatadas (PPP) (Figura 2).

Figura 2 - Esquema simplificado da via metabólica de *C. guilliermondii* FTI 20037 para a produção de xilitol em meio contendo mistura de xilose e glicose.

Fonte: Adaptado de Kwak et al., (2019).

A influência de fatores externos, no entanto, é extremamente relevante ao se considerar o papel do oxigênio nas condições de crescimento estabelecidas. Este parâmetro parece funcionar de forma a controlar o crescimento e o processo fermentativo (ELIASSON et al., 2000). Devido ao fato da via da oxidoreductase sofrer com o desequilíbrio de cofatores

(JEFFRIES; JIN, 2004), para obtenção de um alto rendimento de xilitol o fluxo de xilose à xilulose deve ser minuciosamente controlado, fornecendo oxigênio suficiente para a regeneração de NADPH através da via das pentoses fosfatadas (PPP) e manutenção celular. Ao mesmo tempo, baixos níveis de oxigênio devem ser garantidos (condição de micro anaerobiose), de maneira que seja favorecida a menor proporção NAD^+/NADH a qual irá direcionar a reação catalisada pelas enzimas XR e XDH para a acumulação de xilitol devido a alteração na constante de equilíbrio (BRANCO et al., 2007; HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016). Ou seja, a formação do produto da primeira reação, o xilitol, é favorecida devido às condições redutoras da célula (altas proporções de NAD(P)H) (OH et al., 2013).

Porém, mesmo em microrganismos que possuem as enzimas da via da oxirredução de xilose constitutivas como *S. stipitis*, a presença da molécula de glicose no meio de crescimento, devido ao fato de ser fonte preferencial de energia (JEFFRIES et al., 2007), pode levar à repressão de genes responsáveis pelo o metabolismo de fontes alternativas de carbono (GANCEDO; SERRANO, 1989). Assim, o consumo de xilose pelas leveduras na presença de glicose é inicialmente bem lento e sofrerá um decréscimo considerável concomitante ao esgotamento de glicose do meio fermentativo (JOJIMA et al., 2010). Por outro lado, a utilização de ambos os substratos, é citada como favorável à formação de xilitol, pois há uma estimulação do metabolismo da xilose pela glicose, a qual pode ser explicada pela geração de metabólitos intermediários necessários para as etapas iniciais do metabolismo da xilose e da via das pentoses fosfatadas através do metabolismo prévio da glicose (MEINANDER et al., 1999; KIM et al., 2013).

Experimentos utilizando a levedura *S. cerevisiae* geneticamente modificada com os genes da via da oxidorreductase foram conduzidos em ensaios de co-fermentação glicose/xilose, presentes nas mesmas proporções no meio reacional. Entre os resultados obtidos foi observada a preferência pela glicose frente à xilose, e o destaque foi dado à correlação demonstrada entre a preferência pelo tipo de açúcar e a eficiência de transporte da molécula específica, sendo assim, os dados encontrados indicaram que os eventos podem estar diretamente conectados (YOUNG et al., 2011).

A influência da glicose na assimilação de xilose em *Candida guilliermondii* foi avaliada por Silva e Felipe (2006) tanto no meio de fermentação quanto no cultivo do inóculo. Neste trabalho, foi constatado que, a presença de diferentes proporções destes monômeros, tanto no preparo do inóculo quanto no meio de fermentação, foram determinantes no crescimento da levedura e assimilação de xilose, assim como na produção

de xilitol. A condição de 1:5 (glicose:xilose) no meio de fermentação se destacou entre as proporções estudadas. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que as enzimas necessárias para o metabolismo da glicose são enzimas constitutivas ou enzimas exigidas em tempo integral pelas células e mantidas em níveis constantes.

A concentração de nutrientes no meio extracelular e sua eventual resposta pelo microrganismo vem sendo estudada por pesquisadores que buscam a melhor compreensão deste fluxo regulatório altamente interconectado entre as vias de detecção de açúcares, interiorização e metabolização (KIM et al., 2013; KOGJE et al., 2016; YAGUCHI et al., 2018), que busca uma rápida resposta celular frente a mudanças nos níveis de glicose disponíveis no meio, garantindo a sua sobrevivência (JOHNSTON; KIM, 2005). Alguns pesquisadores acreditam que a glicose pode reprimir a xilose ao nível do transporte de substrato, glicose e xilose competem pelos mesmos sistemas de transporte, que têm mais afinidade por hexoses (KIM et al., 2012; SUBTIL; BOLES, 2012). Desta forma, os esforços envolvendo modificações genéticas das vias metabólicas as quais buscam aumento na expressão das enzimas intermediárias das vias intracelulares envolvidas no catabolismo de xilose, contribuem no destaque de tais limitações funcionais de dependência do transporte (YOUNG; LEE; ALPER, 2010).

2.3 Transporte de açúcares através da membrana plasmática

Os sistemas biológicos são regulados cuidadosamente de tal modo que estão sempre à procura de manter o equilíbrio entre o meio interno e externo, buscando adaptação a possíveis alterações provocadas no ambiente (GRECCO; SCHMICK; BASTIAENS, 2011). Uma estrutura que está diretamente relacionada com esta manutenção destes processos é a membrana plasmática (KRAPF, 2018). As membranas biológicas possuem um papel central estrutural e funcional na célula. Além de serem importantes para manter a integridade, possibilitam a troca de informações com o meio externo (ERNST; BALLWEG; LEVENTAL, 2018). É importante ressaltar que sua superfície altamente organizada é caracterizada pela existência de domínios altamente específicos, os quais são responsáveis pela existência de diferentes funções, como comunicação célula a célula, iniciação de sinais intracelulares e transmissão de impulsos elétricos (GOULD, 2018).

A membrana é uma estrutura celular formada por uma bicamada lipídica (Figura 3) e proteínas incorporadas, que se apresenta como uma barreira impermeável a moléculas relativamente hidrofílicas (REST et al., 1995). Em organismos eucariotos, existe um

complexo sistema de membranas internas que são estruturas que compartimentalizam e definem uma variedade de organelas celulares, sendo que cada organela possui sua função biológica específica e caracterização membranar adequada (BLANCO et al., 2017).

Figura 3- Modelo de membrana Mosaico Fluido.

Fonte: Adaptado de Madigan et al., (2016).

O clássico modelo “Mosaico Fluido” (SINGER; GARTH, 1972) determina seu funcionamento como uma função diretamente relacionada ao seu dinamismo, ou seja "mudança constante, atividade ou progresso". Extremamente adaptável, a membrana se molda de acordo com o momento atual da célula, sendo susceptível a características intra e extracelulares que agem em constante equilíbrio a fim de garantir a sobrevivência. As membranas devem suportar flutuações de temperatura, osmolaridade, produtos químicos tóxicos, a presença de radiações e longos períodos de privação de nutrientes, bem como a dessecação das células (SAINI et al., 2018).

Um passo obrigatório e essencial na utilização de monossacarídeos por leveduras é o transporte das moléculas de açúcar através da membrana plasmática (DE NOBEL et al., 1989). Embora algumas substâncias, como o etanol, sejam capazes de se difundir rapidamente através das membranas (DONG; YI; LI, 2015), os monossacarídeos podem entrar na célula via transportadores semelhantes a enzimas (também chamados de 'permeases' ou 'sistemas de transporte') denominados proteínas integrais de membrana (SPENCER-MARTINS, 1994).

De um modo geral, o transporte de monômeros de açúcar em leveduras pode ser mediado por dois mecanismos diferentes, os quais compreendem os sistemas de difusão

facilitada e transporte ativo (Figura 4) (BARNETT 2003; EDDY; BARNETT, 2007; BARNETT; DAVSON, 2008).

Figura 4- Exemplos de mecanismos de transporte de açúcares e outras biomoléculas através da membrana plasmática das células de levedura.

Fonte: Adaptado de Ramos et al., (2016).

O sistema de transporte via difusão facilitada envolve a presença de proteínas transportadoras que possuem função de locomoção de substratos e é regulado ao longo de um gradiente de concentração, independente de energia (SAIER et al., 2009). Sua regulação apresenta um limiar de saturação, que pode resultar em uma drástica diminuição na atividade proteica, mas em situações de depleção de substrato dentro da célula, é capaz de responder à sinalização de necessidade nutricional fornecendo o impulso energético voltado para absorção (ASHE; LONG; SACHS, 2000). Da mesma forma, em situações onde houver acumulação celular de metabólitos que excedem as do meio, este será impulsionado para fora da célula de acordo com o gradiente de concentração. O sistema de transporte de açúcares via difusão facilitada é o mais comum entre os componentes de transporte por onde ocorre a absorção de hexoses (LAGUNAS, 1993).

Além do transporte via difusão facilitada, outro tipo de transporte associado ao transporte de monossacarídeos seria o mecanismo de transporte ativo (GÁRDONYI et al., 2003b). Este possui um importante papel na manutenção do gradiente de prótons e cátions pela membrana da célula. Ao contrário do sistema de difusão, o transporte ativo é capaz de mover o substrato contra o gradiente de concentração (BARNETT, 2008), sendo que, para realizar esta tarefa, conta com gasto de energia na forma de ATP. Este sistema é controlado pela expressão gênica de uma gama de proteínas conhecidas como ATPases envolvidas diretamente no controle de absorção e destoxificação do citosol, codificadas por um único

gene, denominado *PM1* (SERRANO; KIELLAND-BRANDT; FINK, 1986). Tais enzimas bombeiam prótons gerados a partir do catabolismo de hexoses e auxiliam na manutenção do pH celular em uma faixa ótima que garanta a atuação das enzimas e sobrevivência celular. Ao mesmo tempo, este mesmo gradiente de prótons gerado no ambiente extracelular pode servir como fonte de energia para o transporte tipo simporte ou antiporte, o qual utiliza a energia livre liberada e armazenada na forma de gradiente de prótons e consumida por sistemas de transporte (EDDY; BARNETT, 2007). Tais mecanismos são importantes no consumo de pentoses, incluindo o transporte de xilose no transporte próton-acoplado de substratos (LEANDRO; SPENCER-MARTINS; GONÇALVES, 2008).

2.3.1 Proteínas transportadoras de açúcares em leveduras

A família Sugar Porter (SP) -TCDB (2.A.1.1.) compreende a grande maioria dos membros da grande superfamília de facilitadores (MFS). O sistema de classificação de transportadores (TC) é usado para catalogar proteínas transportadoras transmembranas, com base em dados funcionais e filogenéticos (SAIER et al., 2006). As proteínas pertencentes à superfamília MSF geralmente exibem forte conservação estrutural, variam entre 400 e 600 resíduos de aminoácidos de comprimento (VARDY et al., 2004). As estruturas conservadas consistem da presença de geralmente 12 domínios hidrofóbicos transmembrana, cinco motivos de sequência conservados e as regiões amino e carboxi-terminais citoplasmáticas (Figura 5) (LEANDRO; FONSECA; GONÇALVES, 2009).

Figura 5- Topologia dos transportadores de açúcar de levedura. Geralmente, transportadores de monossacarídeos em leveduras possuem 12 domínios transmembrana hidrofóbicos (representados como cilindros). A posição dos cinco motivos conservados que foram reconhecidos nos transportadores de açúcar é representada na figura pelas letras (A-E)

Fonte: Adaptado de Leandro; Fonseca; Gonçalves, (2009).

A existência de cinco motivos proteicos conservados relacionados ao transporte de açúcares, independentemente do seu mecanismo ou substrato específico foi um fator que auxiliou consideravelmente na identificação dos genes de transportadores de açúcar em diversos organismos (GRIFFITH et al., 1992; HORAK, 1997; PAO et al., 1998).

2.3.2 Transporte de monossacarídeos: glicose e xilose

De acordo com Barnett et al. (1990), as fontes de carbono utilizadas preferencialmente pela maioria das espécies de leveduras são as hexoses glicose, frutose e manose. A integração destas moléculas no metabolismo de leveduras para que sejam aproveitados pela célula para geração de energia e blocos construtores ocorre após seu transporte para dentro da célula (BISSON et al., 1993). Existe uma relação direta controlada a nível de expressão gênica e a nível pós-traducional que garante a sobrevivência celular em situações de alteração na disponibilidade de nutrientes no meio externo (HORÁK, 2013). Em condições de stress onde a célula deve se adaptar ao consumo de fontes alternativas de carbono, o transporte através da membrana deve permitir a absorção de tais monossacarídeos, consequência da alteração na programação celular dependente da interconexão entre as vias de sinalização e regulação (OZCAN; JOHNSTON, 1999; EWALD, 2018).

Em situação de altas concentrações de glicose no meio extracelular, as taxas de fluxo glicolítico se elevam e o ritmo de crescimento é acelerado (BASAN et al., 2015). Como consequência, em leveduras tipo *S. cerevisiae*, níveis elevados de substrato levam ao metabolismo respiro-fermentativo com produção concomitante de etanol. Também conhecido como efeito *Crabtree*, este mecanismo funciona como base para o entendimento de como a disponibilidade de nutrientes é capaz de afetar desenvolvimento celular além de demonstrar a influência de controle do fluxo glicolítico a nível de transporte de substrato (GONZÁLEZ SISO et al., 1996; DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011).

Sabendo das dificuldades existentes em ensaios de co-fermentação de hexoses e pentoses por leveduras, e tendo o transporte como passo limitante e determinante na regulação do desenvolvimento celular, é de conhecimento notório que as proteínas transportadoras presentes nestes organismos têm uma afinidade muito maior por moléculas de hexoses (KYUPER et al., 2005). Tal fato pode criar inibição competitiva desfavorável e levar ao crescimento diáuxico na condição de co-fermentação xilose/glicose (YOUNG; LEE; ALPER, 2010).

Existem diferenças significativas no que diz respeito ao transporte de hexoses e pentoses, mesmo que existam situações em que possam compartilhar dos mesmos mecanismos e proteínas transportadoras (GONÇALVES et al., 2014). O sistema de transporte de pentoses, especificamente xilose, pode ser realizado através dos dois mecanismos já citados: difusão facilitada ou via transporte ativo. Estes podem ser definidos como sistemas distintos de transporte, sendo o sistema de difusão facilitada como de alta capacidade e de baixa afinidade, que é compartilhado por xilose e glicose e o mecanismo de transporte ativo (próton-simporte) compreende um sistema de alta afinidade pela molécula de xilose. Ambos já foram identificados nas leveduras *S. stipitis*, *Pichia heedii*, *C. shehatae* e *C. intermedia* (DOES; BISSON, 1989; KILIAN; UDEN, 1988; LUCAS; VANUDEN, 1986; VAN URK et al., 1989; LEANDRO, et al., 2006; LEANDRO; FONSECA; GONÇALVES, 2009). Com pouquíssimas exceções, os transportadores pertencentes ao mecanismo de transporte ativo (próton-simporte), de alta afinidade, são expressos nas condições de baixas concentrações de açúcar, enquanto os facilitadores de baixa afinidade são expressos quando o açúcar é abundante no meio extracelular (GÁRDONYI et al., 2003a). O sistema de transporte ativo próton, além disso, devido à sua natureza, é importante ressaltar que permite a acumulação intracelular de pentoses (GÁRDONYI et al., 2003b).

A cinética de transporte de xilose em *Candida intermedia* PYCC 4715 foi avaliada por Gárdonyi et al. (2003b), onde foi demonstrado que, em baixas concentrações, a pentose foi principalmente transportada via transporte ativo (alta afinidade/baixa capacidade). Além disso, a presença de glicose, ainda que em baixas concentrações, exerceu forte inibição neste tipo de transporte. Quando a xilose estava presente em altas concentrações no meio externo, foi reportado que ela foi absorvida pelo sistema de baixa afinidade/alta capacidade de difusão facilitada.

Ainda são necessárias investigações para o esclarecimento do mecanismo e função do transporte de xilose em ensaios de co-fermentação, seu envolvimento com a via de repressão da glicose através do transportador de açúcar, e engenharia de proteínas de transportadores específicos de xilose (SHARMA et al., 2018). Sendo a presença de glicose em diferentes concentrações determinante neste controle de absorção de nutrientes exercido pela célula de *S. cerevisiae* e outras espécies relacionadas, o aproveitamento eficiente de fontes alternativas de carbono representa uma estratégia com potencial, mas que demanda um melhor entendimento sobre como a molécula é internalizada e as condições de controle em que são favorecidas as vias que irão direcionar para o aumento na eficiência de fermentação de xilose (GÁRDONYI et al., 2003a; SHARMA et al., 2018).

