UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ANDRÉS FELIPE HERNÁNDEZ PÉREZ

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

Lorena
2019

ANDRÉS FELIPE HERNÁNDEZ PÉREZ

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

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor 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

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Segato

Versão Corregida

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)

Hernández-Pérez, Andrés Felipe
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 / Andrés Felipe Hernández-Pérez; orientadora Maria das Graças de Almeida Felipe; co-orientador Fernando Segato - Versão Corrigida. - Lorena, 2019.
190 p.

Tese (Doutorado 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. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Palha de cana-de açúcar. 3. Xilitol . 4. Sacarose. 5. Melaço de cana-de açúcar.. I. Título. II. Felipe, Maria das Graças de Almeida, orient. III. Segato, Fernando, co-orient.

Dedico este trabalho a meus pais, Ruth e Héctor,
que são a base sólida sobre a qual construo meu caminho;
a meu irmão, Esteban, que está começando sua própria jornada;
e a minha vovó, que agora acompanha meus passos desde o céu.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ruth e Héctor, e meu irmão, Esteban, por ser exemplo de constância, disciplina e coragem. A *mi abuelita* por inspirar desde o céu cada passo que dou. A minha família inteira por seu apoio incondicional e confiança em cada desafio e nova aventura.

À professora Graça, por me fornecer todas as ferramentas necessárias para almejar grandes objetivos, a orientação para ir atrás deles, e a força suficiente para consegui-los.

Aos meus amigos do laboratório: Sarah, Fanny, Alejandra, Henrique, Olivia, Fernanda, Dani, Paulo Marcelo, Isabela, Tainah, Priscila, Katia, Debora, Kelly, por compartilhar esta caminhada e enchê-la de risadas, ótimas conversas e momentos inesquecíveis.

Aos meus amigos de Lorena, entre eles: Fernanda, Carlaile, Daiana, Diego peruano, Ruly, Angela, Dani, Larissa, Júlio, Ana, Lina, Annie, Isabela, Felipe chileno, Maiara, Omar Josman, Patrícia, Felipe Antunes, Gilda, Rafael, Matheus, Lidyane, e tantas outras lindas pessoas que conheci no Brasil, porque sem vocês e os momentos que vivemos juntos esta experiência não estaria completa.

Aos meus amigos de minha casa em Lorena: Itzco, Javier, Diego, Gui, Vini, Salvador, Edith, Jesús, Matheus, por se tornar minha família latina, pela parceria e o carinho.

Ao professor Júlio César dos Santos, pelas valiosas e frutíferas discussões, e a constante disposição para colaborar.

Ao professor Fernando Segato, pela orientação em uma área desafiante e praticamente nova para mim.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia, pelos ensinamentos, a orientação e reforçar meu interesse em permanecer na pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Biotecnologia e da Secretária da Pós-graduação, que estiveram sempre prontos a ajudar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de doutorado, a qual ampliou as fronteiras desta experiência (Processo No. 2016/05971-2), e pelo auxilio financeiro do projeto (Processo No. 2016/22179-0).

À Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, pela infraestrutura e a oportunidade.

Muchísimas gracias!

"He aprendido que el mundo quiere vivir en la cima de la montaña, sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada"

Gabriel García Márquez

RESUMO

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F. **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.** 2019. 190p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

A sustentabilidade da economia baseada em biomassa vegetal é dependente do desenvolvimento de biorrefinarias para obtenção de bioenergia e químicos de alto valor agregado, a exemplo do xilitol que apresenta um mercado crescente e diversas aplicações industriais. A viabilidade do bioprocesso para obtenção deste poliol, baseado na bioconversão da xilose proveniente da fração hemicelulósica da biomassa, depende de sua integração em uma biorrefinaria, de forma a se tornar uma alternativa rentável e sustentável ao método químico comercial. Neste contexto, este projeto visou contribuir para o desenvolvimento de uma rota biotecnológica de produção de xilitol a partir do aproveitamento de subprodutos da agroindústria da cana-de-açúcar (bagaço, palha e melaço), com vistas a sua integração no setor sucroalcooleiro no contexto de biorrefinaria. Resultados de pesquisa recente revelaram o efeito benéfico da sacarose na bioprodução de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, o que impulsionou a continuidade das investigações nesta temática. Portanto, este projeto teve como foco principal a melhoria da bioprodução de xilitol por *Candida tropicalis* pelo aumento concomitante nos valores de fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P), a partir do estudo de condições de cultivo e estratégias de engenharia da via metabólica. Em uma primeira etapa, verificou-se o potencial da mistura do bagaço e palha de cana como matéria-prima neste bioprocesso, em função à alta proporção de xilose (33,87%) em relação aos outros carboidratos constituintes. As etapas de hidrólise ácida diluída, concentração à vácuo e destoxificação resultaram em hidrolisado hemicelulósico com elevada proporção de xilose (77,76%) em comparação com os outros monossacarídeos, e com compostos potencialmente tóxicos em concentrações menores às já reportadas como inibitórias. Na segunda etapa, constatou-se que a sacarose suplementada ao meio de fermentação teve efeito benéfico como co-substrato na produção de xilitol em escala de biorreator de bancada, em função de sua concentração e da disponibilidade de oxigênio (em termos de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio - K_La). A utilização de condições dentro da faixa de otimização destes fatores (sacarose 0,9 gL^{-1} e K_La 6,5 h^{-1}) resultou em valores máximos de $Y_{P/S}$ (0,86 gg^{-1}) e Q_P (0,54 $gL^{-1}h^{-1}$), os quais foram 30 e 39% maiores aos obtidos no mesmo K_La e sem adição de sacarose. A avaliação do melaço de cana (concentração de sacarose ajustada a 20 gL^{-1}) como única suplementação nutricional do hidrolisado em escala de frascos agitados demonstrou melhoria na bioprodução de xilitol, em termos de consumo de xilose, $Y_{P/S}$ e Q_P, em comparação com a formulação convencional do meio. Na terceira etapa, as estratégias implementadas para o desenvolvimento de uma cepa de *C. tropicalis* com auxotrofia a uridina e a super expressão dos genes que codificam para a xilose redutase e glucose-6-fosfato desidrogenase tiveram resultados não satisfatórios. Os resultados obtidos no presente estudo contribuem com embasamento científico para o desenvolvimento de uma tecnologia de bioprodução de xilitol alternativa ao processo químico comercial, e com potencial de ser integrada em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar, a partir do aproveitamento de três subprodutos deste setor.

Palavras chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Palha de cana-de-açúcar. Xilitol. Sacarose. Melaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F. **Biotechnological production of xylitol from the mixture of sugarcane bagasse and straw using molasses: Optimization of culture conditions and engineering of the metabolic pathway**. 2019. 190p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Sustainability of the biomass-based economy depends on the development of biorefineries for production of bioenergy and high added-value chemicals, such as xylitol, which has a growing market and diverse industrial applications. Viability of the bioprocess to obtain this polyol, which is based on bioconversion of the xylose derived from the hemicellulosic fraction of biomass, depends on its integration into a biorefinery, in order to become a profitable and sustainable alternative to the commercial chemical method. In this context, the main objective of this project was to contribute to the development of a biotechnological route for xylitol production from the use of sugarcane agro-industry byproducts (bagasse, straw and molasses), aiming to its integration on the sugar-alcohol sector in a biorefinery context. A recent research revealed the beneficial effect of sucrose on the xylitol bioproduction in the sugarcane straw hemicellulosic hydrolysate, which promote the continuity of research on this subject. Therefore, this project had as main focus the improvement of xylitol bioproduction by *Candida tropicalis* by concomitant increases in xylitol yield ($Y_{P/S}$) and volumetric productivity (Q_P), from the study of culture conditions and strategies for metabolic pathway engineering. In the first stage, the potential of the mixture of sugarcane bagasse and straw as raw material in this bioprocess was verified, based on its high proportion of xylose (33.87%) in relation to the other constituent carbohydrates. The steps of dilute acid hydrolysis, vacuum concentration and detoxification resulted in a hemicellulosic hydrolysate with a high proportion of xylose (77.76%) compared to other monosaccharides, and with potentially toxic compounds at concentrations lower than those already reported as inhibitory. In the second stage, it was found that sucrose supplemented to the fermentation medium had a beneficial effect as a co-substrate on xylitol production at bench bioreactor scale, as a function of its concentration and the oxygen availability, evaluated in terms of the volumetric oxygen mass transfer coefficient (K_La). Utilization of conditions within the optimization range (sucrose 0.9 gL^{-1} and K_La 6.5 h^{-1}) resulted in maximum values of $Y_{P/S}$ (0.86 gg^{-1}) and Q_P (0.54 $gL^{-1}h^{-1}$), which were 30 and 39% higher than those obtained in the same K_La and without sucrose addition. Study of molasses (sucrose concentration adjusted to 20 gL^{-1}) as the sole nutritional supplementation of the hydrolysate at shaken flasks scale demonstrated improvement in xylitol bioproduction, in terms of xylose consumption, $Y_{P/S}$ and Q_P, compared to the conventional formulation of the medium. In the third stage, strategies implemented for the development of a *C. tropicalis* strain with uridine auxotrophy and the overexpression of the genes coding for xylose reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase did not have satisfactory results. The results obtained in the present study contribute as scientific background for the development of a profitable xylitol bioproduction technology as an alternative to the commercial chemical process, and with potential to be integrated potential in a sugarcane biorefinery, based on the use of three byproducts of this sector.