2.3.2.1 Proteínas responsáveis pelo transporte de glicose e xilose através da membrana plasmática

O conjunto de proteínas homólogas com função de transporte de açúcares através da membrana forma uma família multigênica denominada HXT (hexose transporter) (OZCAN; JOHNSTON, 1999). As proteínas pertencentes a esta família são codificadas por 20 genes (HXT1-17, GAL2, RGT2 e SNF3). Dos 20 membros da família dos genes HXT, apenas 7 são conhecidos por codificar transportadores funcionais de glicose: HXT1-7 (OZCAN; JOHNSTON, 1999; APEL et al., 2016).

A captação de glicose é realizada pelas proteínas HXT, as quais desempenham um importante papel no controle das atividades do metabolismo da glicose (LIN; LI, 2011). Os transportadores HXT1 à HXT4 juntamente aos HXT6 e HXT7 são os mais importantes para a captação desta hexose, uma vez que a deleção dos genes correspondentes às proteínas impossibilitou o crescimento em qualquer concentração de glicose, frutose ou manose como fontes de carbono (BOLES; HOLLENBERG, 1997).

A diferenciação da expressão é regulada de tal forma que, cada proteína HXT possui afinidade diferente pela glicose, dependendo das concentrações extracelulares (DIDERICH et al., 1999; MAIER et al., 2002; KIM, 2009). Essa definição pode ser determinada pelos parâmetros cinéticos de cada uma das proteínas transportadoras, de acordo com as afinidades apresentadas pelos respectivos substratos (WIECZORKE et al., 1999). Estirpes geneticamente modificadas expressando apenas um único gene HXT transportador têm sido utilizadas para realizar a caracterização de parâmetros cinéticos e posteriormente relacionar/associar seu papel fisiológico no contexto em que o gene terá sua expressão induzida/reprimida. A introdução de qualquer um dos sete genes HXT no mutante ausente HXT é suficiente para permitir o crescimento em glicose (OZCAN; JOHNSTON, 1999).

Na medida em que a glicose presente no meio é consumida, e sua concentração diminui, a necessidade de transportadores com maior afinidade transportador/substrato aumenta. Esta capacidade de modulação da afinidade de transportadores específicos provocada via mecanismos regulatórios garante que a célula de levedura irá expressar apenas o sistema de transportador apropriado de acordo com a concentração momentânea do ambiente e representa um mecanismo evolutivo de adaptação que minimiza o gasto de energia e otimiza as condições de sobrevivência (BOLES; HOLLENBERG, 1997; DIDERICH et al., 1999). Com base nas medições da cinética do transporte de glicose, é proposto que a taxa de transporte de glicose ($V_{m\acute{a}x}$) seja constante e que apenas a afinidade

do transportador pela glicose muda quando as células são alteradas de um ambiente rico para um de baixa concentração de glicose (WALSH et al., 1994).

HXT1 consiste em uma proteína transportadora de aproximadamente 570 aminoácidos, cuja afinidade por glicose é classificada como baixa ($K_m \sim 100 \text{ mM}$) (ROY et al., 2014). De acordo com seus parâmetros cinéticos, foi observado que sua expressão ocorre em condições de altas concentrações de glicose no meio extracelular ($>1\%$) (REIFENBERGER et al., 1997). Estudos envolvendo a superexpressão do gene HXT1 realizados por Reinfeiberguer et al. (1997) demonstraram um claro aumento na absorção de glicose extracelular, comprovando que ele está diretamente envolvido no transporte de glicose.

Existe uma grande proximidade de sequências entre HXT1 e HXT3. Este último codifica uma proteína de 567 aminoácidos e também é classificado como transportador de baixa afinidade ($K_m \sim 30\text{-}60 \text{ mM}$) (REIFENBERGER et al., 1997). No entanto, a expressão de HXT3 é induzida tanto em níveis baixos quanto altos de glicose (BOLES; HOLLENBERG, 1997), todavia, devido ao seu valor de K_m calculado, provavelmente é responsável, juntamente a HXT1, pelo transporte de glicose nas células em crescimento sob altas concentrações de glicose (ROY et al., 2014).

Quando as concentrações de glicose são reduzidas para cerca de 0.1% , HXT2 e HXT4, os quais codificam transportadores de glicose de afinidade moderada ($K_m \sim 5\text{-}10 \text{ mM}$), são expressos. Já HXT6 e HXT7, que codificam transportadores de glicose de alta afinidade ($K_m \sim 1 \text{ mM}$) são expressos apenas pouco antes da depleção de glicose no meio (YE et al., 2001).

O gene HXT5 codifica uma proteína de 592 aminoácidos, corresponde a uma proteína cerca de aproximadamente 20 aminoácidos maior que os principais transportadores de hexose. A expressão de HXT5 codifica transportador de glicose de afinidade moderada ($K_m \sim 10 \text{ mM}$), o qual foi reportado não ser regulado pelas concentrações extracelulares de glicose. No entanto, alteração nas condições ambientais como temperatura e osmolaridade, foram relacionadas com o aumento na expressão do gene (DIDERICH et al., 2001; VERWAAL et al., 2002). Dada a importância do transporte de nutrientes, foi demonstrado também que, a superexpressão de HXT1 ou HXT7 em *S. cerevisiae* além de aumentar as taxas de absorção de glicose resultou no aumento da produção de etanol (ROSSI et al., 2010).

Além de *S. cerevisiae*, a levedura *S. stipitis* foi caracterizada e utilizada em diversos trabalhos relacionado ao transporte de monossacarídeos devido à sua capacidade de fermentar xilose, no entanto, o funcionamento do sistema de transporte de xilose ainda não

é bem esclarecido (KILIAN; UDEN, 1988; JEFFRIES et al., 2007). A presença de quatro genes que codificam proteínas transportadoras de glicose SUT1, SUT2, SUT3 e SUT4 foram identificadas nesta espécie. Estas proteínas seriam capazes de transportar xilose e outros monossacarídeos com uma afinidade consideravelmente menor quando comparadas ao seu substrato preferencial (glicose) (WEIERSTALL et al., 1999). Pesquisas envolvendo a deleção dos genes SUT e que resultaram na permanência de absorção da pentose levaram os autores a supor a existência de outras proteínas responsáveis pelo transporte de xilose em *S. stipitis* (WEIERSTALL et al., 1999).

Leandro, Gonçalves e Spencer-Martins, (2006), realizaram a identificação e codificação de genes possivelmente associados ao transporte de xilose (GXF1 e GXS1), na levedura *Candida intermedia*. O gene GXF1 (glucose/xylose facilitator 1) isolado de *Candida intermedia* codificou para transportador constitutivamente expresso para glicose/xilose que mediou a absorção de baixa afinidade de xilose. Já GXS1 (glucose/xylose symporter 1) codificou para um possível transportador de alta afinidade por xilose, e caracterizado como parte da família de monossacarídeos-próton simporte presentes em diversas espécies de leveduras, mas ausente em *S. cerevisiae*.

Em trabalhos subsequentes utilizando o sistema de expressão heteróloga de GXS1 em *S. cerevisiae*, resultados de comportamento cinéticos reportados pelo grupo exibiram valores de Km para xilose de 0.2 mM. Entretanto, o valor de Km encontrado para glicose ainda foi cerca de 10x menor, ou seja, o transportador ainda possuía maior afinidade por glicose (LEANDRO; SPENCER-MARTINS; GONÇALVES, 2008).

Considerando que leveduras naturalmente fermentadoras de xilose como boas fontes de transportadores de pentoses (LEANDRO et al., 2009) após a realização do sequenciamento genômico de *S. stipitis* por Jeffries et al. (2007) uma coleção de transportadores de açúcar foram anotados em bancos de dados, dentre eles foram identificados possíveis transportadores de xilose. Posteriormente denominadas proteínas XUT1, XUT2, XUT3, XUT4, XUT5, XUT6 e XUT7 estes transportadores foram então incluídos em um total de 26 possíveis diferentes transportadores de monossacarídeos, em uma linhagem hexose transporter-null de levedura, complementada com a via XR-XDH. No entanto, apenas XUT1 e 3 entre os transportadores XUT testados resultaram em uma melhora significativa no crescimento de *S. cerevisiae* em xilose como única fonte de carbono (YOUNG et al., 2011).

Já em outra linhagem de *S. cerevisiae* (Y-50049), a qual possui intactos os genes referentes aos transportadores não específicos para xilose HXT 4,5,7 e GAL2, a

transformação desta com a introdução de XUT4 ou XUT6, resultou no aumento significativo do crescimento celular em meio contendo apenas xilose como fonte de carbono (MA; LIU; MOON, 2012). Já Moon et al. (2013) reportaram que entre os transportadores identificados de *S. stipitis*, XUT7 e RGT2 expressos na mesma linhagem de *S. cerevisiae* (Y-50049), como os melhores no quesito desempenho no consumo de xilose como única fonte disponível de carbono, seguido de XUT4, XUT6 e XUT5, classificando-os nesta ordem. Também demonstraram que RGT2 poderia estar diretamente relacionado ao transporte de xilose, diferente da sua função previamente identificada de proteína sensora.

Em estudos realizados por Gonçalves et al. (2014), durante co-fermentações de xilose/glicose, onde foi feita a clonagem e expressão individual dos transportadores de hexoses em *S. cerevisiae*, foi constatado que a estirpe expressando o gene HXT1 de baixa afinidade foi incapaz de permitir a absorção de xilose, quando este açúcar era a única fonte de carbono disponível. Da mesma forma, HXT5, que expressa um transportador de afinidade moderada, também não permitiu absorção significativa de xilose pelas células. Já HXT2, que expressa um transportador de alta afinidade, permitiu a incorporação de xilose com as mesmas taxas observadas durante o consumo de glicose, mesmo sob condições de co-fermentação, indicando que seria um bom alvo de transportador que possua um sítio de ativação com propriedades semelhantes para xilose e glicose. Além destes, foi testada a afinidade da permease HXT7 de alta afinidade, onde foi constatada a fermentação eficiente da xilose, no entanto, durante as co-fermentações de xilose/glicose esta permease demonstrou uma clara preferência pela glicose.

Foi relatado que a especificidade e cinética do transporte de açúcar pode ser redefinida através da alteração do motivo conservado (G-G-XXX-G) para (G-F-XXX-G) encontrada no primeiro espaço transmembranar de diversos transportadores previamente reportados (YOUNG et al., 2013). Empregando uma combinação de técnicas envolvendo bioinformática e mutagênese sítio dirigida, Young et al. (2013) identificaram a presença desta sequência consenso e os resultados obtidos indicaram haver uma relação direta com o transporte de xilose. Estes mesmos pesquisadores foram capazes de produzir uma linhagem mutante de *S. cerevisiae* expressando um único transportador, HXT7, capaz de crescer em xilose como fonte de carbono, mas não em glicose. O motivo conservado encontrado como sequência consenso para identificação do potencial transportador de xilose pode ser visualizado através de banco de dados de domínio conservado (CDD) (MARCHLER-BAUER et al., 2012). A partir de então, a aplicação de metodologia de mutagênese sítio

dirigida na obtenção de um transportador específico para xilose tem demonstrado resultados encorajadores (APEL et al., 2016).

2.4 Sinalização celular e regulação do transporte de glicose

O processo de transporte de hexoses é controlado em diferentes níveis dentro da célula. A regulação e sinalização a nível de fosforilação é um tipo de controle que ocorre em uma variedade de proteínas e fatores de transcrição. Ação é baseada na reprogramação celular, no qual todo o mecanismo pelo qual a célula emite resposta é alterado e adaptado em resposta a alguma ocorrência, como falta da fonte de carbono principal e necessidade de uso de fontes alternativas. Esta transição conta com ativação e inativação de genes e é minuciosamente regulada por uma série de proteínas que estabelecem entre si uma rede comunicativa (KRESNOWATI et al., 2006). Este tipo de regulação pode ser identificada durante a expressão das proteínas da família HXT (KIM, 2009; KIM et al., 2013). Este sistema responde à concentração de glicose no meio externo e coordenam eficientemente a afinidade dos transportadores expressos (DARAN-LAPUJADE et al., 2004; ELBING et al., 2004).

Os nutrientes não servem apenas como fonte de energia e blocos de construção para células e organismos, mas também exercem funções regulatórias cruciais (CONRAD et al., 2014). A alternância na disponibilidade dos nutrientes no meio extracelular estimula uma cascata de moléculas transmissoras de sinais conhecidas como segundos mensageiros que irão resultar diferentes respostas celulares. Moléculas que podem operar tanto como intermediários do metabolismo da levedura quanto como segundos mensageiros incluem: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), glicerol, trealose, peróxido de hidrogênio, aminoácidos, esfingolípídios, espermidina, ácido sulfídrico, ácido acético, etanol, ácidos graxos livres e diacilglicerol (MOHAMMAD et al., 2018). Um exemplo clássico de regulação nutriente específica é o *lac operon* em *Escherichia coli* (KUHLMAN et al., 2007).

A captação de glicose envolve o *crosstalk* entre três principais vias de sinalização em células de levedura: a via de detecção de glicose RGT2/SNF3, a via de repressão de glicose SNF1-MIG1 e a cascata de sinalização de cAMP-PKA (GANCEDO et al., 2008; BROACH, 2012; CONRAD et al. 2014; KIM et al. 2013; RØDKÆR; FÆRGEMAN 2014).

2.4.1 Proteínas sensoras de glicose extracelular: *SNF3* e *RGT2*

Muitas células se adaptam às mudanças nos níveis de nutrientes extracelulares, alterando a expressão de genes que codificam transportadores para essas moléculas. Isto é realizado através de vias de transdução de sinal que respondem à ligação dos nutrientes extracelulares às proteínas sensoras existentes na membrana plasmática (WU et al., 2006).

A levedura *S. cerevisiae* possui ancorada em sua membrana plasmática, proteínas que são conhecidas por sua função como sensoras, ou seja, são capazes de diferenciar baixas e altas concentrações de glicose no meio extracelular (CONRAD et al., 2014). Estas proteínas são: *SNF3* e *RGT2* e pertencem à família de transportadores de hexoses, como dito anteriormente, e são classificadas como “transporter-like proteins” cuja função é a determinação de baixas e altas concentrações de glicose, respectivamente. Ambas, *SNF3* e *RGT2* possuem localização transmembrana, e geralmente 11/12 domínios hidrofóbicos, da mesma forma que as demais proteínas pertencentes à família. Estão envolvidas na indução de genes que codificam os transportadores de hexoses (HXT) promovendo a importação eficiente de substrato (OZCAN; JOHNSTON, 1999).

O gene *SNF3* codifica uma proteína regulatória (*SNF3*) que possui diversos correspondentes homólogos em organismos diferentes. Esta proteína possui 884 aminoácidos, e sua presença é necessária para que a célula sinta quaisquer alterações ambientais nas concentrações de glicose disponíveis no meio extracelular, especificamente, adaptação rápida a situação de depleção de glicose. Já *RGT2* codifica uma proteína de 763 aminoácidos e ao contrário de *SNF3*, responde a altas concentrações de glicose. Ambos os sensores possuem uma longa cauda c-terminal localizada na interface citoplasmática que possuem a capacidade de interagir com as proteínas localizadas a downstream pertencentes e interligadas na rede de regulação (MORIYA; JOHNSTON, 2004).

Considerando que *SNF3* é sensor de baixas concentrações de glicose, estudos de clonagem e expressão com mutantes do gene *SNF3* resultaram na diminuição da absorção de glicose pelas proteínas de alta afinidade (HXT6,7), no entanto, a absorção via proteínas que possuem baixa afinidade se manteve em níveis normalizados. Ou seja, de alguma forma a atuação de proteínas de alta afinidade (baixo Km) não permitiu/diminuiu o crescimento celular em baixas concentrações de glicose, comprovando sua função e relação com os transportadores de alta afinidade (BOLES; HOLLENBERG, 1997).

2.5 *Candida guilliermondii* e *Candida tropicalis*

As leveduras compreendem um grupo de microrganismos eucariotos e unicelulares, pertencentes ao domínio *Eukarya* (PHAFF, 1978). Elas oferecem vantagens únicas em estudos genéticos e especialmente na compreensão das relações filogenéticas entre organismos eucariotos (DUJON, 2012).

Em particular, as leveduras *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* são pertencentes ao filo Ascomycota, sub-filo Saccharomycotina, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales, família Debaryomycetaceae e gênero *Candida* (BARNETT et al., 2000). Conhecidas popularmente como espécies de *Candida* “não-*albicans*” (PAPON et al., 2013).

A espécie *C. guilliermondii*, correspondente ao anamorfo *Meyerozyma guilliermondii*, é uma levedura amplamente distribuída nos ecossistemas naturais e também encontrada como colonizadoras, principalmente nos tecidos de origem cutânea em seres humanos. Possui grande importância na pesquisa devido a sua ampla abordagem em diversas áreas como por exemplo no controle biológico, aplicações clínicas e principalmente em biotecnologia (PAPON et al., 2013). Seu potencial na indústria vem sendo explorado devido a sua capacidade de produção de riboflavina (RF, vitamina B2) (ABBAS; SIBIRNY, 2011) e também devido a sua característica natural de bioconversão de xilose em xilitol (FELIPE et al., 1995; FELIPE, 2004; ZOU et al. 2010; ARRUDA et al., 2017). Além disso, *Candida guilliermondii* é uma fonte promissora de enzimas, a exemplo da inulinase (GUO et al., 2006) e de outras moléculas como ácido cítrico (PAPAGIANNI, 2007), exopolissacarídeos (GIENTKA et al., 2016), bem como na produção de biocombustíveis (SCHIRMER-MICHEL et al., 2008; WANG et al., 2012).

A capacidade natural de *C. guilliermondii* em metabolizar pentoses, como xilose e arabinose, ainda que esta última seja assimilada em menor proporção, tem impulsionado o desenvolvimento de pesquisas envolvendo a linhagem *C. guilliermondii* FTI20037, que apresenta um ótimo desempenho na utilização e consumo de xilose como fonte de carbono, proveniente de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço e palha de cana (HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015; ARRUDA et al., 2017). A avaliação da capacidade de assimilação de outros açúcares também indicou que essa levedura foi capaz de metabolizar dissacarídeos como sacarose e maltose quando adicionados ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana no papel de co-substratos para a produção de xilitol (HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015).

Já a espécie *C. tropicalis* tem a capacidade de colonizar células epiteliais urinárias (NEGRI et al., 2010) entretanto, a extensão e adesão nas células epiteliais é dependente da linhagem (SILVA et al., 2011). Possui como característica a capacidade de formação de biofilmes e secreção de uma série de enzimas hidrolíticas (KOTHAVADE et al., 2010). Da mesma forma que *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* também consiste em um microrganismo naturalmente capaz de metabolizar açúcares C5, o qual também possui grande interesse industrial (KIELISZEK et al., 2017; MOHAMAD et al., 2015), devido às inúmeras aplicações. Entre elas destaca-se a produção de ácidos dicarboxílicos de cadeia longa (PICATAGGIO et al., 1992), ácido cítrico (KIM; LEE, H. ; LEE, C., 2015), etanol (OBEROI et al., 2010; SWAIN; KRISHNAN, 2015) bem como a biomolécula xilitol (KIM; RYU; SEO, 1999; HERNÁNDEZ-PERÉZ, 2015; MOHAMAD et al., 2015; ARRUDA et al., 2017). Inclusive, em um dos primeiros estudos de fermentação de xilose por estas leveduras em meio semidefinido, foi constatado o destaque no potencial de conversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* (BARBOSA et al., 1988). As perspectivas de aplicação biotecnológica de leveduras pertencentes ao gênero *Candida* buscam o fornecimento de uma melhor imagem do papel deste grupo, não convencional de leveduras, deixando clara a possibilidade de biossíntese de uma gama de metabólitos como o xilitol, eritritol, ácido cítrico, etanol e enzimas (KIELISZEK et al., 2017).

2.5.1 Relação filogenética e linhagens de leveduras

O genoma e modelos genéticos de *Meyerozyma guilliermondii* e *C. tropicalis* foram inseridos no banco de dados do NCBI no ano de 2010 (BUTLER et al., 2010) a partir da iniciativa *Fungal Genome* do Instituto *The Broad*. Clones de cinco espécies pertencentes ao gênero *Candida* foram construídos no próprio instituto e posteriormente tiveram seu genoma completo sequenciado e anotado (BUTLER et al., 2010). Dessa forma, diversas abordagens no estudo da conservação de genes e regulação, bem como o entendimento sobre como a evolução agiu sobre tais elementos são estimulados e facilitados em leveduras pertencentes ao gênero (YVERT et al., 2003).

Uma abordagem recorrente nos estudos envolvendo análises filogenéticas é a construção de árvores que descrevem as relações evolutivas dentro de um grupo de espécies a partir da realização da combinação de vários alinhamentos de sequências (MARCET-HOUBEN et al., 2009). As comparações genômicas entre espécies de eucariotos foram inicialmente exploradas a partir do sequenciamento dos primeiros organismos sequenciados:

levedura (*S. cerevisiae*), nematódeo (*Caenorhabditis elegans*), inseto (*Drosophila melanogaster*), planta (*Arabidopsis thaliana*) e humano (*Homo sapiens*) (DUJON et al., 2004). Neste período referente ao início da era do sequenciamento, o fator limitante era a quantidade de elementos sequenciados, gerando como resultado aproximações entre organismos, as quais nem sempre eram corretas (EISEN, 1998). No entanto, concomitante ao avanço das pesquisas, houve um aumento considerável no número de organismos que se encontram atualmente sequenciados e que vêm sendo depositados em bancos de dados, possibilitando a montagem de relações filogenéticas mais complexas e verdadeiras (PETER et al., 2018; GRESHAM; RANCATI, 2019). Vários grupos propuseram árvores de espécies fúngicas com base no alinhamento concatenado de proteínas selecionadas de genomas totalmente sequenciados (KURAMAE et al., 2006; CORNELL et al., 2007). No entanto, uma consequência natural desta metodologia é que o número de genes considerados na análise filogenética diminui à medida que o número de genomas incluídos cresce (MARCET-HOUBEN et al., 2009).

Entre as metodologias de identificação entre as espécies de leveduras, estão incluídas técnicas como a identificação de fenótipos, análises bioquímicas comerciais convencionais de aspectos baseados em atributos morfológicos e fisiológicos. No entanto, esses métodos geralmente não são confiáveis para a identificação precisa de espécies de leveduras intimamente relacionadas (PINCUS; ORENGA; CHATELLIER, 2007).

Por outro lado, estudos baseados nas sequências gênicas consideraram a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA como código de barras universal de DNA (SCHOCH et al., 2012). Sendo assim, a utilização desta sequência como um alvo de escolha na projeção de primers específicos é uma técnica aplicada na identificação de espécies, considerando que as subunidades do rDNA contêm domínios conservados separados por regiões variáveis (ITS1 e ITS2) (NEPPELENBROEK et al., 2014), uma vez que estas regiões espaçadoras consideradas sequências específicas de acordo com a espécie, permitindo assim a identificação correta (Figura 6).

Figura 6- Representação esquemática região rDNA de organismos pertencentes ao Reino Fungi.

Fonte: Pincus; Orenga; Chatellier, (2007).

Devido à sua característica universal, primers ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 e ITS5 descritos por White et al. (1990) servem para amplificação das regiões dos espaçadores ITS1 e ITS2 do rDNA. Utilizando o par de primers ITS1 e ITS4, o amplicon obtido possui aproximadamente 600pb (WHITE et al., 1990). Desta forma, esta metodologia pode ser encontrada em diversos estudos envolvendo classificação de espécies de fungos e leveduras, incluindo a diferenciação entre espécies do gênero *Candida* (LINDSLEY et al., 2001; NEPPELENBROEK et al., 2014; ROMI et al., 2014), sendo reportados como método relativamente rápido e de confiança (PINCUS; ORENGA; CHATELLIER, 2007). Um estudo anterior desenvolvido na Escola de Engenharia de Lorena por Lima, De Almeida Felipe e Gonçalves Torres (2003), sugeriu a reclassificação da estirpe de *C. guilliermondii* FTI20037 como *C. tropicalis* com base nas análises moleculares das sequências da região correspondente ao espaçador ITS.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar proteínas possivelmente envolvidas no transporte de xilose através da membrana plasmática da célula de *Candida guilliermondii* FTI 20037 e avaliar a relação entre expressão gênica destas proteínas sob diferentes condições do processo fermentativo.

3.2 Objetivos específicos

- Confirmação da espécie de levedura através do sequenciamento da região rDNA de *Candida guilliermondii* FTI 20037.
- Levantamento de um banco de sequências que codifiquem para proteínas pertencentes a família *Sugar Porter* (SP) capazes de transportar moléculas de monossacarídeos através da membrana identificadas em *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* e *Candida intermedia*, as quais possuem proteínas transportadoras de monossacarídeos já reportadas.
- Triagem das proteínas de acordo com programas que forneceram a caracterização da presença de domínios nas sequências já identificados e relacionados ao transporte de monossacarídeos.
- Análise filogenética dos transportadores identificados de acordo com a homologia das sequências.
- Análises e avaliação comparativa do desempenho fermentativo de acordo com os parâmetros (1) crescimento celular, (2) consumo de xilose e (3) produção de xilitol durante as condições pré-estabelecidas: meio semi-definido contendo xilose e/ou glicose como fontes de carbono.
- Determinação do nível de expressão dos genes que codificam as proteínas candidatas selecionadas de acordo com a filogenia gerada, via Real Time PCR (qPCR), em diferentes tempos do processo fermentativo de meio semi-definido contendo xilose e/ou glicose como fontes de carbono.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentações, e Laboratório de Genômica Funcional e Biotecnologia Vegetal do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP).

4.1 Microrganismo

A levedura utilizada durante os experimentos, *Candida guilliermondii* FTI 20037, selecionada por Barbosa et al. (1988) já é bem caracterizada pelo grupo GMBIO por sua capacidade de produção de xilitol, e mantida a 4°C em ágar extrato de malte.

4.2 Sequenciamento da região do rDNA e das enzimas Xilose Redutase (XR) e Xilitol Desidrogenase (XDH) e análises das sequências.

Para realização dos experimentos de confirmação da espécie, o DNA genômico de *C. guilliermondii* FTI 20037 foi extraído utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification de acordo com as recomendações do fabricante. Após o isolamento do DNA, com o intuito de sequenciar a região correspondente ao rDNA, primers universais foram desenhados para amplificação, de acordo com metodologia de WHITE et al., (1990). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50μL, consistindo de 2 μL dNTP, 50 μL MgCl₂ (50mM), 2 μL de cada primer, Tampão CG 5X (10μL), 0,5μL Phusion Taq polimerase e 0,5 μL DNA genômico de levedura como molde. Adicionalmente, a confirmação da sequência dos genes que codificam as enzimas Xilose redutase (XR) e Xilitol desidrogenase (XDH) também foi realizada, nas mesmas condições, utilizando primers específicos para cada uma das enzimas. Todos os primers utilizados nos experimentos estão listados na Tabela 1. Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação do tamanho das bandas correspondentes.

Em um trabalho desenvolvido por Luo e Mitchell (2002), a partir de experimentos utilizando a técnica de PCR multiplex, foram detectados diferentes primers específicos para algumas espécies de leveduras, entre elas *C. tropicalis*. Esta metodologia também foi testada, com a reação de PCR nas mesmas condições anteriores, com alteração na Temperatura de *melting* (T_m) calculada de acordo com os respectivos primers.

Os produtos de PCR foram purificados através do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System e então sequenciados em ambas as direções com os primers universais respectivos ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) e primers referentes às enzimas XR (Xilose redutase) e XDH (Xilitol desidrogenase) (Tabela 1) pela EXXTEND Biotecnologia (São Paulo, Brasil).

As sequências foram analisadas contra o GenBank a partir do algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990), após serem corretamente ajustadas utilizando o programa SnapGene Viewer e alinhadas utilizando-se o módulo MUSCLE (Edgar, 2004) no MEGA 7.0.

Tabela 1- Sequência dos primers utilizados no experimento e suas respectivas temperaturas de *melting* (T_m)

Primer	Sequência (5' - 3')	T _m (°C)
XR(F)	TATGTTTAAATTTTTCACCTTCTCCAACAAC	57
XR(R)	ATTAAACAAAGATTGGAATGTTGTCCC	57
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCG G	58
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	58
CTR1	CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT	58
CTR2	TGGCCACTAGCAAAATAAGCGT	58
Real time		
rtGXT2(F)	TCTGCCAACTGGATTCTCTCC	60
rtGXT2(R)	GGGGAAGAATGTTTGTGAAGTGA	60
rtXUT1(F)	CTGGTTGGGTTGCTGTTGTG	60
rtXUT1(R)	GAGACAATGACCCAGGCACA	60
ACT1(F)	TCCCAGGTATTGCTGAACGT	60
ACT1(R)	GGAACCACCGATCCAGACAG	60
PDA1(F)	TGGTATTGCCCACGGTAAGG	60
PDA1(R)	GCACCCAATGGAAGTTGAGC	60

Fonte: Autoria Própria

A identidade entre as sequências candidatas ao transporte de xilose obtidas foi calculada através do programa Geneious (KEARSE et al., 2012) através das sequências de *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* disponíveis no GenBank.

4.3 Identificação das proteínas relacionadas ao transporte de xilose no genoma de *Candida tropicalis*

Uma seleção de 21 proteínas (Tabela 2) foi utilizada como modelo no algoritmo BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990) e buscadas contra as proteínas preditas com base na sequência do genoma de *Candida tropicalis* MYA-3404 (Ct), obtida pelo projeto desenvolvido no Instituto Broad-FGI (Fungal Genome Initiative), MIT/Harvard (BUTLER et al., 2010) e depositado no NCBI (2017). A seleção destas proteínas e sua possível relação com o transporte de xilose foi feita com base em dados encontrados na literatura com função de transportadores e sensores de monossacarídeos existentes em 3 espécies de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Scheffersomyces stipitis* (Ss) e *Candida intermedia* (Ci), sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* espécie modelo nos estudos filogenéticos e as duas últimas espécies, *Scheffersomyces stipitis* e *Candida intermedia*, leveduras naturalmente capazes de metabolizar pentoses. Todas as espécies neste estudo também possuem genoma completo anotado e depositado no GenBank. Um valor de corte, *e-value* de 10×10^{-50} foi definido para todas as buscas. A presença de um domínio proteico típico associado ao transporte de açúcares em todas as sequências recuperadas foi confirmada utilizando a versão da base de dados Pfam 31.0 (FINN et al., 2014), e também o programa *online* TMHMM (2017) foi utilizado para confirmação da existência e posição de domínios transmembrana nas proteínas. A predição de existência de peptídeo sinal também foi verificada com auxílio da ferramenta SignalP (PETERSEN et al., 2011).

Outros bancos de dados foram utilizados para identificação das propriedades proteicas e para o auxílio da seleção das que seriam classificadas como melhores candidatas, Interpro (HUNTER et al., 2008) e UniProtKB (BOUTET et al., 2007).

Tabela 2- Proteínas pertencentes à família Sugar Porter (SP) relacionadas ao transporte de xilose em leveduras.

PROTEÍNA	ACESSO	MICROORGANISMO	AA
ScHXT1	KZV10830.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	570
ScHXT2	KZV08856.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	541
ScHXT3	KZV12584.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	567
ScHXT4	KZV10828.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	576
ScHXT5	KZV10831.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	592
ScHXT6	KZV12582.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	570
ScHXT7	KZV12581.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	570
ScSNF3	CAA98771.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	884
ScGAL2	CAA97640.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	574
ScRGT2	CAA65621.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	763
SsSUT1	AAD00266.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	553
SsSUT2	AAD02831.2	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	550
SsSUT3	AAD00269.2	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	550
SsSUT4	AEB31263.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	549
CtGXF1	CAI77652.1	<i>Candida intermedia</i>	547
CtGXS1	CAI44932.1	<i>Candida intermedia</i>	522
SsXUT1	XP_001385583.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	566
SsXUT2	XP_001387242.2	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	468
SsXUT3	XP_001387138.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	551
SsXUT4	AEB31262.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	543
SsXUT5	XP_001385962.2	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	495
SsXUT6	AEB31261.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	544
SsXUT7	AEB31260.1	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	418

Fonte: Autoria Própria

4.4 Análises das sequências e filogenia

As sequências de proteínas modelo obtidas foram alinhadas usando o software ClustalW com parâmetros padrão do sistema (SIEVERS; HIGGINS, 2014) e o alinhamento resultante foi utilizado na geração de árvores filogenéticas. Após a seleção das proteínas candidatas a partir das três espécies modelo de leveduras (*Sc*, *Ss*, *Ci*), possivelmente relacionadas ao transporte de xilose, foi feito um novo alinhamento para cada conjunto de dados a fim de avaliar a proximidade e homologia entre as proteínas candidatas encontradas e as proteínas modelo previamente selecionadas relacionadas na tabela 2. As árvores filogenéticas foram construídas empregando o método neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) e construídas a partir do programa MEGA 7.0 (KUMAR et al., 2016). A qualidade de cada árvore foi estimada usando reamostragem *bootstrap* com 1000 replicações.