Keywords: Sugarcane bagasse. Sugarcane straw. Xylitol. Sucrose. Sugarcane molasses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Possíveis produtos a serem obtidos em uma biorrefinaria conceitual de cana-de-açúcar com aproveitamento integral de bagaço e palha de cana.....25
Figura 2 - Comparação das etapas principais dos processos químico e biotecnológico de produção de xilitol a partir de biomassas vegetais.....31
Figura 3 - Esquema da desconstrução da biomassa lignocelulósica durante a hidrólise ácida.....35
Figura 4 - Valores de produtividade volumétrica de xilitol ($gL^{-1}h^{-1}$) (■) e fator de conversão de xilose em xilitol (gg^{-1}) (■) obtidos em função das diferentes estratégias já avaliadas pelo grupo GMBIO com emprego de *C. guilliermondii* FTI 20037 a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....42
Figura 5 - Modelo de metabolismo de leveduras fermentadoras de pentoses cultivadas em hidrolisados hemicelulósicos em condições microaeróbicas, com destaque para a assimilação de xilose e formação de xilitol.....45
Figura 6 - Esquema de recombinação homóloga em uma única reação isotérmica pela metodologia de *Gibson Assembly*.....56
Figura 7 - Esquema das estratégias empregadas para transformação sequencial usando o método de *ura3-blasting* de *C. tropicalis* para deleção de XDH (A), expressão heteróloga de XR (B) e de G6PDH e 6PGDH (C).....60
Figura 8 - Relação filogenética de *C. tropicalis* com outras leveduras do CTG *clade* e de interesse industrial e/ou académico. 69
Figura 9 - Fluxograma de trabalho proposto no presente projeto. 71

(Capítulo 1)

Figura 1.1 - Fotografias da palha e bagaço de cana, e da mistura 1:1 destas biomassas ... 74
Figura 1.2 - Fotografia do reator de hidrólise Allbiom CR80. 77

(Capítulo 2)

Figura 2.1 - Fotografia do fermentador de bancada Multgen. 100
Figura 2.2 - Gráfico de Pareto para a significância dos efeitos das variáveis concentração de sacarose e K_La no: A) consumo de xilose; B) fator de conversão de xilose em xilitol; C) produtividade volumétrica de xilitol (C); D) crescimento celular..... 108
Figura 2.3 - Superfícies de resposta 3D para o fator de conversão de xilose em xilitol (A), produtividade volumétrica de xilitol (B) e crescimento celular (C) em função dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose. 113
Figura 2.4 - Gráfico para definir regiões de otimização dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose 116
Figura 2.5 - Consumo de xilose (◆), glicose (+) sacarose (x), crescimento celular (▲), produção de xilitol (■) e etanol (●) por *C. tropicalis* a partir do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana, sob diferentes condições de K_La e concentração inicial de sacarose: A) K_La 3,6 h^{-1} e sacarose 0,9 gL^{-1}; B) K_La 6,5 h^{-1} e sacarose 0,9 gL^{-1}; C) K_La 9,4 h^{-1} e sacarose 0,9 gL^{-1}; D) K_La 6,5 h^{-1} e sacarose 0 gL^{-1}. 117
Figura 2.6 - Consumo de xilose (◆), glicose (+) sacarose (x), crescimento celular (▲), produção de xilitol (■) e etanol (●) por *C. tropicalis* no hidrolisado hemicelulósico da

mistura de bagaço e palha de cana em K_La 15 h^{-1} e diferentes concentrações de sacarose: A) 0 gL^{-1}; B) 0,9 gL^{-1}; C) 5,0 gL^{-1}; D) 15,0 gL^{-1}; E) 29,1 gL^{-1}.....123
Figura 2.7 - Consumo de xilose (◆) e sacarose (x), crescimento celular (▲), produção de xilitol (■) e etanol (●) por *C. tropicalis* em cultivo no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana com adição parcelada de sacarose e diferentes valores de K_La: A) 6,5 h^{-1}; B) 15 h^{-1}; C) 5 h^{-1} e sem adição parcelada de sacarose.....126
Figura 2.8 - Gráfico de Pareto para a significância dos efeitos das variáveis melaço de cana e suplementação nutricional convencional no: A) consumo de xilose; B) fator de conversão de xilose em xilitol; C) produtividade volumétrica de xilitol. 132

(Capítulo 3)

Figura 3.1 - Modificações genéticas propostas* em *C. tropicalis* para melhoria da bioconversão de xilose em xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana suplementado com sacarose. 136
Figura 3.2 - Esquema das atividades para construção de uma cepa de *C. tropicalis* com auxotrofia para uridina.....138
Figura 3.3 - Esquema da construção do cassete de deleção cURA3 e transformação de *C. tropicalis* 151
Figura 3.4 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) para análise da qualidade do DNA genômico extraído de *C. tropicalis.* 152
Figura 3.5 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) mostrando os produtos de PCR correspondentes à amplificação das regiões flanqueadoras do gene *ura3* de *C. tropicalis* e do cassete cURA3.....152
Figura 3.6 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do PCR para verificação da presença do gene *ura3* em em cepas transformantes de *C. tropicalis*. 154
Figura 3.7 - Esquema da transformação de *C. tropicalis* para deleção do gene *ura3* e super expressão da XR com o cassete pXR. 157
Figura 3.8 - Esquema da construção do cassete pXR por montagem sequencial dos fragmentos.....158
Figura 3.9 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos fragmentos e montagens sequenciais para construção do cassete de deleção pXR.....159
Figura 3.10 - Verificação genotípica da transformação da cepa 1 de *C. tropicalis* para deleção do segundo alelo do gene *ura3* e inserção da construção pGAPDH-*xyl1*. 161
Figura 3.11 - Verificação genotípica da segunda transformação da cepa 1 de *C. tropicalis* e da cepa selvagem (A1) para deleção do gene *ura3* e inserção da construção pGAPDH-*xyl1*. 164
Figura 3.12 - Esquema da estratégia para deleção sequencial dos alelos do gene *ura3* e super expressão da G6PDH e da XR. 167
Figura 3.13 - Esquema da construção do cassete pZWF por montagem sequencial dos fragmentos.....168
Figura 3.14 - Caminhos avaliados para a construção do cassete pZWF.....169
Figura 3.15 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos fragmentos e montagens sequenciais para construção do cassete de deleção pZWF.....170

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados obtidos a partir da aplicação de estratégias de engenharia metabólica para melhoria da bioconversão de xilose em xilitol.....51

(Capítulo 1)

Tabela 1.1 - Composição química estrutural da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar *in natura* e após hidrólise ácida diluída 83
Tabela 1.2 - Comparação da composição química estrutural da mistura de bagaço e palha de cana-de-acúcar com outras biomassas lignocelulósicas. 84
Tabela 1.3 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar após hidrólise ácida diluída, concentração à vácuo (FC=6), destoxificação e formulação do meio de fermentação. 86
Tabela 1.4 - Composição química parcial do melaço de cana-de-açúcar..... 93

(Capítulo 2)

Tabela 2.1 - Níveis codificados e reais dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose avaliados no Delineamento Composto Central Rotacional..... 98
Tabela 2.2 – Níveis codificados e reais dos fatores melaço de cana e suplementação nutricional de referência avaliados no planejamento fatorial completo 2^2. 101
Tabela 2.3 - Consumo de xilose e sacarose, produção de xilitol e crescimento celular de *C. tropicalis*, cultivada durante 72 h no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana, sob diferentes condições de K_La e de concentração inicial de sacarose. 106
Tabela 2.4 - Teste ANOVA para o modelo quadrático composto para os efeitos do K_La e concentração inicial de sacarose no consumo de xilose 110
Tabela 2.5 - Teste ANOVA para o modelo quadrático composto para os efeitos do K_La e concentração inicial de sacarose no fator de conversão de xilose em xilitol. 111
Tabela 2.6 - Teste ANOVA para o modelo quadrático composto para os efeitos do K_La e concentração inicial de sacarose na produtividade volumétrica de xilitol..... 112
Tabela 2.7 - Teste ANOVA para o modelo quadrático composto para os efeitos do K_La e concentração de sacarose sobre o crescimento celular. 112
Tabela 2.8 - Maximização do fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica de xilitol através da otimização do K_La e da concentração de sacarose... 117
Tabela 2.9 - Parâmetros fermentativos principais obtidos nos experimentos com K_La 15 h^{-1} e diferentes concentrações iniciais de sacarose. 122
Tabela 2.10 - Consumo de xilose, produção de xilitol e crescimento celular de *C. tropicalis* sob diferentes condições de adição de melaço de cana e suplementação nutricional .. 130