4.4.1 Análise das sequências e busca pelo motivo consenso

O alinhamento da sequência de aminoácidos obtido no item 4.3 foi utilizado para busca contra a sequência de aminoácidos específica G-G/F-XXX-G, identificada por Young, et al., (2013) e prevista como diretamente relacionada a interação com a molécula de glicose e xilose, consequentemente especificidade pelo substrato. De acordo com os autores, ela estaria localizada na primeira região transmembrana (TMM1). As sequências foram novamente alinhadas com auxílio do programa MultAlin (CORPET, 1988) para melhor visualização dos resultados obtidos.

4.5 Desenho dos primers

Após as análises filogenéticas, foram escolhidas entre as proteínas identificadas as melhores candidatas para o desenho dos primers e realização via Real-time PCR dos experimentos de quantificação da expressão gênica. Para este desenho, as regiões que possuíam maior variação em toda sequência foram selecionadas nos parâmetros do programa Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2012) para desenho dos primers. A especificidade de cada primer foi avaliada usando o software PrimerBlast (YE et al., 2012). O tamanho da região amplificada foi estabelecido sob limite de 90-150pb. Primers para genes de referência *PDA1* e *ACT1* foram sintetizados de acordo com Wenzel et al. (1995) e Peng et al. (2012) respectivamente, que utilizaram e validaram esses genes como constitutivos em seus

experimentos. Testes de concentração e eficiência dos primers foram realizados e os primers utilizados se encontram listados na Tabela 1. A partir dos dados obtidos, foi definida a concentração para cada par de primers. Para tal, o teste de eficiência foi realizado com o uso de uma série de diluições de fator 2 a partir da diluição inicial 1:5 do mix de todas as amostras de cDNA. e posteriormente foi feito o cálculo do coeficiente angular (inclinação) ou slope da equação de regressão linear sendo obtido o valor para cada gene e este foi usado na equação: $E = 10^{-1}/\text{slope (1)}$, onde obteve-se a eficiência calculada para o primer.

4.6 Perfil de expressão dos genes relacionados ao transporte de xilose em resposta às condições fermentativas.

A expressão dos genes selecionados foi analisada em diferentes estágios de desenvolvimento do processo fermentativo. Para avaliar a expressão gênica em resposta a diferentes condições de cultivo, foram testadas 2 condições de composição da fonte de carbono dos meios usados para inóculo e fermentação: (1) xilose e (2) mistura na proporção 1:5 de glicose:xilose. Uma terceira condição onde foi realizada uma fermentação apenas com glicose como fonte de carbono foi determinada como controle, uma vez que não possuía xilose no meio de fermentação ou inóculo.

A definição dos tempos de retirada de amostra para avaliação da expressão foi realizada com base nos dados de cinética de absorção de glicose e xilose, crescimento celular e produção de xilitol obtidos do processo fermentativo.

4.6.1 Meio e condições de fermentação

Para o preparo do inóculo, a levedura foi obtida da cultura armazenada em ágar extrato de malte a 4°C, foi cultivada em meio composto dos açúcares glicose e/ou xilose na concentração de 30 gL⁻¹. Estes meios preparados para inóculo foram suplementados com nutrientes já empregados usualmente nas formulações dos meios constituídos de hidrolisados hemicelulósicos (HERNANDEZ-PERÉZ, 2015): sulfato de amônio (2,0 g L⁻¹), cloreto de cálcio dihidratado (0,1 g L⁻¹) e solução de extrato de farelo de arroz (20,0 g L⁻¹). O cultivo ocorreu em pH 5,5 (inicial), em frascos Erlenmeyer (125mL) contendo 50 mL de meio semi-definido, com agitação de 200 rpm, a 30°C por 24 horas. A concentração inicial de células nas fermentações foi definida como 1,0 gL⁻¹ (FELIPE et al., 1997).

Para as fermentações foram empregados os mesmos meios nas mesmas condições de preparo do inóculo, porém as concentrações dos açúcares (glicose e xilose) foram alteradas para 50 g.L⁻¹ de glicose na fermentação 1, 50 g.L⁻¹ de xilose na fermentação 2 e 10:50 g.L⁻¹ glicose:xilose na fermentação 3. A proporção determinada para a fermentação 3 (1:5) foi baseada na composição semelhante à encontrada no hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana-de-açúcar e reportada por Hernández-Peréz, (2017). Além disso, a proporção de glicose:xilose (1:5) por Silva et al. (2007) foi encontrada como adequada para produção de xilitol em frascos Erlenmeyer. O período total de fermentação foi de 72 horas.

Amostras foram retiradas periodicamente para determinação da viabilidade celular, pH, consumo de glicose e xilose, bem como produção de xilitol, glicerol, etanol e ácido acético em diferentes intervalos de tempo até 72h.

4.6.2 Parâmetros Cinéticos

Os dados referentes à cinética fermentativa foram calculados a partir dos parâmetros (Consumo de substrato, formação de produto e crescimento celular) de acordo com as seguintes fórmulas:

- **Fator de conversão de D-xilose em Xilitol ($Y_{P/S}$)**

O fator de conversão ou fator de rendimento é aquele que expressa a massa de xilitol produzida pela massa de xilose consumida, em gramas. Foi calculada pela equação (2):

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (2)$$

Onde:

S_i e S_f correspondem, às concentrações inicial e final de de Xilose (g L⁻¹)

P_i e P_f correspondem, às concentrações inicial e final de Xilitol (g L⁻¹)

- **Produtividade Volumétrica de Xilitol (Q_p)**

A produtividade volumétrica de xilitol expressa a concentração de xilitol produzido (g L⁻¹) por tempo (h). Foi calculada de acordo com a equação (3):

$$Q_p = \frac{\Delta P}{\Delta T} = \frac{P_f - P_i}{T_f - T_i} \quad (3)$$

Onde:

P_i e P_f correspondem, às concentrações inicial e final de Xilitol (g L^{-1})

T_i e T_f correspondem aos tempos inicial e final de fermentação (h)

- **Eficiência de Conversão**

Este parâmetro é expresso em porcentagem e representa a razão entre o fator de conversão de xilose e xilitol ($Y_{P/S}$) calculado experimentalmente e o fator de conversão teórico de $0,917 \text{ g}_{\text{xilitol}} \text{ g}_{\text{xilose}}^{-1}$.

- **Velocidades Instantâneas e Específicas**

Para o estudo cinético do processo fermentativo, as velocidades instantâneas de crescimento celular (dx/dt), consumo de substrato ($-ds/dt$) e formação de xilitol (dp/dt), foram calculadas pelo método proposto por Duy e Zajic (1973). Ao se dividir estas velocidades instantâneas pela concentração de células nos pontos em que se calcularam as derivadas, obtêm-se as velocidades específicas de crescimento (μ_X), de consumo de D-xilose (μ_S) e de produção de xilitol (μ_P).

4.6.3 Extração de RNA, síntese do cDNA e análise dos dados de Real-Time PCR

A extração de RNA total foi realizada de cada amostra em triplicata, o material biológico proveniente de cada fermentação foi centrifugado para coleta das células e utilizando N_2 líquido foi macerado em graal de maceração e armazenado em -80°C para posterior isolamento do RNA utilizando o kit Illustra RNAspin Mini Kit (GE Healthcare). O RNA total foi extraído de acordo com as especificações do fabricante e tratados posteriormente com a DNase do próprio kit após a eluição de acordo com as recomendações. Sua quantidade foi calculada por espectrofotometria (BioDrop μLITE ISOGEN LifeScience) a 260nm , enquanto a qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose $1,0\%$ (m/v). Em seguida, cerca de $1\mu\text{g}$ de RNA total isolado foi tratado com RQ1 RNase-Free DNase (Promega) no papel de segunda enzima DNase com função de garantir a ausência de contaminantes de DNA genômico nas amostras antes da síntese do cDNA. A síntese de cDNA foi realizada usando $5\mu\text{L}$ de RNA total e utilizando o kit SuperScript® III (Life

Technologies™) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de PCR em Tempo Real foram em placas de 96 poços através do kit SYBR Select Master Mix (Life Technologies™), no equipamento de PCR em tempo real (RT-qPCR) 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies™). As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: 10 minutos a 95 ° C; 40 ciclos de 15s a 94°C e 1 min a 60°C. Após o passo de amplificação, uma curva de melting foi realizada para cada conjunto de primers.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas biológicas e técnicas. Os níveis de expressão relativa foram acessados através do método $-\Delta C_t$ (HELLEMANS et al., 2007). Os resultados foram normalizados com os genes de referência *ACT1* e *PDA1*. Testes de ANOVA foram realizados para as respostas e expressão obtidas para os genes analisados, e o teste estatístico de Bonferroni aplicado para análise de intervalo de significância com 95% de confiança entre as expressões obtidas.

4.7 Métodos Analíticos

4.7.1 Análises das concentrações de açúcares

A determinação da concentração dos açúcares glicose, xilose, bem como dos subprodutos xilitol, glicerol e ainda de etanol, é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (ARRUDA, 2011). As amostras foram filtradas em membrana PVDF 0,22 μ m (DURAPORE MERCK) através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com coluna Bio Rad (Hércules, CA) Aminex HPX- 87H, com H₂SO₄ 0,01N como eluente, a 45°C, a um fluxo de 0,06 mLmin⁻¹ em cromatógrafo Agilent 1200 (Kyoto, Japão).

4.7.2 Quantificação de concentração celular, determinação da viabilidade celular e pureza da cultura

A determinação da concentração celular, foi feita por espectrofotometria a 600 nm, mediante a relação da absorbância com a concentração em massa seca de células a partir de curva de calibração previamente estabelecida, a partir do cultivo das células em meio semidefinido.

A viabilidade celular foi determinada com lâmina a fresco com azul de metileno (0,01%) e visualizadas por microscopia óptica em microscópio LABOMED, Labo America,

Inc. EUA, e as células são ainda observadas a partir de lâminas fixadas e coradas com fucsina. Com o auxílio de um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) foi verificado a pureza das culturas de *C. tropicalis*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Confirmação de espécie da levedura *Candida guilliermondii* FTI20037

Inicialmente, a partir do desenho dos primers e a sequência intergênica (ITS) obtida a partir do resultado do sequenciamento, os resultados demonstraram que a sequência apresentou 100% de similaridade/identidade com as sequências de *C. tropicalis* existentes na base de dados do NCBI. O sequenciamento da região codificante da enzima Xilose Redutase (XR) também revelou 100% de identidade com a sequência de *C. tropicalis*. O valor de identidade calculado pelo programa *Geneious* para cada uma das sequências obtidas em relação a espécie de levedura correspondente se encontra na Tabela 3. Este valor se refere a porcentagem de bases/resíduos idênticos na comparação múltipla de sequências.

Tabela 3- Identidade das sequências obtidas após o sequenciamento da região do ITS da levedura *Candida guilliermondii* FTI20037. Em destaque maiores matches obtidos.

Sequência	Espécie	%Identidade
ITS1	<i>C. tropicalis</i>	100%
ITS1	<i>C. guilliermondii</i>	80,9%
XR (Fw)	<i>C. tropicalis</i>	100%
XR (Rv)	<i>C. tropicalis</i>	100%
XR (Fw)	<i>C. guilliermondii</i>	71,7%
XR (Rv)	<i>C. guilliermondii</i>	62,1%

Fonte: Autoria Própria

Assim, os resultados permitem a confirmação de a que a verdadeira espécie a qual a linhagem até então classificada como *Candida guilliermondii* FTI20037 é na verdade *Candida tropicalis*. Além disso, como observado na Figura 7 (A e B), a amplificação dos primers específicos para *Candida tropicalis* (CTR1 e 2) corrobora com os dados encontrados de sequenciamento, assim como os resultados encontrados pelos autores Lima, De Almeida Felipe e Gonçalves Torres (2003). O alinhamento das sequências que conferiu os resultados obtidos na tabela 3 pode ser encontrado no Anexo A (Figuras 20 a 27). Logo, para a realização dos experimentos seguintes, foi estabelecido que a espécie de levedura deste trabalho se tratava de uma linhagem de *Candida tropicalis*.

Figura 7- Gel de agarose 1% m/v das reações de PCR realizadas a partir da extração de DNA genômico de *C. guilliermondii* FTI20037 para confirmação da espécie. (A) Linha 1: Marcador 1 kb ladder; linhas 3 a 5 fragmento de PCR correspondente à região do ITS; linhas 6 a 8 fragmento de PCR utilizando os primers CTR1 e 2 específicos para *C. tropicalis*. (B) Linha 1: Marcador 1 kb ladder; linha 2: fragmento de PCR da região do ITS e linha 3: amplificação utilizando os primers XR(F) e XR(R).

Fonte: Autoria própria

5.2 Seleção de genes relacionados ao transporte de xilose possivelmente presentes na espécie de levedura *Candida tropicalis*

Trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo já evidenciaram que a espécie *C. guilliermondii* FTI 20037, devidamente reclassificada como *C. tropicalis* neste trabalho como uma levedura com alta capacidade de metabolizar xilose como fonte de carbono (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016; ARRUDA et al., 2017). Este fato incentivou o desenvolvimento desta pesquisa a fim de conhecer mais a fundo sobre a existência de proteínas transportadoras para a molécula de xilose através da membrana plasmática, estas que estariam envolvidas com a captação deste nutriente nas situações onde ela fosse consumida com maior necessidade pela célula.

As sequências de aminoácidos de ScHXT1-7; ScRGT2; ScSNF3; ScGAL2; SsSUT1-4; SsXUT1-7; CiGXS1 e CiGXF1 (tabela 2) foram utilizadas como referência para obtenção de outros membros da família de transportadores de açúcares (SP) em *C. tropicalis* MYA-3404, linhagem que possui o genoma completo sequenciado e depositado no GenBank para ser utilizada como molde nos experimentos *in silico*. As sequências proteicas foram selecionadas de acordo com o valor de corte *e-value* estabelecido acima de 10^{-50} . Um total de 16 sequências foram obtidas e após análises individuais quanto à presença do domínio proteico relacionado ao transporte de açúcares utilizando o banco de dados PFAM, as candidatas que não possuíam o domínio completo foram descartadas do presente estudo (Tabela 4). As predições fornecidas pelo programa TMHMM demonstraram a presença de regiões transmembrana em todas as proteínas candidatas. Em nenhuma delas foi encontrada a probabilidade de peptídeo sinal de acordo com o programa SignalP.

Através observação e identificação da similaridade entre as sequências candidatas e modelos, foi possível sua identificação de acordo com sua homologia e então foram devidamente nomeadas como Glucose-Xylose Transporter (GXT) devido à similaridade de sequências e resultados apresentados pela filogenia. As proteínas que se agruparam com as proteínas XUT (Xylose transporter) identificadas em *S. stipitis* foram também identificadas de acordo com a construção da filogenia.

As proteínas que foram excluídas da construção da filogenia, por possuírem incompleto ou não possuírem o domínio característico de proteínas transportadoras de açúcar foram eliminadas durante esta etapa do trabalho, e foram marcadas na tabela 4 em vermelho.

Tabela 4- Proteínas transportadoras identificadas em *Candida tropicalis* MYA-3404. Proteínas que possuíam o domínio incompleto foram marcadas em vermelho.

NÚMERO	ACESSO	ID	NOME
1	XP_002546859.1	high-affinity hexose transporter HXT6	GXT1*
2	XP_002547341.1	hexose transporter 2	GXT2*
3	XP_002546860.1	high-affinity hexose transporter HXT6	GXT3*
4	XP_002547817.1	hypothetical protein CTRG_06249	GXT4*
5	XP_002550629.1	hypothetical protein CTRG_04927	GXT5*
6	XP_002548041.1	hypothetical protein CTRG_02338	GXT6*
7	XP_002551118.1	sugar transporter STL1	XUT6*
8	XP_002550317.1	high-affinity glucose transporter	XUT8*
9	XP_002545773.1	conserved hypothetical protein	XUT1*
10	XP_002548763.1	hypothetical protein CTRG_03060	XUT9*
11	XP_002547818.1	hypothetical protein CTRG_06250	nd
12	XP_002545933.1	hypothetical protein CTRG_00714	XUT4*
13	XP_002548209.1	conserved hypothetical protein	nd
14	XP_002548217.1	conserved hypothetical protein	nd
15	XP_002551364.1	conserved hypothetical protein	nd
16	XP_002548355.1	hypothetical protein CTRG_02652	XUT10*

*Proteínas classificadas neste trabalho; nd= não definido

Fonte: Autoria própria.

Analisando os agrupamentos gerados a partir da árvore filogenética (figura 8A) é possível inferir que as proteínas HXT 6 e 7, classificadas como transportadores de alta afinidade por glicose, foram agrupadas no mesmo *cluster* e próximas, considerando que a sequência é altamente similar (REIFENBERGER et al., 1997). Ainda, HXT 1 e 3, classificadas como proteínas transportadoras de baixa afinidade por glicose, também foram agrupadas. As proteínas sensoras de altos e baixos níveis de glicose, RGT2 e SNF3 respectivamente, também foram agrupadas no mesmo *cluster*. A proteína GXS1 (glucose/xylose symporter 1) de *C. intermedia* também foi agrupada junto às proteínas

sensoras citadas. É possível observar que o agrupamento proteico nesta chave foi em relação à função e não apenas em relação ao organismo de origem. Também, é possível notar um forte agrupamento entre as proteínas SUT1-4, as quais possuem alta similaridade de sequências além de pertencerem à mesma espécie de levedura. Ainda baseado na comparação de sequências de aminoácidos, é possível notar que as proteínas reportadas como transportadoras de xilose (XUT1-7) foram separadas das demais proteínas transportadoras (figura 8B).

Figura 8- (A) e (B) Árvore filogenética construída com os transportadores de *S. stipitis*, *S. cerevisiae* e *C. intermedia*, depositados no banco de dados NCBI. As sequências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (EMBL-EBI); Árvore foi construída utilizando o programa MEGA7.0 com reamostragem de 1000 replicações de bootstrap.

Fonte: Autoria Própria

A construção da árvore filogenética das proteínas homólogas identificadas em *C. tropicalis* pode ser observada na Figura 9 A e B. Com o objetivo de detectar o agrupamento das proteínas candidatas em relação às proteínas modelo para então classificá-las em função da similaridade da sequência de aminoácidos.

Figura 9- (A) e (B) Árvore filogenética construída com os transportadores de *C. tropicalis*, identificados no banco de dados NCBI. As sequências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW (EMBL-EBI); Árvore foi construída utilizando o programa MEGA7.0 com reamostragem de 1000 replicações de bootstrap.

Fonte: Autoria Própria

Assim, com base nos resultados obtidos, as proteínas candidatas como responsáveis pelo transporte de xilose em *C. tropicalis* inseridas na filogenia CtGXT1-6 e CtXUT1,4,6,8,9 e 10 foram agrupadas de acordo com a maior similaridade da sequência de aminoácidos. Runquist, Hanh-Hagerdal e Radstrom (2010) obtiveram resultados promissores na clonagem e expressão do gene de *C. intermedia GXF1* em *S. cerevisiae*. Em seus experimentos ele constatou que o efeito do transportador foi claramente dependente da concentração de substrato, melhores taxas de crescimento e de absorção de substrato. A expressão do transportador SUT1 de *S. stipitis* (KATAHIRA et al., 2008) também mostrou melhorar a utilização de xilose por *S. cerevisiae* recombinante. Estes fatos, aliados à filogenia gerada indicaram CtGXT2 como um alvo potencial para os ensaios de avaliação da expressão gênica durante as diferentes condições de fermentações estabelecidas no atual projeto.

Young et al. (2011) reportaram pela primeira vez a caracterização molecular dos genes XUT anotados para *S. stipitis* e o destaque foi para *XUT1* e *XUT3*, cujos resultados obtidos demonstraram moderada eficiência de transporte e maiores preferências pela molécula de xilose dentre todos os genes testados na pesquisa. Os resultados obtidos após a filogenia das proteínas de *C. tropicalis* gerou entre elas uma muito próxima de SsXUT1, que foi classificada como CtXUT1 e, portanto, também um alvo potencial, assim como CtGXT2, para posterior avaliação da expressão gênica.

5.3.1 Análise das sequências e busca pelo motivo consenso

A determinação da presença do motivo proteico G-G/F-XXX-G, identificado por Young et al. (2013), o qual estaria envolvido com a afinidade do transportador pelo substrato específico, foi realizada através do alinhamento realizado pelo programa MultAlin, e as sessões correspondentes às regiões transmembrana identificadas pelo programa TMHMM foram marcadas nas respectivas figuras.

A presença do motivo proteico “GG-XXX-G” foi detectada em todas as sequências de proteínas transportadoras pertencente ao das proteínas obtidas inicialmente do banco de dados NCBI pertencentes à família SP e incluídas na árvore filogenética gerada na figura 8. A localização deste motivo foi encontrada justamente posicionada na primeira região transmembrana marcada na Figura 10 (YOUNG et al., 2013).

Já para as sequências proteicas também obtidas inicialmente do banco de dados NCBI pertencentes à família SP referente às proteínas XUT de *S. stipitis*, apenas nas sequências SsXUT1 e SsXUT3 estes domínios foram detectados, como pode ser visto no

box marcado na Figura 11. Ainda assim, a presença do motivo G-F-XXX-G foi detectada em SsXUT6. De acordo com Young et al. (2013) a alteração do segundo resíduo da sequência (G por F) realizada pelos mesmos autores nas sequências referentes ao transportador HXT7, após ensaios de mutação sítio dirigida, acarretou no aumento das taxas de transporte de xilose ($V_{m\acute{a}x}$).

O alinhamento entre as sequências das proteínas candidatas foi realizado entre as proteínas classificadas como possíveis transportadoras, de acordo com o agrupamento filogenético. Dessa forma, foram alinhadas as proteínas GXT1-6 e como pode-se observar a partir da Figura 12, o motivo GG-XXX-G foi também encontrado em todas elas, justamente localizado na primeira região transmembrana das respectivas proteínas.

A presença do motivo proteico nas proteínas homólogas XUT de *C. tropicalis* foi observado apenas em CtXUT1 e CtXUT6 (Figura 13). Este resultado indicou que estas estariam entre as melhores proteínas transportadoras de xilose presentes em *C. tropicalis* entre as identificadas neste trabalho, e apontadas como boas candidatas ao mecanismo de transporte via simporte/ H^+ de acordo com as proteínas homólogas já caracterizadas de *S. stipitis*: XUT1 e XUT6

Logo, após todos os experimentos, a escolha das proteínas cuja expressão seria analisada via qPCR foi definida como *CtGXT2* e *CtXUT1*, cujos alinhamentos foram indicados nas figuras 12 e 13, e destacadas nas árvores filogenéticas da figura 9 (A e B).

Figura 10- Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos das proteínas transportadoras HXT1-7, GAL2 de *S. cerevisiae*, GXF1 e GXS1 de *C. intermedia* e SUT1-4 de *S. stipitis*. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin. As posições putativas do primeiro segmento transmembrana (TMN1) em destaque, assim como a sequência consenso GG-XXX-G relacionado ao transporte de monossacarídeos no box.

Fonte: Autoria Própria

Figura 11 – Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos das proteínas transportadoras XUT1-7 de *S. stipitis*. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin. As posições putativas do primeiro segmento transmembrana (TMN1) em destaque, assim como a sequência consenso GG-XXX-G relacionado ao transporte de monossacarídeos no box.

Fonte: Autoria Própria

Figura 12 – Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos das proteínas transportadoras GXT1-6 de *C. tropicalis*. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin. As posições putativas do primeiro segmento transmembrana (TMN1) em destaque, assim como a sequência consenso GG-XXX-G relacionado ao transporte de monossacarídeos no box.

Fonte: Autoria Própria

Figura 13- Alinhamento múltiplo entre as sequências de aminoácidos das proteínas transportadoras XUT1,4,6,8,9,10 de *C. tropicalis*. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin. As posições putativas do primeiro segmento transmembrana (TMN1) em destaque, assim como a sequência consenso GG-XXX-G relacionado ao transporte de monossacarídeos no box.

Fonte: Autoria Própria

5.4 Cultivo de *Candida tropicalis* em meio semi-definido

O comportamento fermentativo de *C. tropicalis* em meio semi-definido com glicose e/ou xilose como fontes de carbono em condição de microaerobiose foi estudado. Os resultados obtidos nesta etapa foram úteis para definição dos tempos de coleta de amostra (material biológico) da levedura para posterior realização das análises de expressão dos genes *XUT1* e *GXT2*. Assim, foi possível avaliar comparativamente a expressão dos genes selecionados com os resultados de consumo de substrato, formação de produto e crescimento celular de *C. tropicalis* nas condições experimentais.

5.4.1 Desempenho fermentativo de *Candida tropicalis* em meio semi-definido contendo Glicose como fonte de carbono

Os perfis de consumo de glicose, produção de etanol, bem como variação de pH e crescimento celular de *C. tropicalis* em meio contendo glicose como fonte de carbono são apresentados na Figura 14.

Figura 14- Consumo de glicose (■), produção de etanol (●), crescimento celular (●) e variação de pH (●) durante fermentação com *C. tropicalis* realizada em meio semi-definido contendo glicose como fonte de carbono.

Fonte: Autoria Própria

Constata-se na Figura 14 o rápido consumo inicial da glicose, correspondendo a 76,8% do consumo total até 12h de fermentação. Ainda se nota nesta figura que durante as 3 primeiras horas de fermentação a concentração de glicose permaneceu constante. Assumindo que não houve consumo neste período, é possível considerar ocorrência de adaptação celular, inferência suportada pelo fato que não foi verificado crescimento celular neste mesmo intervalo. Após este período, no intervalo de 3 à 12h de fermentação a levedura apresentou atividade máxima, atingindo velocidades específicas

de consumo de glicose de $3,57 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, de crescimento celular de $0,5488 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ e de formação de produto de $1,05 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, neste caso, etanol.

No intervalo de 3 a 12 h de fermentação, foi verificado também a queda brusca nos valores de pH ($\Delta\text{pH}_{3-12\text{h}} = 3,56$), conforme pode ser observado na Figura 14. Este resultado está relacionado com o não tamponamento do meio. Destaca-se que a queda de pH de 5,5 para pH de 1,94 no tempo 12h aconteceu no período onde o consumo de glicose foi o mais elevado. A análise de viabilidade celular mediante a visualização microscópica de lâminas coradas com azul de metileno revelou que após 12h uma grande parte das leveduras se encontrava não viável, proporção que foi aumentando ao longo da fermentação. Coerente com este resultado, o crescimento celular foi consideravelmente reduzido a partir de 12h até o final da fermentação, sendo que a biomassa celular formada neste período ($1,9 \text{ gL}^{-1}$) foi 2,6 vezes menor que a formada entre 3 e 12h ($4,88 \text{ gL}^{-1}$). Logo, a alteração do valor de pH após 12h demonstrou ser extremamente estressante para a levedura.

5.4.2 Desempenho fermentativo de *Candida tropicalis* em meio semi-definido contendo Xilose como fonte de carbono

Os perfis de consumo de xilose, produção de xilitol, bem como variação de pH e crescimento celular de *C. tropicalis* em meio contendo xilose como fonte de carbono são apresentados na Figura 15.

Figura 15- Consumo de xilose ($\blacktriangle$), produção de xilitol ($\star$), crescimento celular ($\bullet$) e variação de pH ($\bullet$) durante fermentação com *C. tropicalis* realizada em meio semi-definido contendo Xilose como fonte de carbono.

Constata-se na Figura 15 que a maior produção de xilitol ocorreu durante o intervalo 21-36h, correspondente a uma velocidade volumétrica de produção igual a $0,844 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ e velocidade específica de produção de $1,14 \text{ h}^{-1}$. Este resultado é coerente com o perfil de consumo de xilose. Ressalta-se que neste intervalo o fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{p/s}$) de $0,843 \text{ gg}^{-1}$, correspondente a uma eficiência de 91,9% de conversão. Ao se considerar o tempo total de fermentação (0 a 72h), foi obtido um $Y_{p/s}$ de $0,678 \text{ gg}^{-1}$, correspondente a uma eficiência de 73,9%, e produtividade volumétrica (Q_p) de $0,4 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Entretanto, já em 60h de cultivo se observa o consumo total de xilose e que correspondeu a $Y_{p/s}$ de $0,66 \text{ gg}^{-1}$ e (Q_p) de $0,47 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Arruda e Felipe (2008) alcançaram em fermentação com *C. guilliermondii* FTI20037 utilizando meio semi-definido constituído de xilose valores de $Y_{p/s}$ de $0,74 \text{ gg}^{-1}$ e (Q_p) de $0,84 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ em 72h de fermentação. A produção volumétrica de xilitol obtida pelos autores foi 2,1x maior considerando que as condições de fermentação foram semelhantes, no entanto é importante ressaltar a variação da quantidade inicial de xilose, que foi de 13 gL^{-1} a mais no experimento realizado pelos autores.

Por outro lado, quanto ao crescimento celular, nota-se que a maior formação de biomassa celular ocorreu entre 0-9h ($2,271 \text{ gL}^{-1}$), equivalente a uma velocidade volumétrica de crescimento igual a $0,26 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Destaca-se que no intervalo entre 21-36h, no qual se observou a maior atividade de consumo de xilose e produção de xilitol, o crescimento celular foi mínimo ($0,739 \text{ gL}^{-1}$), correspondente a uma velocidade volumétrica de crescimento de apenas $0,047 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, e ao se considerar todo o período de fermentação (0-72h), o crescimento celular foi de $6,19 \text{ gL}^{-1}$. Ainda, comparando com os dados de crescimento celular de *C. guilliermondii* FTI20037 obtidos por Arruda e Felipe (2008), em fermentação utilizando meio semi-definido constituído de xilose foi alcançado pela levedura em 72h de fermentação $4,55 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa de células. Logo, pode-se avaliar que houve o favorecimento do crescimento celular em detrimento da formação de xilitol a partir dos carbonos provenientes da xilose consumida.

Com relação ao consumo de xilose, Mussatto, Silva e Roberto (2006), em fermentações de *C. guilliermondii* FTI20037 em meio semi-definido com xilose como fonte de carbono, a xilose também foi totalmente consumida antes de 72h de fermentação, afirmando a capacidade da levedura em metabolizar este substrato.

5.4.3 Desempenho fermentativo de *Candida tropicalis* em meio semi-definido contendo Glicose e Xilose como fontes de carbono na proporção 1:5.

Os perfis de consumo de xilose, glicose, produção de xilitol, etanol, bem como variação de pH e crescimento celular de *C. tropicalis* em meio contendo xilose como fontes de carbono são apresentados na Figura 16.

Figura 16- Consumo de xilose (▲), glicose (▼), produção de xilitol (★), etanol (◆), crescimento celular (●) e variação de pH (●) durante fermentação com *C. tropicalis* realizada em meio semi-definido contendo Glicose e Xilose como fonte de carbono.

Fonte: Autoria Própria

Verifica-se na Figura 16 que no intervalo de 0 a 6 h houve um rápido consumo de glicose, quantificado em $8,25\text{gL}^{-1}$ e correspondente a 87,10% da glicose disponível. Neste mesmo período (0 a 6h) foi observado o máximo valor de crescimento celular ($2,53\text{gL}^{-1}$). Este padrão de rápido consumo inicial de glicose e crescimento celular já foi reportado por outros autores em estudos de produção de xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos por *C. guilliermondii* FTI 20037 considerando na composição deste meio a existência de xilose (majoritária) e também a glicose (SILVA; FELIPE, 2006; HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016; ARRUDA et al., 2017). Neste mesmo intervalo (0-6h), a xilose consumida foi correspondente à $4,9\text{gL}^{-1}$, valor equivalente à 11,06% do consumo total de xilose durante

toda fermentação. Assim como nos experimentos anteriores, o pH caiu rapidamente, o qual pode estar relacionado com o rápido consumo glicose. Poderia ser considerado que a rápida queda do pH associado à intensa atividade na fase inicial da fermentação a presença da glicose. A presença da molécula de glicose na composição do meio mudou o comportamento da levedura quando comparado com o experimento 2, no qual glicose não foi empregada.