(Capítulo 3)

Tabela 3.1 - Sequências iniciadoras utilizadas no presente trabalho. 141
Tabela 3.2 - Parâmetros para preparo das reações de PCR e condições de operação..... 143
Tabela 3.3 - Avaliação do crescimento de *C. tropicalis* em ágar YPD adicionado com concentrações crescentes de 5-FOA durante cultivo por 144h. 149
Tabela 3.4 - Verificação fenotípica das cepas transformantes para deleção do gene *ura3* e comparação com a cepa selvagem de *C. tropicalis* 155

Tabela 3.5 - Possíveis causas para resultados não satisfatórios de transformação de *C. tropicalis* para deleção do gene *ura3* e ações adotadas para contorna-las. 165

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
CIM	Concentração Mínimo Inibitória
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cURA3	Cassete de deleção do gene *ura3*
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EEL/USP	Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	Fator de Concentração
gDNA	Ácido Desoxirribonucleico genômico
G6PDH	Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
GMBIO	Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos
GRAS	*Generally Recognized As Safe*
ICP-AES	Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente
ITS	*Internal Transcribed Spacer*
K_La	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
LiAc	Acetato de Lítio
NAD^+	Nicotinamida Adenina Dinucleotido Oxidada
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotido Reduzida
$NADP^+$	Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato Oxidada
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato Reduzida
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NHEJ	*Non-Homologous End Joining*
NREL	*National Renewable Energy Laboratory*
NTG	Nitrosoguanidina
OMP	Orotidina-5'-Fosfato Descarboxilase
pGAPDH	Promotor da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PGI	Fosfoglicoisomerase
PPP	Vias das Pentoses Fosfato
pXR	Cassete de deleção do gene *ura3* e super expressão do gene *xyl1* (primeira estratégia)
pXYL1	Cassete de deleção do gene *ura3* e super expressão do gene *xyl1* (segunda estratégia)
pZWF	cassete de deleção do gene *ura3 e super expressão do gene zwf*
Q_P	Produtividade Volumétrica de Xilitol
RM	Rendimento Mássico
RNA	Ácido Ribonucleico
r_S	Velocidade Volumétrica de Consumo de Xilose
r_{Sac}	Velocidade Volumétrica de Consumo de Sacarose

RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase de Tempo Real
r_X	Velocidade Volumétrica de Crescimento Celular
STR	*Stirred Tank Reactor*
US-DOE	*United States – Department of Energy*
USFDA	*United States - Food and Drug Administration*
UV	Ultravioleta
XR	Xilose Redutase
XDH	Xilitol Desidrogenase
YNB	*Yeast Nitrogen Base*
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de xilose em xilitol
5-FOA	Ácido 5-Fluoro-Orótico
5-HMF	5-Hidroximetilfurfural
6PGDH	6-Fosfogluconato Desidrogenase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **19**
2 REVISÃO DA LITERATURA **21**
2.1 Economia baseada em biomassa vegetal **21**
2.2 Biomassa de cana-de-açúcar **23**
2.3 Xilitol **28**
2.3.1 Propriedades 28
2.3.2 Mercado 29
2.3.3 Produção de xilitol 30
2.3.4 Integração da produção de xilitol em uma biorrefinaria 32
2.4 Produção biotecnológica de xilitol **34**
2.4.1 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico rico em xilose 35
2.4.2 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico 36
2.4.3 Fermentação do hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol 40
2.4.4 Recuperação do xilitol 43
2.5 Bioconversão de xilose em xilitol **44**
2.5.1 Co-substratos na produção biotecnológica de xilitol 48
2.6 Engenharia metabólica para melhoria da bioconversão de xilose em xilitol **50**
2.6.1 Redução da expressão ou atividade da enzima XDH 52
2.6.2 Aumento da expressão da enzima XR. 52
2.6.3 Aumento da disponibilidade do cofator NADPH 53
2.6.4 Expressão heteróloga de transportadores de xilose 54
2.7 Técnicas moleculares para engenharia da via metabólica **55**
2.7.1 Construção e integração do cassete de expressão ou deleção 55
2.7.2 Marcas de seleção 58
2.7.3 Ferramentas para controle da expressão e edição gênica 62
2.7.4 Técnicas para transformação da levedura 65
2.8 *Candida tropicalis* **67**
3 OBJETIVOS **70**
3.1 Objetivo geral **70**
3.2 Objetivos específicos **70**
Capítulo 1 - Obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana de açúcar. **72**
1.1 Introdução **72**
1.2 Material e métodos **73**
1.2.1 Caracterização química da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar 73
1.2.2 Obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana 77
1.2.3 Caracterização do melaço de cana-de-açúcar 78
1.2.4 Métodos analíticos 78
1.3 Resultados e discussão **82**
1.3.1 Caracterização química estrutural da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar 83
1.3.2 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar 86
1.3.3 Caracterização do melaço de cana-de-açúcar 92
1.4 Conclusão **94**
Capítulo 2 – Estudo da otimização de condições de cultivo e aproveitamento do melaço de cana como suplemento nutricional **96**
2.1 Introdução **96**
2.2 Material e métodos **98**
2.2.1 Otimização dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose para maximização da produção de xilitol por C. tropicalis 98

2.2.2 Avaliação preliminar do melaço de cana como suplemento nutricional do meio de fermentação 101
2.2.3 Análise estatística....102
2.2.4 Métodos analíticos....102
2.3 Resultados e discussão....105
2.3.1 Otimização dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose para maximização da produção de xilitol por C. tropicalis....105
2.3.2 Efeito da sacarose como co-substrato na produção de xilitol por C. tropicalis....121
2.3.3 Avaliação preliminar do melaço de cana como suplemento nutricional do meio de fermentação 129
2.4 Conclusão 133
Capítulo 3 – Estudo da transformação genética DE *Candida tropicalis* para engenharia da via metabólica de produção de xilitol....135
3.1 Introdução....135
3.2 Material e métodos....137
3.2.1. Construção de uma cepa de C. tropicalis com auxotrofia para uridina, susceptível de transformação 137
3.2.2. Super expressão da enzima xilose redutase (XR)....148
3.2.3. Super expressão da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)....149
3.3. Resultados e discussão....149
3.3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do 5-FOA....149
3.3.2 Deleção do gene ura3 150
3.3.3 Deleção do segundo alelo do gene ura3 e super expressão da XR....157
3.3.4. Deleção sequencial dos alelos do gene ura3 e super expressão da G6PDH e XR....166
3.4 Conclusão 171
4 CONCLUSÕES GERAIS 173
5 sugestões para trabalhos futuros 175
REFERÊNCIAS....176

1 INTRODUÇÃO

A utilização extensiva de recursos fósseis como base da economia industrializada vem gerando importantes conflitos sociais, políticos e econômicos, aliado a graves impactos ambientais. Como resposta a esta desafiante realidade, esforços investigativos vêm-se desenvolvendo a nível global para reduzir o consumo de recursos fósseis e diversificar a matriz energética. Uma das estratégias mais promissoras para isto é a obtenção de bioenergia e produtos de alto valor agregado a partir do aproveitamento como matéria-prima de biomassas vegetais residuais ou subutilizadas. Uma economia baseada em biomassa vegetal com potencial para substituir a atual dependente de recursos fósseis se sustenta na implementação de biorrefinarias. Este conceito envolve a utilização integral da biomassa vegetal, isto é de todas suas frações constituintes, mediante a conversão por via termoquímica e/ou bioquímica destas para obtenção de um amplo portfólio de produtos na mesma unidade. Destaca-se a importância da obtenção de compostos de alto valor agregado, os quais suportariam a rentabilidade das biorrefinarias com produção integrada de bioenergia de baixo valor e alto volume.

Salienta-se o potencial da agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil, uma das culturas mais tradicionais e de maior importância econômica no país, para diversificar seu portfólio de produtos no contexto de biorrefinaria. O sistema produtivo já existente para obtenção de açúcar, etanol e energia pode ser integrado com processos de produção de compostos de maior valor agregado, a partir da utilização conjunta dos subprodutos lignocelulósicos, bagaço e palha, e ainda com o aproveitamento de outros subprodutos, a exemplo do melaço, que é um substrato complexo rica em carboidratos, compostos nitrogenados e minerais. Neste contexto, salienta-se o xilitol, que é um poliol reconhecido com um dos químicos de alto valor que pode suportar a rentabilidade de uma biorrefinaria, em função de sua crescente participação no mercado mundial de adoçantes, devido às suas importantes aplicações na indústria alimentícia, odontológica e farmacêutica.