Já ao se avaliar o intervalo de 21-36h foi possível notar que ocorreu um intenso consumo de xilose, e foi correspondente ao intervalo de máxima velocidade volumétrica de consumo igual a $0,82 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ sendo consumidos $11,90 \text{ gL}^{-1}$ desta fonte de carbono ou seja, 26,86% do total de xilose consumido durante toda a fermentação. Comparado ao experimento anterior, no qual a fonte de carbono foi xilose, a máxima velocidade volumétrica de consumo obtida foi inferior quando comparado entre 21 e 36h, ambos correspondentes ao intervalo de máxima velocidade volumétrica de consumo, no entanto, ao se comparar as velocidades específicas de consumo, na fermentação contendo glicose e xilose como fontes de carbono, esta foi calculada em $7,22 \text{ h}^{-1}$ enquanto na fermentação com apenas xilose, a velocidade específica de consumo foi de $1,38 \text{ h}^{-1}$. Também outro ponto importante foi o fato de que, diferente do experimento anterior, não houve esgotamento da xilose presente no meio de fermentação, equivalendo a um consumo em 72h de fermentação de 88,9%.

Com relação a produção de xilitol, no período entre 21-36h foi atingido um Yp/s de $0,54 \text{ gg}^{-1}$, correspondente a uma eficiência de conversão de 59% (Figura 16). Essa menor eficiência comparada ao Yp/s calculado para o mesmo intervalo no experimento anterior (apenas xilose), pode ser entendida como a necessidade de redirecionamento da via metabólica para que a célula pudesse se adaptar às condições na qual ela estava exposta. Considerando todo o período de fermentação (0-72h) o Yp/s foi de $0,62 \text{ gg}^{-1}$ correspondente a um Qp de $0,38 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Durante o intervalo de 21 a 36h de fermentação, o crescimento celular foi de $0,114 \text{ gL}^{-1}$ correspondente a uma velocidade volumétrica de crescimento de $0,0073 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Figura 16). Considerando o pequeno valor encontrado, comparado ao elevado consumo de xilose no mesmo intervalo, esta fonte de carbono foi direcionada e também que nem toda a xilose consumida foi direcionada para a formação de xilitol (Yp/s de $0,54 \text{ gg}^{-1}$) esta pode ter sido direcionada para alguma outra via metabólica não identificada.

Mussato, Silva e Roberto (2006), na realização de experimentos com *C. guilliermondii* FTI20037 e investigação da bioconversão de xilose a xilitol utilizando meio semi-definido concluíram que a presença de glicose reduziu em 30% o consumo da molécula

de xilose. Este efeito da presença de glicose pode ser percebido ao se comparar o perfil de consumo de xilose durante as fermentações realizadas no presente trabalho, uma vez que houve o esgotamento da pentose durante a fermentação anterior, a qual era constituída de xilose como principal fonte de carbono.

5.5 Análises de expressão dos genes *XUT1* e *GXT2* de *C. tropicalis* em resposta à fonte de carbono disponível e tempo de fermentação

Com o objetivo de aumentar os conhecimentos acerca das proteínas responsáveis pela captação da molécula de xilose do meio extracelular, utilizando a levedura *C. tropicalis* como microrganismo fermentador de pentoses e a possível associação destas proteínas com o transporte específico da molécula de xilose através da membrana, foi buscada através da seleção dos genes *CtGXT2* e *CtXUT1* e posterior avaliação a partir do perfil de expressão via qPCR em diferentes condições de fermentação. As curvas de *Melting* se encontram no Anexo B (Figura 28).

Os genes *CtGXT2* e *CtXUT1* foram identificados durante a primeira etapa deste trabalho, baseada em experimentos *in silico* como relacionados ao transporte de monossacarídeos através da membrana. Esta identificação foi suportada após a confirmação da presença de características como o domínio *sugar porter*, identificado pelo PFAM, além de regiões transmembrana características deste grupo de proteínas preditas pelo TMHMM e também a identificação da existência do motivo “GG-XXX-G” na primeira região transmembrana, o qual seria um forte indício de sua possível associação ao transporte de monossacarídeos (YOUNG et al., 2013). A decisão entre quais genes avaliar o estudo via qPCR foi sustentada após a construção das árvores filogenéticas (Figura 9), pode ser notado que as proteínas escolhidas *CtGXT2* e *CtXUT1* se agruparam em clusters distintos A e B da figura 9 respectivamente.

De acordo com a Figura 9A, é possível perceber que o gene *CtGXT2* possui alta homologia com os genes da família *SUT* de *S. stipitis* e com os genes *GXF1* (glucose/xylose facilitator 1) e *GXS1* (glucose/xylose symporter 1) de *C. intermedia*. As proteínas SUT1-3 reportadas por Weierstall et al. (1999) são caracterizadas pela capacidade de transportar xilose e outros monossacarídeos além de glicose, mas com uma afinidade consideravelmente menor pela pentose em relação a molécula de glicose.

Já Leandro, Gonçalves e Spencer-Martins (2006) realizaram o isolamento de ambos os genes de *C. intermedia* (*GXF1* e *GXS1*) e viram que sua expressão ocorria em condições

de baixas concentrações de xilose como fonte de carbono. Assim, a partir de análises de cinética foi inferido que estas seriam proteínas transportadoras de alta afinidade pelo substrato, e relacionadas ao mecanismo de transporte ativo, simporte com prótons H^+ .

Já XUT1 de *S. stipitis* demonstrou a maior preferência por xilose sobre glicose entre todas as proteínas incluídas em um estudo desenvolvido por Young et al. (2011) envolvendo avaliação de 26 proteínas de transporte de monossacarídeos a partir da expressão em uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae*. Logo, a alta similaridade encontrada para *CtXUT1* em relação a *SsXUT1* impulsionou a sua seleção para os ensaios posteriores.

Sendo assim, estes genes (*CtGXT2* e *CtXUT1*) foram selecionados como candidatos para o estudo e avaliação do perfil de expressão do mRNA e sua identificação como potenciais transportadores da molécula de xilose através da membrana com base nos dados de consumo de substrato, crescimento celular e formação de xilitol, após os experimentos de fermentação. Os tempos de coleta de amostra foram definidos em 0, 4, 22 e 30 horas após o início da fermentação, com o objetivo de estabelecer uma correlação do tempo com a expressão gênica (Figura 17).

Figura 17- Esquema simplificado dos tempos determinados para a coleta de amostras e extração de RNA total em cada condição de fermentação de acordo com a cinética fermentativa.

*Os meios de cultivo do inóculo e fermentação foram suplementados de acordo com o com metodologia encontrada no item 4.5.1.

Fonte: Autoria Própria

O padrão de expressão dos genes *CtGXT2* e *CtXUT1* foi analisado nas duas diferentes condições de fermentação por *C. tropicalis* conforme descritas no item 4.6 da metodologia (apenas xilose, ou a mistura glicose:xilose na proporção de 1:5, assim como nos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço e palha de cana de açúcar) (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016). O tempo amostrado do experimento fermentativo contendo glicose como fonte de carbono

foi correspondente ao momento em que foram concluídas as 24h de inóculo, antes de serem transferidas para o meio de cultivo. A concentração de glicose durante este tempo se encontrava em $6,41\text{gL}^{-1}$. Já os tempos 0h dos cultivos com xilose e com xilose e glicose como fonte de carbono foram coletados assim que as células foram transferidas para o novo meio de cultivo preparado de acordo com cada metodologia proposta.

A expressão genica de *CtGXT2* e *CtXUT1* foi calculada através dos dados de $-\Delta\text{Ct}$ obtidos da curva de expressão relativa. Durante a fermentação em que a fonte de carbono adicionada foi xilose (Figura 18) foi observada a expressão de ambos os genes *CtGXT2* e *CtXUT1* em todos os tempos analisados.

O padrão de expressão de *CtGXT2* ao decorrer do processo fermentativo demonstrou ser aparentemente constante, diferenciando significativamente das demais apenas no tempo de 4h. Em relação a condição do experimento controle (apenas glicose no meio de fermentação- barra hachurada) a diferença de expressão foi significativa quando comparada aos tempos 0 e 4 horas do experimento com xilose no meio fermentativo. Considerando que não havia glicose durante o desenvolvimento da fermentação com xilose, em discussão, podemos inferir que este gene pode estar relacionado tanto ao transporte de glicose quanto de xilose, uma vez que foi expresso na ausência e presença da fonte de carbono glicose.

Ao se analisar a expressão gênica de *CtXUT1* ainda na fermentação com xilose como fonte de carbono, podemos perceber que esse gene também foi expresso em todos os tempos, entretanto, ao contrário do *CtGXT2*, não foi expresso na condição controle constituída de apenas glicose como fonte de carbono (barra hachurada). Esta resposta refletiu uma primeira evidência de que este gene possivelmente codifique uma proteína transportadora específica para a molécula de xilose, identificada em *C. tropicalis*. Com o decorrer do processo fermentativo, a expressão de *CtXUT1* aumentou significativamente dado que corrobora com as análises inferidas a respeito da especificidade e a realização de análises de correlação estatística com o consumo de xilose, foram significativas avaliando um intervalo de 95% de confiança. Vale ressaltar que os dados de velocidade volumétrica de consumo de xilose calculados no item 5.4.3 apontaram o valor máximo durante o intervalo de 21 a 36h em relação a todo o processo fermentativo, assim como o aumento da expressão gênica.

Assim como encontrado pelos autores Gárdonyi et al. (2003b) a especificidade de transportadores de xilose específicos pela respectiva molécula aumenta com a diminuição da concentração desta no meio extracelular, para que sejam supridas as necessidades do microrganismo.

Figura 18- Perfil de expressão dos genes *CtGXT2* e *CtXUT1* de *C. tropicalis* durante fermentações utilizando apenas xilose como fonte de carbono. A barra hachurada é referente ao experimento contendo apenas glicose como fonte de carbono. A quantificação relativa foi medida por qPCR. As letras e asteriscos indicam a diferença significativa entre as médias calculadas analisadas pelo teste de *Bonferroni* de Comparações Múltiplas, com $P < 0.05$. Os valores de referem as médias de triplicatas biológicas e técnicas de cada condição. A expressão dos genes *ACT1* e *PDA1* foram utilizadas como normalizador de cada amostra.

Fonte: Autoria Própria

Durante a fermentação com a mistura de glicose e xilose na proporção 1:5 como fonte de carbono, o perfil de expressão dos genes *CtGXT2* e *CtXUT1* pode ser avaliado na Figura 19. Considerando a resposta de expressão de *CtGXT2* com o decorrer do processo fermentativo, pode-se perceber que esta é presente em todos os tempos de fermentação avaliados, assim como no experimento anterior, o qual era constituído apenas de xilose como fonte de carbono. Com o decorrer da fermentação a expressão sofre uma queda no tempo relativo a 4h e aumenta em 22 e 30 h se tornando constante. Os tempos de 22h e 20h não se diferenciaram significativamente quanto a expressão quando comparados ao experimento referente à condição controle, constituída de apenas glicose como fonte de carbono (barra hachurada).

O modelo *in silico* elaborado por Bertilsson et al. (2008) mostrou que baixas concentrações de glicose ($\pm 0,5 \text{ gL}^{-1}$) apoiaram o transporte de xilose principalmente através da indução de transportadores de alta afinidade, o que mais do que compensou a competição

cinética entre xilose e glicose. Além disso, estudos de Fonseca et al. (2011) sobre a expressão de *GFX1* de *C. intermedia* em *S. cerevisiae* em meio contendo a mistura de glicose e xilose, este gene favoreceu a captação simultânea das fontes de carbono, ou seja, a presença do transportador GFX1 foi indicada como facilitador do transporte de xilose na presença de glicose.

Figura 19- Perfil de expressão dos genes *CtGXT2* e *CtXUT1* de *C. tropicalis* durante fermentações utilizando glicose e xilose como fonte de carbono. A barra hachurada é referente ao experimento contendo apenas glicose como fonte de carbono. A quantificação relativa foi medida por qPCR. As letras e asteriscos indicam a diferença significativa entre as médias calculadas analisadas pelo teste de *Bonferroni* de Comparações Múltiplas, com $P < 0.05$. Os valores de referem as médias de triplicatas biológicas e técnicas de cada condição. A expressão dos genes *ACT1* e *PDA1* foram utilizadas como normalizador de cada amostra.

Fonte: Autoria Própria

A expressão de *CtXUT1* observada constituiu um padrão completamente diferente do experimento anterior, o qual era constituído apenas de xilose como fonte de carbono. Assim, podemos perceber claramente que, nas primeiras horas de fermentação avaliadas, devido a presença de glicose que ainda não tinha se esgotado, sua expressão foi nula, e nos tempos de 22 e 30 horas, a expressão foi significativa. Nos estudos de cinética e atividade de SsXUT1, além da forte preferência por xilose, foi constatado por Young et al. (2011) que esta proteína transportadora em 24h foi capaz de importar apenas 16% dos açúcares presentes, e sua atividade era maior em condições de menores concentrações de substrato.

Assim como encontrado após caracterização cinética do transporte de xilose e glicose em *C. intermedia* por Gárdonyi et al. (2003b) onde os autores concordam em mostrar que as leveduras capazes de metabolizar a xilose geralmente possuem um sistema de transporte de xilose caracterizado como próton-simporte mais ou menos específico, funcionando com maior afinidade em concentrações relativamente baixas do açúcar (substrato).

Os resultados de expressão obtidos para o gene *CtXUT1* juntamente com os dados de expressão obtidos da condição de xilose como fonte de carbono, considerando o mesmo gene, corroboram com a indicação deste gene *CtXUT1* como codificante para uma proteína transportadora específica de xilose em *C. tropicalis*.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi demonstrado a presença de transportadores com diferentes afinidades pela molécula de xilose na levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, que na presente pesquisa foi identificada como *Candida tropicalis*. Evidenciou-se que a construção de árvores filogenéticas foi efetiva para a identificação de proteínas de acordo com as similaridades de sequências de aminoácidos em relação a outros microrganismos já estudados, que apresentam transportadores desta superfamília, cujas sequências já se encontram depositadas em bancos de dados genômicos.

Destaca-se a identificação de dois genes relacionados ao transporte de xilose em *C. tropicalis* (*XUT1* e *GXT2*), os quais foram analisados quanto à expressão gênica através da técnica de qPCR durante distintas condições de fermentação. A expressão relativa demonstrou o perfil de resposta destes transportadores em função da concentração de glicose e xilose presentes no meio, sendo que *XUT1* apresentou indícios de seletividade pela molécula de xilose.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, considerando este um trabalho inovador, novas linhas de pesquisa podem ser abertas com o intuito de aprofundar os conhecimentos acerca da captação de carboidratos por esta levedura, na tentativa de melhorar o fluxo metabólico e aperfeiçoar o bioprocesso de bioconversão de xilose a xilitol, e assim contribuir para a viabilidade do emprego deste processo em escala industrial.

7 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Com os resultados obtidos, trabalhos futuros podem ser realizados visando continuar a elucidação do sistema de transporte de carboidratos através da membrana plasmática da levedura *Candida tropicalis*:

- Avaliar a velocidade e afinidade dos transportadores pelos respectivos substratos a partir da utilização de monossacarídeos com carbonos radiotivamente identificados;
- Estudar a possibilidade de superexpressão de *CtXUT1* em *C. tropicalis* com o intuito de avaliar a relação de fluxo metabólico e transporte de xilose;
- Avaliar se a expressão dos respectivos genes em meios complexos, a exemplo de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço e palha, possui alteração devido a constituição destes;
- Realizar experimentos de localização subcelular do transportador utilizando microscopia confocal a partir de técnicas de fusão com proteínas fluorescentes (a exemplo de GFP-*Green Fluorescent Protein*).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, C. A.; SIBIRNY, A. A. Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 321–360, 2011.
- ALBUQUERQUE, T. et al. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic Wastes: A review. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 1779-1789, 2014.
- ALCORN, M. E.; GRIFFIN, C. C. A kinetic analysis of D-xylose transport in *Rhodotorula glutinis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 510 p. 361–371, 1978.
- ALLEN, S. A. et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Biofuels**, v. 3, p. 2, 2010.
- ALONSO-PIPPPO, W. et al. Sugarcane energy use: The Cuban case. **Energy Policy**, v. 36, n. 6, p. 2163–2181, 2008.
- ALTSCHUL, F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANWAR, Z. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 163-173, 2014.
- APEL, A. R. et al. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 9, p. 1–10, 2016.
- ARCAÑO, Y. D. et al. Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route. **Catalysis Today**, 2018.
- ARRUDA, P.; FELIPE, M. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Current microbiology**, v. 58, n. 3, p. 274, 2008.
- ARRUDA, P. V. **Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 163f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.
- ARRUDA, P. V. et al. Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 47, p. 297–302, 2017.
- ASHE, P.; LONG, K.; SACHS, B. Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. **Molecular biology of the cell**, v. 11, n. 3, p. 833-848, 2000.
- BARBOSA, M. F. S. et al. Screening of yeast for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 241-251, 1988.