A rota biotecnológica de produção de xilitol, baseada na conversão microbiana da xilose proveniente da fração hemicelulósica de biomassas vegetais, apresenta-se como uma alternativa para substituir a atual obtenção comercial por via química, a qual tem desvantagens econômicas e ambientais. Para tanto, desafios ainda precisam ser superados para viabilizar o escalonamento deste bioprocesso a nível comercial de forma rentável e sustentável. É importante destacar que pesquisas recentes ressaltaram que a integração deste

bioprocesso em biorrefinaria pode contribuir para sua viabilidade técnica e econômica, a partir da re-utilização e/ou reciclagem de materiais, otimização de fluxos de energia e intensificação de processos. Dentre os principais gargalos a serem ainda contornados, destaca-se que a obtenção concomitante de valores altos de bioconversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica continua sendo um desafio, apesar da ampla pesquisa e importantes progressos obtidos neste bioprocesso, particularmente no Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBIO) da EEL/USP a partir de diversas biomassas vegetais, principalmente o bagaço de cana. Nestas pesquisas foi utilizada como modelo a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 por sua alta capacidade de conversão de xilose em xilitol. No entanto, é importante mencionar que uma pesquisa recente, realizada em cooperação com o presente trabalho, demonstrou que esta linhagem corresponde verdadeiramente à espécie *Candida tropicalis* (QUEIROZ, 2019). Destaca-se também que não foram encontrados reportes na literatura de utilização dos três subprodutos do setor sucroalcooleiro (bagaço, palha e melaço) no processo de produção biotecnológica de xilitol.

Nesse contexto, esta pesquisa teve como principal objetivo contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de produção biotecnológica de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico obtido da mistura de bagaço e palha de cana, com aproveitamento do melaço como suplemento nutricional. No presente trabalho foram estudadas a otimização de condições de cultivo em fermentador de bancada e estratégias de engenharia da via metabólica para melhoria do desempenho fermentativo de *C. tropicalis*. Os resultados desta pesquisa podem contribuir para a potencial integração deste bioprocesso em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar, a partir da introdução de estratégias não exploradas previamente relacionadas com condições críticas do cultivo e a capacidade metabólica da levedura.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura apresenta uma contextualização breve sobre a economia baseada em biomassa vegetal e biorrefinarias, área na qual se insere a presente pesquisa, seguida por uma abordagem detalhada da produção biotecnológica de xilitol, centrada principalmente nos importantes avanços obtidos pelo GMBIO da EEL/USP. A seguir, aspectos particulares da bioconversão de xilose em xilitol são revisados, os quais são importantes para o desenvolvimento e discussão das estratégias estudadas no presente trabalho, especialmente no que se refere ao emprego de co-substratos e engenharia metabólica para melhoria deste bioprocesso.

Salienta-se que os conteúdos contemplados quanto à produção biotecnológica de xilitol foram base para o artigo de revisão intitulado *"Xylitol bioproduction: state-of-the-art, industrial paradigma shift, and opportunities for integrated biorefineries"* (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2019a), publicado na revista *Critical Reviews in Biotechnology*. Adicionalmente, são abordadas técnicas moleculares para engenharia da via metabólica, com o intuito de dar suporte aos métodos empregados no presente projeto, e ainda uma contextualização sobre a levedura empregada como agente fermentativo, a *Candida tropicalis*.

2.1 Economia baseada em biomassa vegetal

A economia global é altamente dependente da utilização intensiva de recursos fósseis, uma vez que a principal fonte energética mundial é o petróleo, principalmente no setor de transportes, e que a maioria de produtos químicos são obtidos ou derivados de refinarias de petróleo (CHERUBINI, 2010). O consumo de recursos fósseis é considerado não sustentável, associado com mudanças climáticas, e base de conflitos políticos e econômicos relacionados com a segurança energética, alimentícia e de fornecimento de água (VANHOLME et al., 2013; COK et al., 2014; PHILP, 2015). Estes problemas são fortes incentivos para a transição da atual economia baseada em combustíveis fósseis para uma "bioeconomia", a qual corresponde a um sistema econômico baseado na exploração e manipulação sustentável de recursos biológicos (HESS et al., 2016; AGUILAR et al., 2018).

Espera-se que os produtos e serviços baseados em recursos biológicos substituam progressivamente os combustíveis fósseis e materiais derivados e consequentemente

contribuam a diminuir o dano ambiental (AGUILAR et al., 2018; SASSON; MALPICA, 2018). Neste contexto, destaca-se os produtos e serviços derivados do aproveitamento da biomassa vegetal como matéria-prima (COK et al., 2014; PHILP, 2015). A biomassa vegetal tem a característica única entre todas as fontes energéticas de fornecer intermediários energéticos em forma sólida, líquida e gasosa, os quais podem ser transformados em produtos análogos aos atualmente produzidos a partir de combustíveis fósseis (RUEDA et al., 2015; SOUZA et al., 2015). Adicionalmente, a utilização da biomassa vegetal como matéria-prima é incentivo para a formação de valor em áreas rurais, independência energética, diversificação da economia e criação de empregos, bem como a redução da pressão geopolítica associada à distribuição desigual de recursos fósseis (BUDZIANOWSKY; POSTAWA, 2016; BUDZIANOWSKY, 2017; AGUILAR et al., 2018).

A sustentabilidade da emergente economia baseada em biomassa vegetal é dependente do desenvolvimento de biorrefinarias, as quais permitem a otimização dos fluxos de energia e material para gerar multiples produtos, reciclar ou reusar subprodutos e minimizar a formação de resíduos (COK et al., 2014; GOLEMBIEWSKY et al., 2016). Para tanto, são requeridas tecnologias sustentáveis para o aproveitamento integral de recursos renováveis derivados de biomassas vegetais através de seu fracionamento em seus blocos constituintes e a conversão destes em bioenergia e bioprodutos comercializáveis (CHERUBINI, 2010; VANHOLME et al., 2013; RENÓ et al., 2014; BUDZIANOWSKY, 2017).

A produção de bioenergia, a qual envolve biocombustíveis de baixo valor e grande volume como bioetanol, biodiesel, bioeletricidade e calor, têm como finalidade diversificar a matriz energética, reduzir a dependência de fontes fósseis e incrementar a segurança no fornecimento energético, bem como assegurar a autonomia energética das unidades de produção (BOZELL, 2008; MENON; RAO, 2012; BUDZIANOWSKY, 2017). Por outro lado, a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado e baixo volume permitiria tanto valorizar a matéria-prima e favorecer a rentabilidade do sistema por suportar o custo de produção de bioenergia de baixo valor, quanto estabelecer bioprocessos inovadores e/ou que pudessem substituir processos químicos convencionais mais custosos e/ou com maior impacto ambiental (BOZELL, 2008; MENON; RAO, 2012).

É importante considerar que, segundo Budzianowsky (2017), as biorrefinarias no futuro provavelmente processarão vários tipos de biomassa vegetal, em função de seu custo,

abundância e disponibilidade, e produzirão uma ampla variedade de bioprodutos. Neste sentido, este autor sugeriu que não todos os bioprodutos são apropriados para biorrefinarias, uma vez que deveriam satisfazer requisitos básicos como viabilidade de produção em grande escala e alto grau de acoplamento entre os processos de obtenção do bioproduto e bioenergia. Além disto, Budzianowsky (2017) indicou outros critérios para a seleção dos bioprodutos, como custo da biomassa e de seu processamento, atual e futuro valor no mercado, capacidade de mercado e características técnicas coerentes com a demanda do mercado. Em função da ampla variedade de produtos que poderiam ser obtidos, espera-se que as biorrefinarias possam participar em diversos setores de negócios e contribuir com necessidades sociais, substituindo progressivamente as refinarias convencionais de recursos fósseis e se inserindo em setores energéticos, químicos, nutricionais, entre outros (BUDZIANOWSKY; POSTAWA, 2016).

Segundo Budzianowsky e Postawa (2016), a viabilidade econômica e sustentabilidade ambiental das biorrefinarias são dependentes de diversos fatores como:

a) a utilização industrial da biomassa, no que se refere às dinâmicas e custos de obtenção, armazenamento e transporte desta, bem como a flexibilidade no uso de diversos materiais;
b) a intensificação e integração dos processos existentes na própria unidade e/ou com os de outras indústrias, visando o uso eficiente da energia e materiais, e a minimização de resíduos e emissões;
c) o mercado dos bioprodutos obtidos, quanto à volatilidade da oferta e demanda e as logísticas de distribuição;
d) as características socioeconômicas regionais, considerando que o tamanho das biorrefinarias sua localização depende da disponibilidade de matéria-prima;
e) competição com sistemas produtivos convencionais e políticas para estímulo das biorrefinarias e da bioeconomia.