- BARNETT, J. et al. **Yeasts: Characteristics and Identification**, 2nd ed. University Press, Cambridge, 1990.
- BARNETT, J. et al. **Yeasts: Characteristics and Identification**, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- BARNETT, J. A. Beginnings of microbiology and biochemistry: The contribution of yeast research. **Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 557–567, 2003.
- BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 13. Active transport and the uptake of various metabolites. **Yeast**, v. 25, n. 10, p. 689–731, 2008.
- BASAN, M. et al. Overflow metabolism in *Escherichia coli* results from efficient proteome allocation. **Nature**, v. 528, n. 7580, p. 99–104, 2015.
- BENGTSSON, O. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *S. cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1-10, 2009.
- BERTILSSON, M. et al. Modeling simultaneous glucose and xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* from kinetics and gene expression of sugar transporters. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 31, n. 4, p. 369-377, 2008.
- BIAN, J., et al. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 638-645, 2012.
- BISSON, L. F. et al. Yeast sugar transporters. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 259–308, 1993.
- BLANCO, A. et al. Membranes. **Medical Biochemistry**, p. 215–250, 2017.
- BOLES, E.; HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 85–111, 1997.
- BOTERO, C. D., et al. Comprehensive review on the implementation of the biorefinery concept in biodiesel production plants. **Biofuel Research Journal**, n. 15, p. 691-703, 2017.
- BOUTET, E. et al. Uniprotkb/swiss-prot. In: **Plant bioinformatics**. Humana Press, 2007. p. 89-112.
- BRANCO, R. F. et al. Xylitol production in a bubble column bioreactor: Influence of the aeration rate and immobilized system concentration. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 258–262, 2007.
- BROACH, J. R. Nutritional control of growth and development in yeast. **Genetics**, v. 192, n. 1, p. 73–105, 2012.
- BRUINENBERG, P. M. et al. The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. **European Journal Applied Microbiology and Biotechnology** v. 18 p. 287–292, 1983a.

- BRUINENBERG, P. M. et al. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. **Journal of Genetics Microbiology**, v. 129, p. 953–964, 1983b.
- BRUINENBERG, P. M. et al. NADH-linked aldose reductase - the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 256–260, 1984.
- BRUINENBERG, P. M. The NADP(H) redox couple in yeast metabolism. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 52, p. 411–429, 1986.
- BUTLER, G. et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, p. 657–662, 2010.
- CAMARGO, D. et al. Xylitol Bioproduction in Hemicellulosic Hydrolysate Obtained from Sorghum Forage Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 8, p. 3628–3642, 2015.
- CANILHA, L. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1–8, p. 84–92, 2010.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of Hemicellulose from Sugarcane Biomass into Sustainable Products. In: CHANDEL, A. (Ed). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass**. IntechOpen, 2013. cap 2, p. 15–45.
- CARDOSO, T. F. et al. A vertical integration simplified model for straw recovery as feedstock in sugarcane biorefineries. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 216–223, 2015.
- CARVALHEIRO, F. et al. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, p. 849–864, 2008.
- CARVALHO, J, L, N. et al. Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review. **Global Change Biology**, p.1–15, 2016.
- CERRI, C. C. et al. Effect of sugarcane harvesting systems on soil carbon stocks in Brazil: An examination of existing data. **European Journal of Soil Science**, v. 62, n. 1, p. 23–28, 2011.
- CHANDEL, A.K.; SINGH, O.V; RAO, L.V. **Biotechnological Applications of Hemicellulosic Derived Sugars: State-of-the-Art**. In: SINGH, O.; HARVEY, S. (eds). **Sustainable Biotechnology**, Springer, Dordrecht, p.63–81, 2010.
- CHANDEL, A.K. et al. Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 2019.
- CHENG, K. K. et al. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 105–109, 2008.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**. Safra 2019/20. Primeiro levantamento. Brasília, 2019. 71p.

CONRAD, M. et al. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 2, p. 254–299, 2014.

CORNELL, M. J. et al. Comparative genome analysis across a kingdom of eukaryotic organisms: specialization and diversification in the Fungi. **Genome Research**, v.17, p. 1809–1822, 2007.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

DA SILVA, A. S. A. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7402–7409, 2010.

DARAN-LAPUJADE, P. et al. Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 279, p. 9125–9138, 2004.

DE ALBUQUERQUE, T. L. et al. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**, v. 255, 2015.

DE NOBEL, J. G. et al. Increased Cell Wall Porosity in *Saccharomyces cerevisiae* after Treatment with Dithiothreitol or EDTA. **Microbiology**, v. 135, n. 7, p. 2077–2084, 1989.

DIAS, M. O. S. et al. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 152–161, 2012.

DIAZ-RUIZ, R.; RIGOLET, M.; DEVIN, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1807, n. 6, p. 568–76, 2011.

DIDERICH, J. A. et al. Glucose Uptake Kinetics and Transcription of HXT Genes in Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 22, p. 15350–15359, 1999.

DIDERICH, J. A. et al. Functional analysis of the hexose transporter homologue HXT5 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 18, n. 16, p. 1515–1524, 2001.

DOES, A. L.; BISSON, L. F. Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts, **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 1303, 1989.

DONG, S. J.; YI, C. F.; LI, H. Changes of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane components and promotion to ethanol tolerance during the bioethanol fermentation. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 69, p. 196–203, 2015.

DONG C. et al. New Generation Urban Biorrefinery toward Complete utilization of waste derived lignocellulosic biomass for Biofuels and Value-Added products, **Energy Procedia**, v. 158, p. 918-925, 2019.

DUJON, B. et al. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 35, 2004.

DUJON, B. Yeast Evolutionary Genomics. **Yeast: Molecular and Cell Biology**, v. 11, n. 7, p. 407–419, 2012.

DUY, A.; ZAJIC, J. Sampling procedures for non-newtonian fermentation broths. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 3, p. 579-581, 1973.

EDDY, A. A.; BARNETT, J. A. A history of research on yeasts II. The study of solute transport: the first 90 years, simple and facilitated diffusion. **Yeast**, v. 24, n. 10, p. 1023–1059, 2007.

EISEN, J. A. Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 163-167, 1998.

ELAMIN, K. et al. Calorimetric and relaxation properties of xylitol-water mixtures. **The Journal of Chemical Physics**, v. 136, n. 10, p. 104508, 2012.

ELBING, K. et al. Role of Hexose Transport in Control of Glycolytic Flux in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5323–5330, 2004.

ELIASSON, A. et al. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3381–3386, 2000.

ERNST, R.; BALLWEG, S.; LEVENTAL, I. Cellular mechanisms of physicochemical membrane homeostasis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 53, p. 44–51, 2018.

ERYASAR, K.; KARASU-YALCIN, S. Evaluation of some lignocellulosic byproducts of food industry for microbial xylitol production by *Candida tropicalis*. **Biotechnology**, v. 6, n. 2, 2016.

EWALD, J. C. How yeast coordinates metabolism, growth and division. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 1–7, 2018.

FELIPE, M. G. A. et al. Effect of acetic-acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 171–177, 1995.

FELIPE, M. G. A. et al. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 251–254, 1997.

FELIPE, M. G. A. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic materials. **Lignocellulose Biodegradation American Chemical Society**, p. 300–315, 2004.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure reactions**. New York: W. De Gruyter, 1983.

FINN, R. et al. **Pfam: the protein families database**, v. 42, p. 222-30, 2014.

FONSECA, C. et al. The glucose/xylose facilitator Gxf1 from *Candida intermedia* expressed in a xylose-fermenting industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* increases

xylose uptake in SSCF of wheat straw. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 6-7, p. 518-525, 2011.

GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy yielding metabolism. In: HARRISSON, J.S.; ROSE, A.H. **The yeasts. Metabolism and Physiology of Yeasts**, 2nd ed. New York: Academic Press, Inc., 1989. v.3, p. 205–259.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 62 p. 334–361, 1998.

GANCEDO, J. M. The early steps of glucose signaling in yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 673– 704, 2008.

GÁRDONYI, M. A. et al. Control of xylose consumption by xylose transport in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 7, p. 818–824, 2003a.

GÁRDONYI, M. A. et al. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research**, v. 3, n. 1, p. 45–52, 2003b.

GIANNATTASIO, S. et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–7, 2013.

GONÇALVES, D. L. et al. Xylose and xylose / glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 63, p. 13–20, 2014.

SISO, M. I.G. et al. Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 8, p. 585–591, 1996.

GOULD, S. Membranes and evolution. **Current Biology**, v.28, p. 367-420, 2018.

GRECCO, H. E.; SCHMICK, M.; BASTIAENS, P. I. H. Signaling from the living plasma membrane. **Cell**, v. 144, n. 6, p. 897–909, 2011.

GRESHAM, D.; RANCATI, G. Meeting Report: **Experimental and Evolutionary Approaches to Yeast and Other Organisms**, 2019.

GRIFFITH, J. K. et al. Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. **Current Opinion Cell Biology**, v. 4, p. 684–695, 1992.

GUO, C. et al. Screening and characterization of yeasts for xylitol production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 5, p. 1096–1104, 2006.

GURPILHARES, D. B. et al. The behavior of key enzymes of xylose metabolism on the xylitol production by *Candida guilliermondii* grown in hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 87–93, 2009.

MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. **Advances Biochemistry Engineering Biotechnology** v. 73 p. 53–84, 2001.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, n. 2, p. 147–177, 2007.

HAMACHER, T. et al. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v. 148, n. 9, p. 2783–2788, 2002.

HAMDAOUI, O.; NAFFRECHOUX, E. Modeling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon. Part I. Two-parameter models and equations allowing determination of thermodynamic parameters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, n. 1–2, p. 381–394, 2007.

HAROUN, B. M. et al. Impact of furfural on biohydrogen production from glucose and xylose in continuous-flow systems. **Renewable Energy**, v. 93, p. 302–311, 2016.

HATFIELD, R. D. et al. Enzymatic processes involved in the incorporation of hydroxycinnamates into grass cell walls. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 35–45, 2010.

HELLEMANS, J., et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome biology**, v. 8, p. 19, 2007.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. **Aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol: Estudo da atuação de co-substratos e permeabilizante de membrana celular**. 2015. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A.F.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 489–496, 2016.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. **Produção biotecnológica de xilitol a partir da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar com aproveitamento do melaço: Otimização das condições de cultivo e engenharia da via metabólica**. 2017. Exame de Qualificação - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M. **Handbook of Food Bioengineering**. Academic Press, Elsevier Inc., 2017.

HORAK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochim Biophysics Acta**, v. 1331, p. 41–79, 1997.

HORÁK, J. Regulations of sugar transporters: insights from yeast. **Current genetics**, v. 59, n. 1–2, p. 1–31, 2013.

HOU-RUI, Z. Key drivers influencing the large-scale production of xylitol. In: SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. (Ed). **D-Xylitol. Fermentative production, application and commercialization**. Berlin: Springer-Verlag, 2012. cap 12, p. 267-290.

HU, B. et al. Pyrolysis mechanism of glucose and mannose: The formation of 5-hydroxymethyl furfural and furfural. **Journal of Energy Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 486–501, 2018.

HUA, C. et al. Adsorption of phenol from aqueous solutions using activated carbon prepared from crofton weed. **Desalination and Water Treatment**, v. 37, n. 1–3, p. 230–237, 2012.

HUNTER, S. et al. InterPro: the integrative protein signature database. **Nucleic acids research**, v. 37, n.1, p. 211-215, 2008.

IRMAK, S. et al. Xylitol production from lignocellulosics: Are corn biomass residues good candidates? **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 220–223, 2017.

ISLAM, M. Effects of xylitol as a sugar substitute on diabetes-related parameters in nondiabetic rats. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 5, p. 505-511, 2011.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 495–509, 2004.

JEFFRIES, T.W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current opinion in biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 320-326, 2006.

JEFFRIES, T. W. et al. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 319–326, 2007.

JEPPSSON, M. et al. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68 p. 1604–1609, 2002.

JIN, Y.; CATE, J. Metabolic engineering of yeast for lignocellulosic biofuel production. **Current opinion in chemical biology**, v. 41, p. 99-106, 2017.

JOHNSTON, M.; KIM, J. H. Nutrient Sensing through the Plasma Membrane of Eukaryotic Cells. **Biochemical Society**, n. 9, p. 247–252, 2005.

JOJIMA, T. et al. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 471-480, 2010.

KATAHIRA, S. et al. Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter Sut1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 115-119, 2008.

- KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012
- KIATKITTIPONG, W.; WONGSUCHOTO, P.; PAVASANT, P. Life cycle assessment of bagasse waste management options. **Waste Management**, v. 29, n. 5, p. 1628–1633, 2009.
- KIELISZEK, M. et al. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 185–198, 2017.
- KILIAN S.G.; UDEN, N. V. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27 p. 545–548, 1988.
- KIM, J. H.; RYU, Y. W.; SEO, J. H. Analysis and optimization of a two-substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 181–186, 1999.
- KIM, J. H. DNA-binding properties of the yeast Rgt1 repressor. **Biochimie**, v. 91, n. 2, p. 300–303, 2009.
- KIM, M. et al. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 803-807, 2012.
- KIM, J. H. et al. The glucose signaling network in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 11, p. 5204–5210, 2013.
- KIM, K. H.; LEE, H. Y.; LEE, C. Y. Pretreatment of sugarcane molasses and citric acid production by *Candida zeylanoides*. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 164–168, 2015.
- KLINKE, H. et al. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10–26, 2004.
- KOGJE, A. et al. Xylitol production by *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing different xylose reductases using non-detoxified hemicellulosic hydrolysate of corncob. **Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 127, 2016.
- KOTHAVADE, R. J. et al. *Candida tropicalis*: Its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 873–880, 2010.
- KRAPF, D. Compartmentalization of the plasma membrane. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 53, p. 15–21, 2018.
- KRESNOWATI, M. T. A. P. et al. When transcriptome meets metabolome: Fast cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation. **Molecular Systems Biology**, v. 2, 2006.
- KUHLMAN, T. et al. Combinatorial transcriptional control of the lactose operon of *Escherichia coli*. **PNAS**, v. 3, p. 6043-6048, 2007.

KUMAR, S. et al. Kinetic studies of two-stage sulphuric acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Renewable energy**, v. 83, p. 850-858, 2015.

KUMAR, S. et al. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KURAMAE E. et al. Phylogenomics reveal a robust fungal tree of life. **FEMS Yeast Research**, v.6, p.1213–1220, 2006.

KURTZMAN C.P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v. 51 p. 2–14, 2010.

KUYPER, M. et al. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 925–934, 2005.

KWAK, Suryang et al. Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains. **Biotechnology advances**, 2019.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Reviews**, v. 104, p. 229–242, 1993.

LANGE, J. Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining: Innovation for a sustainable economy**, v. 1, n. 1, p. 39-48, 2007.

LEANDRO, M.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS, I. Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. **Biochemical Journal**, v. 395, n. 3, p. 543–549, 2006.

LEANDRO, M.; SPENCER-MARTINS, I.; GONÇALVES, P. The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/xylose facilitator. **Microbiology**, v. 154, n. 6, p. 1646–1655, 2008.

LEANDRO, M.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: An overview. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 4, p. 511–525, 2009.

LEE, S.K. et al. Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 556–563, 2008.

LI, J. et al. Functional analysis of two L-arabinose transporters from filamentous fungi reveals promising characteristics for improved pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 81, n. 12, p. 4062-4070, 2015.