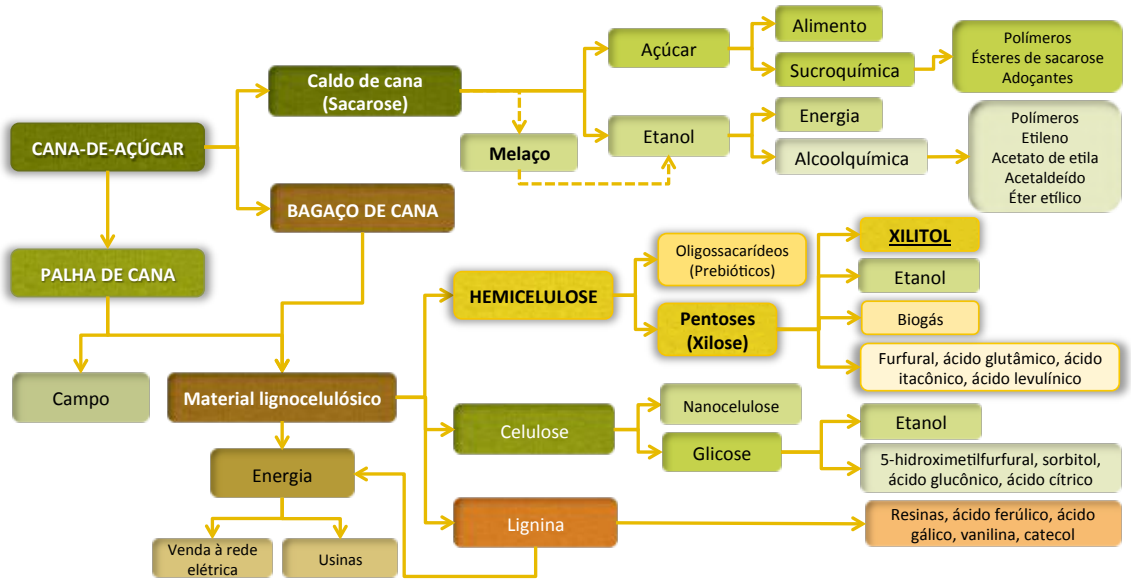
2.2 Biomassa de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é considerada como uma das matérias-primas para biorrefinaria mais competitivas em comparação com outras culturas (LONG et al., 2015). Esta é uma das culturas tradicionais de maior importância na economia do Brasil (RENÓ et al., 2014; PIMENTEL et al., 2019), que é o maior produtor de cana a nível mundial segundo dados da

Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura até 2013 (FAO, 2017). Estima-se que a produção de cana para a safra 2019/2020 será de 615,98 milhões de toneladas a partir de uma área colhida de 8,38 milhões de hectares, correspondentes a reduções de 0,7% e 2,4%, respectivamente, comparado com a safra 2018/2019 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019). Além disto, contribui para o fornecimento de aproximadamente 17,5% da oferta de energia primária no Brasil (LONG et al., 2015). Na última década a área plantada de cana-de-açúcar se estendeu 46% no Brasil para atender a demanda crescente por biocombustíveis (VARANDA; CHERUBIN; CERRI, 2019).

Considera-se que um terço do conteúdo energético total da cana corresponde ao caldo, enquanto que os dois terços restantes correspondem aos subprodutos lignocelulósicos, bagaço e palha, cada um equivalente a aproximadamente 14 % da massa colhida de cana (em base seca) (PIPPO et al., 2011; RENÓ et al., 2014; LONG et al., 2015). O caldo, o bagaço e parcialmente a palha são aproveitados no setor sucroalcooleiro para obtenção de açúcar, etanol de primeira geração, energia e outros produtos derivados, o que permite considerar a agroindústria da cana-de-açúcar como um modelo de biorrefinaria de primeira geração (LAGO et al., 2012, RENÓ et al., 2014). Entretanto, existem opções para aumentar a diversificação e valorização desta agroindústria dentro do conceito de biorrefinaria a partir da melhor utilização dos subprodutos lignocelulósicos em processos eficientes e sustentáveis de conversão que possam ser acoplados aos já existentes, conforme apresentado na Figura 1 (LAGO et al., 2012; RENÓ et al., 2014). Neste contexto, a melhor utilização dos subprodutos lignocelulósicos, bagaço e palha, significa não só o aproveitamento integral das frações poliméricas constituintes destes, mas também a possibilidade de utilização conjunta destes materiais como uma biomassa lignocelulósica única (LAGO et al., 2012; RENÓ et al., 2014).

Figura 1 - Possíveis produtos a serem obtidos em uma biorrefinaria conceitual de cana-de-açúcar com aproveitamento integral de bagaço e palha de cana.



Fonte: Baseado em Werpy e Peterson (2004) e Lago et al. (2012).

O bagaço de cana, subproduto lignocelulósico gerado durante a moenda da cana-de-açúcar, é aproveitado nas usinas como combustível no processo de cogeração de energia, permitindo atingir a autossuficiência energética destas e gerar um excedente de eletricidade para ser vendido à rede (HOFTSETZ; SILVA, 2012). O bagaço apresenta ainda outros usos como forragem, alimentação animal e produção de papel (COSTA; BOCCHI, 2012). Considerando a produção de cana estimada para a safra 2019/2020 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019), seriam produzidas 86,24 milhões de toneladas de bagaço (em massa seca). Quanto a composição estrutural, o bagaço contem aproximadamente 41 – 50% de celulose, 25 – 31% de hemicelulose e 20 – 23% de lignina (SARROUH; BRANCO; SILVA, 2009; FERREIRA-LEITÃO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010; ARRUDA, 2011; BRANCO; SANTOS; SILVA, 2011). Em função da existência de um volume excedente ao utilizado diretamente nas usinas, este tem sido uma das biomassas lignocelulósicas mais usadas nas pesquisas em bioprocessos como potencial matéria-prima para produção de etanol de segunda geração e químicos (CHANDEL et al., 2012; LAGO et al., 2012). Particularmente, destaca-se que a utilização da fração hemicelulósica do bagaço de cana para a produção de xilitol vem sendo amplamente investigada (CHANDEL et al., 2012; SILVA; CHANDEL, 2012).

Por outro lado, a palha de cana, correspondente às pontas, folhas secas e verdes da planta, tem sua disponibilidade aumentada a partir da introdução progressiva da colheita sem

queima no Brasil, a qual visa o melhoramento da sustentabilidade da cultura (LEAL et al., 2013; CARVALHO et al., 2016). A colheita mecanizada da cana acarreta o depósito de grandes quantidades de palha no solo, entre 7 e 25 toneladas/ha de matéria seca com uma proporção C:N de aproximadamente 100:1, o que representa uma relação de 9 a 30% entre a palha gerada e o colmo colhido, e umidade entre 30-60% (PIPPO et al., 2011; LEAL et al., 2013; CARVALHO et al., 2016). A produção de palha depende principalmente da variedade de cana, estádio vegetativo, condições edafoclimáticas e práticas de manejo (CARVALHO et al., 2016).

Menandro et al. (2017) caracterizaram a produção de palha de cana em várias regiões do Brasil com diferenças nas condições edafoclimáticas, encontrando uma produção média de 14 toneladas/ha (matéria seca), correspondente a 5,6 toneladas/ha de pontas verdes (40%) e 8,4 toneladas/ha de folhas secas (60%), e uma relação de 10-14% entre palha e o colmo colhido. Quando comparadas as pontas verdes com as folhas secas, estes autores encontraram que as pontas verdes tinham maior umidade (68% e 11%, respectivamente), maior conteúdo de N, P, K, S, Cu e Cl, menor conteúdo de C e Mg, menor relação C:N (52:1 e 130:1, respectivamente), e maior conteúdo de extrativos (67% e 33%, respectivamente),. Já as proporções de cinzas (média de 4,6% na palha), celulose (32-37%), hemicelulose (27-29%) e lignina (19-22%) foram similares entre as pontas verdes e as folhas secas (MENANDRO et al., 2017).

A manutenção de uma porção da palha no campo é alvo de estudo em função dos impactos positivos e negativos que pode causar na cultura da cana, os quais estão associados principalmente à produtividade desta cultura, reciclagem de nutrientes, administração de fertilizantes, armazenamento de água, controle de doenças, erosão do solo e dinâmica da matéria orgânica, dependendo das características de cada área (PIPPO et al., 2011; LEAL et al., 2013; CARVALHO et al., 2016; VARANDA; CHERUBIN; CERRI, 2019). Segundo a revisão feita por Carvalho et al. (2016) a este respeito, embora a quantidade apropriada de palha a ser mantida no campo é sítio-específica, a maioria dos benefícios agronômicos e ambientais poderiam ser atingidos deixando no mínimo 7 toneladas/ha de matéria seca na superfície do solo. Por sua vez, Castioni et al. (2018) concluíram que a manutenção de aproximadamente 10 toneladas/ha de palha poderia ser suficiente para garantir a sustentabilidade da produção de bioenergia no Brasil sem afetar significativamente a qualidade física e biológica do solo. De maneira similar, o estudo de Lisboa et al. (2019) corroborou que o efeito a curto prazo da remoção da palha dependia do tipo de solo, mas

que em geral a remoção de 50% da palha incrementaria a biomassa disponível nas usinas sem reduzir a qualidade do solo.