LIMA, L. H. A.; DE ALMEIDA FELIPE, M. D. G.; GONÇALVES TORRES, F. A. Reclassification of *Candida guilliermondii* FTI 20037 as *Candida tropicalis* based on molecular phylogenetic analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 96–98, 2003.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.

LIN, Z.; LI, W. H. Expansion of hexose transporter genes was associated with the evolution of aerobic fermentation in yeasts. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 1, p. 131–142, 2011.

LIN, R. et al. Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 250–255, 2015.

LINDSLEY, D. et al. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3505–3511, 2001.

LIU, C. Z.; CHENG, X. Y. Improved hydrogen production via thermophilic fermentation of corn stover by microwave-assisted acid pretreatment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 17, p. 8945–8952, 2010.

LIU, Z. et al. Effects of furan derivatives on biohydrogen fermentation from wet steam-exploded cornstalk and its microbial community. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 152–159, 2015.

LÓPEZ-LINARES, J. et al. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 736–743, 2018.

LUCAS, C.; VANUDEN, N. Transport of hemicellulose monomers in the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 23, p. 491–495, 1986.

LUO, G; MITCHELL, G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2860–2865, 2002.

MA, M.; LIU, Z. L.; MOON, J. Genetic Engineering of Inhibitor-Tolerant *Saccharomyces cerevisiae* for Improved Xylose Utilization in Ethanol Production. **BioEnergy Research**, v. 5, n. 2, p. 459–469, 2012.

MADIGAN, T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MAIER, A. et al. Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with. **FEMS yeast**, v. 2, p. 539–550, 2002.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2019). Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/arquivos-producao/copy13_of_07_prodsucroalcooleiraBR.pdf. Acesso em: 28 abr 2019.

MARCET-HOUBEN, M. et al. The tree versus the forest: the fungal tree of life and the topological diversity within the yeast phylome. **PloS one**, v. 4, n. 2, p. e4357, 2009.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 348–352, 2012.

MARTÍNEZ, M. L.; SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V. Production of xylitol and ethanol by *Hansenula polymorpha* from hydrolysates of sunflower stalks with phosphoric acid. **Industrial Crops and Products**, v. 40, n. 1, p. 160–166, 2012.

MARTIN-GALIANO, A. J.; FRISHMAN, D. Defining the fold space of membrane proteins: The CAMPS database. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 64, n. 4, p. 906–922, 2006.

MARTON, J. M. et al. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 9–21, 2006.

MATSUSHIKA, A. et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84 n. 1 p. 37-53, 2009.

MEINANDER, Q. et al. Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing XYL1 and XYL2 from *Pichia stipitis* with and without overexpression of TAL1. **Bioresource technology**, v. 68, n. 1, p. 79-87, 1999.

MELAJA; HAMALAINEN. **Process for making xylitol**. U.S. Patent n. 4,008,285, 15 fev. 1977.

MENON, V; RAO, S. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in energy and combustion science**, v. 38, n. 4, p. 522-550, 2012.

MOHAMAD, N. et al. Xylitol biological production: a review of recent studies. **Food reviews international**, v. 31, n. 1, p. 74-89, 2015.

MOHAMMAD, K. et al. Some Metabolites act as second messengers in yeast chronological aging. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, p. 860, 2018.

MONLAU, F. et al. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 934–951, 2014.

MOON, J. et al. New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 247–254, 2013.

MORIYA, H.; JOHNSTON, M. Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 6, p. 1572–7, 2004.

- MUSSATTO, S. et al. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas**, v. 38, p. 401–413, 2002.
- MUSSATTO, S.; SILVA, M.; ROBERTO, I. Fermentation performance of *Candida guilliermondii* for xylitol production on single and mixed substrate media. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, n. 4, p. 681–686, 2006.
- NAIDU, D. S.; HLANGOTHI, S. P.; JOHN, M. J. Bio-based products from xylan: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, n. 2017, p. 28–41, 2018.
- NCBI "Database resources of the national center for biotechnology information." Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 27 set 2017.
- NEGRI, M. et al. Examination of Potential Virulence Factors of *Candida tropicalis* Clinical Isolates from Hospitalized Patients. **Mycopathologia**, v. 169, n. 3, p. 175–182, 2010.
- NEPPELENBROEK, K. H. et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: A review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral Diseases**, v. 20, n. 4, p. 329–344, 2014.
- NOBRE, A.; LUCAS, C.; LEÃO, C. Transport and utilization of hexoses and pentoses in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3594–3598, 1999.
- O'DONNELL, K.; KEARSLEY, M. W. **Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology**. 1st Ed. Blackwell Publishing Ltd, 2012.
- OBEROI, H. S. et al. Enhanced ethanol production via fermentation of rice straw with hydrolysate-adapted *Candida tropicalis* ATCC 13803. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1299–1306, 2010.
- OH, E. et al. Enhanced xylitol production through simultaneous co-utilization of cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 15, p. 226–234, 2013. PAL, S. et al. Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 449–455, 2013.
- OZCAN, S.; JOHNSTON, M. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 3, p. 1564–1572, 1995.
- OZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 63, n. 3, p. 554–69, 1999.
- PAO, S.S. et al. Major facilitator superfamily. **Microbiology Molecular Biology Research**, v. 62, p. 1–34, 1998.
- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 191–201, 1998.

- PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 244–263, 2007.
- PAPON, N. et al. *Candida guilliermondii*: Biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. **Current Genetics**, v. 59, n. 3, p. 73–90, 2013.
- PENG, B. et al. Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 1, p. 9-18, 2012.
- PEREIRA, F. B. et al. Identification of candidate genes for yeast engineering to improve bioethanol production in Very-High-Gravity and lignocellulosic biomass industrial fermentations. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 57, 2011.
- PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53-63, 2002.
- PETER, J. et al. Genome evolution across 1,011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. **Nature**, v. 556, n. 7701, p. 339, 2018.
- PETERSEN, T. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature methods**, v. 8, n. 10, p. 785, 2011.
- PHAFF, H. J. *Pichia heedii*, a New Species of Yeast Indigenous to Necrotic Cacti in the North American Sonoran Desert. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, n.2, p. 326-331, 1978.
- PICATAGGIO, S. et al. Metabolic Engineering of *Candida Tropicalis* for the Production of Long-Chain Dicarboxylic Acids. **Nature Biotechnology**, v. 10, n. 8, p. 894–898, 1992.
- PINCUS, D. H.; ORENGA, S.; CHATELLIER, S. Yeast identification - Past, present, and future methods. **Medical Mycology**, v. 45, n. 2, p. 97–121, 2007.
- RAGAUSKAS, J. et al. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.
- RAMOS, José; SYCHROVÁ, Hana; KSCHISCHO, Maik (Ed.). **Yeast membrane transport**. Berlin: Springer, 2016.
- RAO, L. V. et al. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 299–310, 2016.
- REIFENBERGER, et al. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **European Journal of Biochemistry**, v. 245, n. 2, p. 324–333, 1997.
- REST, M. et al. The Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. **Structure, Function, and Biogenesis**, v. 59, n. 2, p. 304–322, 1995.
- RØDKÆR, S. V.; FÆRGEMAN, N. J. Glucose and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 14, p. 683–696, 2014.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1231–1237, 2003.

ROMI, W. et al. Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 52, 2014.

ROSSI, G. et al. Effect of HXT 1 and HXT 7 hexose transporter overexpression on wild-type and lactic acid producing *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Microbial cell factories**, v. 9, n. 1, p. 15, 2010.

ROY, A. et al. Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter Hxt1. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 9, p. 2878–2885, 2014.

RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RÅDSTRÖM, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2010.

SAIER, M.H. et al. TCDB: the transporter classification database for membrane transport protein analyses and information. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. 181–186, 2006.

SAIER, M.H. et al. The transporter classification database: recent advances. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 274–278, 2009.

SAINI, P. et al. Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation. **Process Biochemistry**, n. 3, p. 0–1, 2018.

SALOHEIMO, A. et al. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74 p. 1041–1052, 2007.

SAMPAIO, F. C. et al. Xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* UFV-170. Effect of the specific oxygen uptake rate. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 6, p. 1641–1650, 2004.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406–425, 1987.

SCARLAT, N. et al. The role of biomass and bioenergy in a future bioeconomy: Policies and facts. **Environmental Development**, v.15 p. 3-34, 2015.

SCHIRMER-MICHEL, A. C. et al. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2898-2904, 2008.

SCHOCH, L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SCHWARTZ, K. et al. APJ1 and GRE3 homologs work in concert to allow growth in xylose in a natural *Saccharomyces sensu stricto* hybrid yeast. **Genetics**, v. 191, n. 2, p. 621-632, 2012.

SEIDL, P. R.; GOULART, A. K. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 2, p. 48-53, 2016.

SERRANO, R.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; FINK, G. R. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na + K), K and Ca - ATPases. **Nature**, v. 319, p. 689-693, 1986.

SHARMA, N. K. et al. Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2017.

SIEVERS, F.; HIGGINS, G. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. In: **Multiple sequence alignment methods.**, Totowa, NJ.: Humana Press, 2014. p. 105-116.

SILVA, D. D. V. et al. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 248-254, 2004.

SILVA, D. D.; FELIPE, M. G. A. Effect of glucose:xylose ratio on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, p. 1294-1300, 2006.

SILVA, D. D. et al., Improvement of Biotechnological Xylitol Production by Glucose During Cultive of *Candida guilliermondii* in Sugarcane Bagasse Hydrolysate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 207-215, 2007.

SILVA, S. et al. Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 241-247, 2011.

SILVA-FERNANDES, T. et al. Biodegradable alternative for removing toxic compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for valorization in biorefineries. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 384-392, 2017.

SINNER, M. et al. **Process for production of xylitol from lignocellulosic raw materials.** U.S. Patent n. 4,742,814, 10 maio 1988.

SINGER, S. J.; GARTH, L. N. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.

SPENCER-MARTINS, I. Transport of sugars in yeasts: Implications in the fermentation of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 50, n. 1, p. 51-57, 1994.

SUBTIL, T.; BOLES, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. 14, 2012.

SWAIN, M. R.; KRISHNAN, C. Improved conversion of rice straw to ethanol and xylitol by combination of moderate temperature ammonia pretreatment and sequential fermentation using *Candida tropicalis*. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 1039–1046, 2015.

TADA, K. et al. Microbial xylitol production from corn cobs using *Candida magnoliae*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 98, n. 3, p. 228-230, 2004.

TIZAZU, B. Z.; MOHOLKAR, V. S. Kinetic and Thermodynamic Analysis of Dilute Acid Hydrolysis of Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 197–203, 2017.

TMHMM, SERVER. v. 2.0. Tmhmm server v2.0. Disponível em: <http://www.cbs.dtu.dk/services/tmhmm>. Acesso em: 21 out. 2017.

UNICA - UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Protocolo Agroambiental do Setor Sucroalcooleiro**. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.unica.com.br/setor-sucroenergetico>. Acesso em: 23 mar. 2019.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 15, p. 115-115, 2012.

VALDIVIA, M. et al. Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. **Microbial biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 585-594, 2016.

VAN URK et al. Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. **Journal of Genetics and Microbiology**, v. 135, p. 2399-2406, 1989.

VAN VLEET, J.; JEFFRIES, T. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 300–306, 2009.

VARDY, E. et al. Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative modeling. **Protein Science**, v. 13, p. 1832–1840, 2004.

VAZ JUNIOR, S. (Ed.). Biorrefinarias: cenários e perspectivas. Brasília, DF: **Embrapa Agroenergia**, p. 175, 2011.

VERDUYN, C. et al. Multiple forms of xylose reductase in *Pachysolen tannophilus* CBS 4044. **FEMS Microbiology Letters**, v. 30, p. 313–317, 1985a.

VERDUYN, C. et al. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Biochemistry Journal**, v. 226 p. 669–677, 1985b.

VERWAAL, R. et al. HXT5 expression is determined by growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 19, n. 12, p. 1029–1038, 2002.

WALSH, M. C. et al. Affinity of Glucose-Transport in *Saccharomyces cerevisiae* Is Modulated During Growth on Glucose. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 4, p. 953–958, 1994.

WANG, L. et al. Xylitol fermentation using hemicellulose hydrolysate prepared by acid pre-impregnated steam explosion of corncob. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 11, p. 2067-2074, 2012.

- WANG, C. et al. An assay for functional xylose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Analytical biochemistry**, v. 442, n. 2, p. 241-248, 2013.
- WEIERSTALL, T.; HOLLENBERG, C. P.; BOLES, E. Cloning and characterization of three genes (*SUT1-3*) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. **Molecular Microbiology**, v. 31 p. 871– 883, 1999.
- WENZEL, T. et al. PDA1 mRNA: a standard for quantitation of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* superior to ACT1 mRNA. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 5, p. 883, 1995.
- WHITE T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990, p. 315-322.
- WIECZORKE, R. et al. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 464, n. 3, p. 123–128, 1999.
- WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 1–14, 1998.
- WOESE, C. et al. A natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.
- WU, B. et al. Competitive intra- and extracellular nutrient sensing by the transporter homologue Ssy1p. **Journal of Cell Biology**, v. 173, n. 3, p. 327–331, 2006.
- YAGUCHI, Allison; SPAGNUOLO, Michael; BLENNER, Mark. Engineering yeast for utilization of alternative feedstocks. **Current opinion in biotechnology**, v. 53, p. 122-129, 2018.
- YE, L. et al. Expression and activity of the Hxt7 high-affinity hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 18, n. 13, p. 1257–1267, 2001.
- YE, J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.
- YOUNG, E.; LEE, S. M.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: The need for novel tools and approaches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1–12, 2010.
- YOUNG, E. et al. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3311–3319, 2011.
- YOUNG, E. M. et al. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 1, p. 131–136, 2013.
- YVERT, G. et al. Trans-acting regulatory variation in *Saccharomyces cerevisiae* and the role of transcription factors. **Nature genetics**, v. 35, n. 1, p. 57, 2003.

ZHAO, X.; ZHOU, Y.; LIU, D. Kinetic model for glycan hydrolysis and formation of monosaccharides during dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 160–168, 2012.

ZHOU, H. et al. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic engineering**, v. 14, n. 6, p. 611-622, 2012.

ZOU, Y. et al. Favorable effect of very low initial KLa value on xylitol production from xylose by a self-isolated strain of *Pichia guilliermondii*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 109, n. 2, p. 149-152, 2010.

ANEXO A

Figura 20- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente ao ITS da levedura *C. guilliermondii* FTI20037 utilizando o primer ITS1 e a região do ITS de *C. tropicalis* obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.

Fonte: Autoria Própria

Figura 21- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente ao ITS da levedura *C. guilliermondii* FTI20037 utilizando o primer ITS4 e a região do ITS de *C. tropicalis* obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.

Fonte: Autoria Própria

Figura 22- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente ao ITS da levedura *C. guilliermondii* FTI20037 utilizando o primer ITS1 e a região do ITS de *C. guilliermondii* obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.

Fonte: Autoria Própria

Figura 23- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente ao ITS da levedura *C. guilliermondii* FTI20037 utilizando o primer ITS4 e a região do ITS de *C. guilliermondii* obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.

Fonte: Autoria Própria

Figura 24- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente a enzima XR da levedura *C. guilliermondii* FTI20037 utilizando o primer XR(f) e a sequência da XR de *C. tropicalis* obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.

Fonte: Autoria Própria

Figura 25- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente a enzima XR da levedura *C. guilliermondii* FTI20037 utilizando o primer XR(r) e a sequência da XR de *C. tropicalis* obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.

Fonte: Autoria Própria

Figura 26- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente a enzima XR da levedura *C. guilliermondii* FTI20037 utilizando o primer XR(f) e a sequência da XR de *C. guilliermondii* obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.

Fonte: Autoria Própria

Figura 27- Alinhamento múltiplo entre as sequências de nucleotídeos obtidos após o sequenciamento da região correspondente a enzima XR da levedura *C. guilliermondii* FTI20037 utilizando o primer XR(r) e a sequência da XR de *C. guilliermondii* obtida do GenBank. O alinhamento foi realizado utilizando o programa Multalin.

Fonte: Autoria Própria

ANEXO B

Figura 28- Especificidade da reação de amplificação de qPCR. (A) Curva de *Melting* dos genes de referência (*ACT1* e *PDA1*). (B) Curva de *Melting* dos genes candidatos (*CtGXT2* e *CtXUT1*).

Fonte: Autoria Própria