A decisão quanto à proporção de palha mantida no campo reflete na possibilidade de utilização desta biomassa como matéria-prima em processos de conversão e de sua incorporação em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar (LAGO et al., 2012; LEAL et al., 2013; LISBOA et al., 2019). Considerando a produção estimada de cana para a safra 2019/2020 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019) e a quantidade mínima de palha que deveria ser deixada no campo (7 toneladas/ha) (CARVALHO et al., 2016), aproximadamente 27,58 milhões de toneladas desta biomassa (massa seca) estariam disponíveis para serem usadas como matéria-prima, correspondente a aproximadamente 32% da quantidade total de palha que seria produzida.

Entretanto, poucas são ainda as pesquisas para o aproveitamento da palha de cana, diferente do bagaço, conforme indicado anteriormente (CHANDEL et al., 2012; LAGO et al., 2012; SILVA; CHANDEL, 2012). As principais rotas que já foram sugeridas para o aproveitamento da palha é sua utilização junto ao bagaço como matéria-prima na obtenção de energia por combustão direta nas caldeiras (SEABRA et al., 2010; PIPPO et al., 2011; LEAL et al., 2013) e de etanol de segunda geração (KRISHNAN et al., 2010; SILVA et al., 2010; DIAS et al., 2013), cujas pesquisas são concentradas em grande parte na fração celulósica destes subprodutos lignocelulósicos.

Entretanto, no contexto de biorrefinaria se requer a utilização integral dos materiais lignocelulósicos, o que significa o aproveitamento de suas frações constituintes celulose, hemicelulose e lignina (MENON; RAO, 2012). Poucos são os estudos quanto à utilização da fração hemicelulósica da palha de cana, os quais foram focados principalmente nas tecnologias para a solubilização deste polissacarídeo, como o pré-tratamento por hidrólise ácida diluída (MOUTTA et al., 2012), e na avaliação da produção de etanol a partir de estudos de co-fermentação de glicose e xilose (KRISHNAN et al., 2010). No entanto, recentes pesquisas apontam para o potencial da palha de cana como matéria-prima para a produção biotecnológica de xilitol (HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016), similar ao já constatado para o bagaço de cana (ARRUDA et al., 2017). Destaca-se que não foram encontrados estudos de produção biotecnológica de xilitol a partir de mistura de bagaço e palha de cana.

2.3 Xilitol

2.3.1 Propriedades

O xilitol é um pentitol com fórmula química $C_5H_{12}O_5$ e massa molar 152,2 g mol^{-1} (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998; MUSSATTO, 2012). O xilitol puro é um pó branco cristalino que tem aparência e sabor similar ao da sacarose, solubilidade em temperatura ambiente similar à da sacarose e maior em temperaturas elevadas, e alta estabilidade química e microbiológica (MUSSATTO, 2012). O alto valor comercial do xilitol é devido às suas importantes aplicações como insumo nas indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica, e ainda como base na síntese de outros compostos químicos de alto valor (FELIPE, 2004; MUSSATO, 2012; SILVA; CHANDEL, 2012). O interesse científico e comercial neste poliol está baseado nas seguintes propriedades particulares (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998; MUSSATTO, 2012; ARCAÑO et al., 2018):

a) poder adoçante similar ao da sacarose com um conteúdo calórico 40% menor;
b) metabolismo independente da insulina (por absorção direta no fígado, ou indiretamente através de bactérias intestinais), e não contribui com mudanças grandes e rápidas no nível de glicose e insulina no sangue, comparado com a sacarose ou glicose, motivos pelos quais é altamente recomendado como substituto da sacarose em pessoas diabéticas. Adicionalmente, pode contribuir para evitar problemas como hiperglicemia, distúrbios no metabolismo de lipídeos e sintomas como sede e fome excessiva;
c) propriedades anticariogênicas, correspondentes tanto à capacidade para inibir o crescimento da flora bacteriana oral (principalmente do gênero *Streptococcus*), reduzindo a formação da placa dentária, quanto ao favorecimento da remineralização de lesões de cáries pela estimulação do fluxo de saliva sem diminuição do pH e pela estabilização de íons fosfatos;
d) pode ser usado como agente terapêutico em pacientes com anemia hemolítica causada pela deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), já que esta enzima não é necessária para seu metabolismo, somado a que sua oxidação a xilulose pode suprir Nicotinamida Adenina Dinucleotido Fosfato reduzida (NADPH) para a célula;

e) pode contribuir no tratamento de infecções respiratórias por inibir o crescimento de bactérias causadoras destas doenças, como *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pneumoniae e Haemophilus influenzae*; bem como usado como adjuvante no tratamento de dermatite atópica, pois já foi demonstrado que pode inibir a formação de glicocálix de *S. aureus*;
f) pode ser útil na prevenção de osteoporose, já que favorece a absorção de cálcio no intestino e seu incremento nos ossos;
g) o xilitol pode ser usado como plataforma para a produção de ácido xilárico, polietileno glicol, etilenoglicol, hidroxil furano e 1,2-propanediol. Neste sentido, o xilitol poderia ser considerado importante intermediário em processos de produção de resinas poliéster, engarrafamento PET, fluidos hidráulicos, pinturas e revestimentos, e transferência de calor.

2.3.2 Mercado

O mercado global do xilitol foi estimado em aproximadamente 190.900 toneladas métricas em 2016, que corresponde a 823,6 milhões USD, e se espera atingir 266.500 toneladas métricas e 1,15 bilhão USD em 2023, equivalente a crescimento anual em volume e valor de aproximadamente 5,7% (ARCAÑO et al., 2018; RESEARCH AND MARKETS, 2018). Segundo Grand View Research (2017), o mercado do xilitol atingiria 1,37 bilhões USD em 2025. De acordo com Fractovia Market and Trending News (2016), espera-se um crescimento substancial do mercado do xilitol no Brasil entre 2016 e 2023 em função do aumento progressivo da consciência do consumidor quanto os benefícios deste na saúde e incrementos no ingresso *per capita*.

Ravella et al. (2012) indicaram que o valor do xilitol era de 4,5 – 5,5 USD/kg para compra por atacado por companhias alimentícias ou farmacêuticas, e de 20 USD/kg para compra em supermercados. A *U.S. Food and Drug Administration* (USFDA) concedeu o status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) ao xilitol para seu uso em alimentos e bebidas, o que pode favorecer seu crescimento industrial (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2016). Ao mesmo tempo, a utilidade do xilitol como plataforma para produção de outros compostos químicos torna ele um potencial substituto de baixo custo de petroquímicos, o que teria um impacto positivo no seu mercado global (GRAND VIEW RESEARCH, 2014).

Aproximadamente 50% da produção mundial de xilitol ocorre na Ásia (que é também o principal consumidor), o restante corresponde a Europa, Estados Unidos e Austrália, destacando-se empresas como DuPont Danisco, Roquette Freres, Shadong Futaste, Cargill, Ingredion and some Chinese companies (RAVELLA et al., 2012). A produção de xilitol em Europa e China depende principalmente do uso de sabugo de milho e madeiras duras, como bétula (*birch*), como matérias-primas (RAVELLA et al., 2012; ALBUQUERQUE et al., 2014). A este respeito, ressalta-se DuPont Danisco por sua produção de xilitol (*Xylitol XIVIA*) por catálise a partir da xilose presente em efluentes residuais dos processos de papel e polpa (RAVELLA et al., 2012). A indústria de goma de mascar representa o maior consumidor de xilitol, correspondente a 80% em 2010 e previsto para ser aproximadamente 67% em 2020, destacando-se as empresas Gross e Wrigley por utilizar unicamente xilitol para a produção de chicletes sem açúcar (RAO et al., 2016).

2.3.3 Produção de xilitol

Atualmente, a produção em escala industrial do xilitol está baseada na hidrogenação catalítica da xilose purificada de hidrolisados hemicelulósicos (SILVA; CHANDEL, 2012; CANILHA et al., 2013; ARCAÑO et al., 2018). O processo é fundamentado no processo patenteado por Melaja e Hämäläinen em 1977 e consiste nas seguintes etapas (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998; RAVELLA et al., 2012; CANILHA et al., 2013):

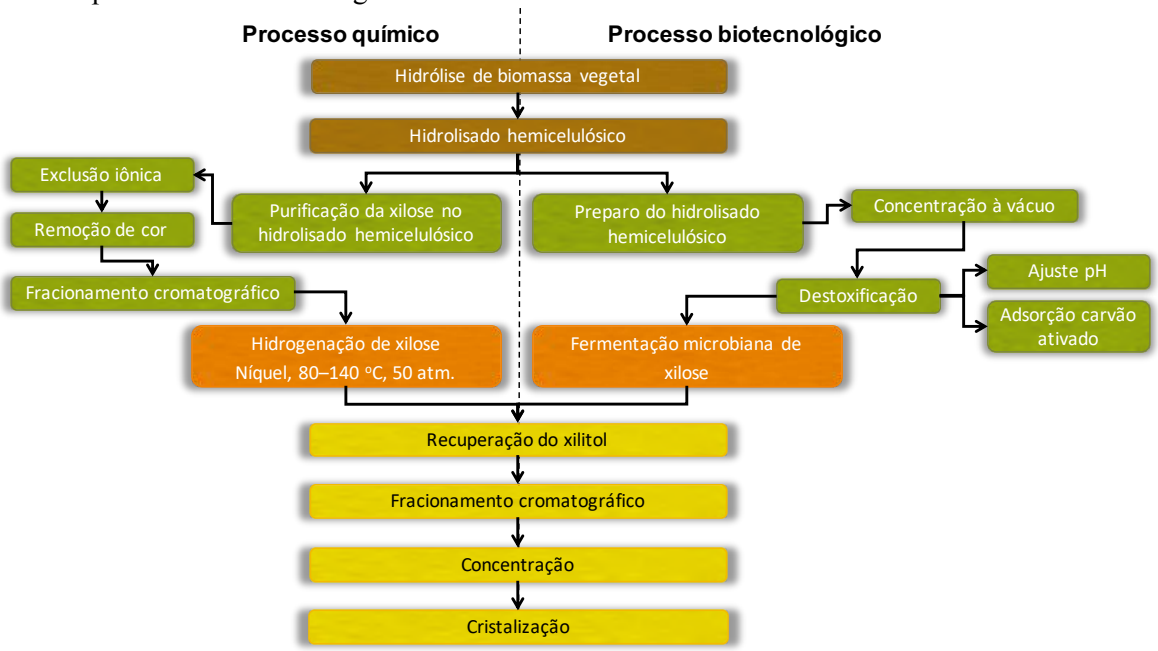
a) hidrólise do material vegetal;
b) purificação do hidrolisado hemicelulósico por exclusão iônica, remoção de cor e fracionamento cromatográfico, com a finalidade de prover uma solução com alta concentração de xilose;
c) hidrogenação catalítica da xilose para produzir uma solução rica em xilitol, usando um catalisador metálico (geralmente níquel tipo Raney), temperatura de 80–140 ºC e pressão de hidrogênio até 50 atm.;
d) recuperação do xilitol por fracionamento cromatográfico usando resinas de intercambio iônico, concentração e cristalização.

A eficiência de conversão do processo químico de obtenção de xilitol pode ser estimada a partir da matéria-prima em 8-15%, a partir da xilana em 50-60% e a partir da

xilose pura em aproximadamente 98% (ARCAÑO et al., 2018). Apesar do alto rendimento a partir de xilose pura, este processo é considerado ineficiente, custoso, não favorável ao ambiente e altamente consumidor de energia, devido à complexidade do procedimento de purificação da xilose (80% do custo total do processo), à necessidade de altas temperaturas e pressões para a conversão da xilose, e aos altos custos de recuperação do xilitol e o catalisador (CANILHA et al., 2013; RUEDA et al., 2015; ARCAÑO et al., 2018).

A Figura 2 resume as etapas das rotas tecnológicas nos processos químico e biotecnológico de produção de xilitol. A rota biotecnológica apresenta vantagens comparada com a rota química, tais como (HOU-RUI, 2012; CANILHA et al., 2013): 1) não necessidade de sucessivas etapas de purificação da xilose, por ser um processo biologicamente seletivo; 2) não utilizar altas temperaturas e pressões na etapa de conversão da xilose em xilitol; 3) algumas impurezas orgânicas e inorgânicas do hidrolisado hemicelulósico podem ser parcialmente degradadas ou usadas como nutrientes pelo micro-organismo, o que favorece a etapa de purificação do xilitol; 4) o esgotamento da glicose e xilose durante a fermentação favorece a purificação do xilitol, apesar da presença de outros açúcares contaminantes (arabinose e galactose), uma vez que a separação de xilose e xilitol é complexa.

Figura 2 - Comparação das etapas principais dos processos químico e biotecnológico de produção de xilitol a partir de biomassas vegetais.



Fonte: Baseado em Canilha et al. (2013) e Pal, Mondal e Sahoo (2016).

2.3.4 Integração da produção de xilitol em uma biorrefinaria

O xilitol é um dos químicos de alto valor agregado com potencial para suportar técnica e economicamente a produção integrada de bioenergia de baixo custo em uma biorrefinaria, de acordo com o Departamento de Energia dos Estados Unidos (US-DOE) (WERPY; PETERSON, 2004; ZHANG, 2008). A este respeito, simulações de processos de produção de xilitol por via química e biotecnológica permitiram concluir que a viabilidade técnica e econômica destes depende de sua a integração a outros processos em uma biorrefinaria (MOUNTRAKI et al., 2018). Estes autores encontraram que o investimento total para uma planta independente de produção biotecnológica de xilitol seria maior que para o processo químico. Entretanto, a integração dos fluxos de massa e energia em uma biorrefinaria beneficiaria consideravelmente a rentabilidade da obtenção de xilitol, principalmente pela via biotecnológica (MOUNTRAKI et al., 2018).

A viabilidade técnica e econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos em biorrefinarias integrada a outros processos foi avaliada a partir de palha de centeio (FRANCESCHIN et al., 2011), fibra de milho (FEHÉR; BARTA; RÉCZEY, 2012), polpa residual de amora (DÁVILA; ROSENBERG; CARDONA, 2017), resíduos do processamento de azeite de palma (MEDINA et al., 2018); bagaço de cana (UNREAN; KETSUB, 2018), bagaço e palha de cana (ÖZÜDOĞRU et al., 2019), poda de oliveira (SUSMOZAS et al., 2019).

Unrean e Ketsub (2018) avaliaram a co-produção de etanol e xilitol a partir de bagaço de cana como estratégia para alcançar o pleno aproveitamento de subprodutos lignocelulósicos e aumentar a competitividade tecno-econômica em larga escala. Quanto à produção de xilitol, estes autores identificaram como desafios a serem superados: a otimização do pré-tratamento, eliminação de etapas complexas de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, melhoria de cepas produtoras de xilitol e aumentar a concentração final de xilitol. A análise econômica revelou que a integração de processos de batelada alimentada para produção de xilitol e etanol em uma biorrefinaria podem aumentar a rentabilidade em 2,3 vezes comparado com o caso básico de produção de etanol celulósico (UNREAN; KETSUB, 2018).

Susmozas et al. (2019) simularam uma biorrefinaria a partir de poda de oliveira para a produção integrada de etanol, xilitol, antioxidantes e eletricidade. No caso do xilitol, foi considerado um processo fermentativo a partir do hidrolisado hemicelulósico obtido por

explosão a vapor, concentrado por evaporação e destoxificado por ajuste de pH (overliming), usando *Meyerozyma guilliermondii,* com obtenção de um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,8 gg^{-1} e uma eficiência geral do processo de 47% após recuperação de xilitol com 99% de pureza (SUSMOZAS et al., 2019). Segundo estes autores, no cenário simulado, a biorrefinaria era rentável (porém dependente do preço de mercado dos componentes com valor agregado), autossuficiente energeticamente e com produção de 109 L de etanol, 27 kg de xilitol e 43 kg de antioxidantes a partir de 1 tonelada da matéria-prima, com custo de produção de 0,24 € L^{-1}, 1,48 € kg^{-1} e 5.12 € kg^{-1}, respetivamente. Estes autores consideraram a concentração de xilose no hidrolisado e do xilitol no caldo fermentado com uns dos passos mais demandantes de energia entre os processos envolvidos na biorrefinaria.

Uma biorrefinaria similar foi simulada por Dávila, Rosenberg e Cardona (2017) a partir de polpa residual de amora, com produção de etanol, xilitol, extrato de compostos fenólicos e eletricidade. Para a produção de xilitol foi considerado o hidrolisado hemicelulósico obtido por hidrólise ácida diluída, concentrado por evaporação e neutralizado, e a levedura *Candida guilliermondii* (DÁVILA; ROSENBERG; CARDONA, 2017). Estes autores obtiveram um rendimento estimado de 18,37 kg de xilitol, 182,5 L de etanol e 3,88 kg de compostos fenólicos por 1 tonelada de matéria-prima. O custo de produção do xilitol variou entre os cenários simulados entre aproximadamente 21 e 31 USD kg^{-1} (DÁVILA; ROSENBERG; CARDONA, 2017).

Fehér, Barta e Récsey (2012) simularam diversos cenários de biorrefinaria a partir de fibra de milho para produção de etanol, xilitol, eletricidade e biometano. No caso do xilitol, foi simulado um processo com hidrolisado hemicelulósico obtido por pretratamento hidrotérmico e hidrólise ácida diluída, conversão da xilose por uma cepa de *Candida* com fator de conversão de 0,67 gg^{-1}, e da arabinose por uma cepa recombinante de *Escherichia coli*, com fator de conversão de 0,71 gg^{-1} (FEHÉR; BARTA; RÉCSEY, 2012). Os autores concluíram que a fração hemicelulósica poderia ser utilizada para biometano e/ou xilitol em proporções variáveis como mecanismo de adaptação ao mercado e favorecimento da rentabilidade da biorrefinaria. Franceschin et al. (2011) avaliaram o processo completo de produção simultânea de etanol e xilitol a partir da palha de centeio. Para a produção de xilitol foi considerado o hidrolisado hemicelulósico derivado de pré-tratamento hidrotérmico, destoxificado por adsorção com carvão ativado, e fator de conversão de xilose em xilitol de 0,74 gg^{-1} (FRANCESCHIN et al., 2011). Os resultados verificaram que a obtenção de xilitol

contribui significativamente para a rentabilidade do processo, porém altamente dependente das variações do preço deste no mercado.

Özüdoğru et al. (2019) simularam uma biorrefinaria anexa a uma usina açucareira para produção de ácido cítrico, xilitol ou ácido glutâmico junto com eletricidade, a partir da mistura de bagaço e palha de cana. Diferente dos estudos citados anteriormente, estes autores selecionaram a rota química de produção de xilitol baseado no estudo de Mountraki et al. (2018), no qual foi indicado que o rendimento global da rota química (0,87 kg cristais de xilitol por 1 kg de xilose) seria maior que o da biotecnológica (0,73 kg cristais de xilitol por 1 kg de xilose). Assim, no estudo de Özüdoğru et al. (2019) foi simulada a utilização de hidrolisado hemicelulósico obtido por hidrólise ácida diluída, neutralizado, destoxificado por evaporação e adsorção com carvão ativado, e concentrado por cromatografia de troca iônica (78% xilose). Estes autores concluíram que os cenários que envolveram obtenção de xilitol ou ácido glutâmico com coprodução de eletricidade foram mais rentáveis que o cenário de só combustão da mistura de bagaço e palha de cana para cogeração de energia.

2.4 Produção biotecnológica de xilitol

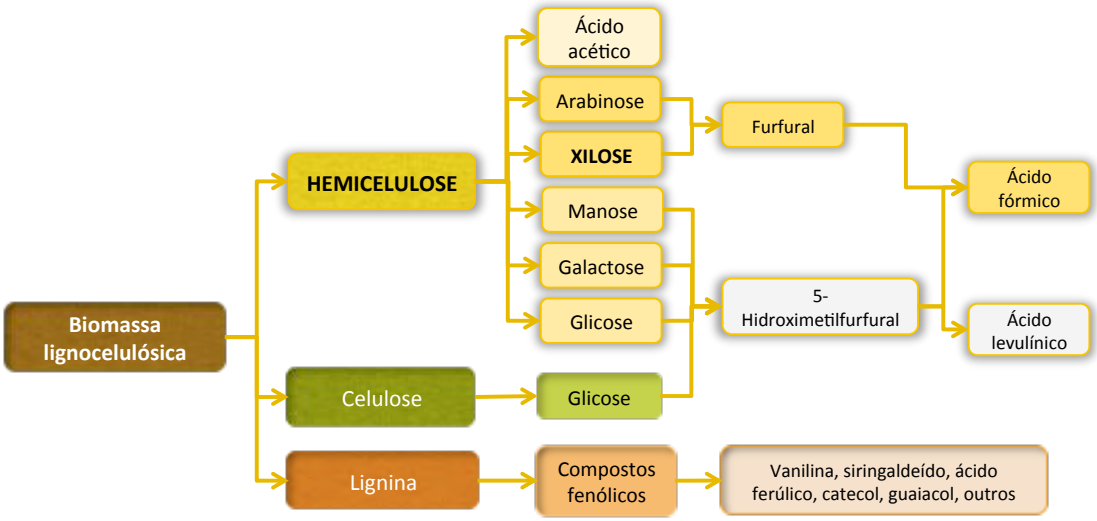
O processo de produção biotecnológica de xilitol apresenta algumas semelhanças com o de obtenção química nas etapas a serem seguidas, conforme apresentado no esquema da Figura 2. Similar ao processo químico, inicialmente é necessário o fracionamento da biomassa lignocelulósica para obtenção de um meio de fermentação rico em xilose a partir da fração hemicelulósica, o qual é submetido a procedimentos subsequentes de preparação prévios à etapa de conversão bioquímica da xilose em xilitol, seguida pela recuperação do produto do meio após a fermentação por micro-organismos capazes de metabolizar a xilose.

Destaca-se que no GMBIO da EEL/USP importantes avanços têm sido atingidos nas diferentes etapas do processo de produção biotecnológica de xilitol. Salienta-se ainda que já foram estudadas diferentes biomassas lignocelulósicas de setores agroindustriais, tais como bagaços de cana (FELIPE et al., 1997a), de malte (MUSSATTO; ROBERTO, 2008) e de maçã (DALANHOL, 2014), palhas de arroz (ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999), de trigo (CANILHA et al., 2005) e de sorgo (SENE et al., 2011), cascas de aveia (TAMANINI et al., 2004), e cavacos de eucalipto (ALMEIDA et al., 2003). Recentemente a palha de cana foi também estudada (HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016).

2.4.1 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico rico em xilose

Segundo García-Martin, Sánchez e Cuevas (2013) e Arcaño et al. (2018), a hidrólise ácida diluída é um método de baixo custo, simples, rápido, efetivo e de fácil operação. De acordo com as revisões realizadas por Rao et al. (2016) e Kumar e Sharma (2017), a hidrólise química da biomassa lignocelulósica usando ácido sulfúrico é a mais amplamente pesquisada e empregada, uma vez que este ácido é menos volátil, mais barato e não corrói o equipamento quando empregado em baixas concentrações. Entretanto, este catalisador poderia ser substituído por um menos tóxico, mais eficiente e reciclável para favorecer a sustentabilidade desta rota tecnológica (KUMAR; SHARMA, 2017). A recuperação de xilose e a mínima formação de compostos que podem ser inibitórios para micro-organismos depende da concentração de ácido sulfúrico, temperatura, tempo de residência e relação sólido:líquido (CHANDEL et al., 2012; RAO et al., 2016). Na Figura 3 se apresenta um esquema da desconstrução da biomassa lignocelulósica durante os processos hidrolíticos.

Figura 3 - Esquema da desconstrução da biomassa lignocelulósica durante a hidrólise ácida.



Fonte: Baseado em Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000).

No grupo GMBIO na EEL/USP já foram estudadas diferentes condições para a hidrólise ácida diluída com H_2SO_4 de bagaço de cana, a exemplo do trabalho desenvolvido por Pessoa Jr, Mancilha e Sato (1997), que encontraram a maior solubilização de xilose (83,3%) quando o processo foi realizado a 140 ºC por 20 min, relação sólido:líquido de 1:10 e 100 mg H_2SO_4/g biomassa seca, obtendo um hidrolisado com 18,5 gL^{-1} de xilose. Rodrigues et al. (2010) estudaram o escalonamento da hidrólise ácida diluída de bagaço de

cana em reatores de 0,025 L, 25 L e 350 L, e verificaram que as condições de maior solubilização de xilose (aproximadamente 74%) foram 130 ºC, por 10 ou 20 min, e 100 mg H_2SO_4/g biomassa seca.

Condições similares às mencionadas previamente, porém com temperatura de 120ºC e 20 min, foram usadas por Silva et al. (1997), Silva et al. (2005), Silva e Felipe (2006) e Silva et al. (2016) para hidrólise do bagaço de cana para produção de xilitol. Estas condições de hidrólise ácida diluída (120 ºC, 20 min, relação sólido:líquido de 1:10 e 1% (m/v) de H_2SO_4) foram recentemente usadas para obtenção do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, atingindo-se uma concentração de xilose de 18,6 gL^{-1} (HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016). Moutta et al. (2012) otimizaram as condições de temperatura, tempo, concentração de H_2SO_4 e relação sólido:líquido para hidrolise de palha de cana (folhas) para favorecimento da recuperação da xilose. Estes autores obtiveram um hidrolisado hemicelulósico com 56,5 gL^{-1} de xilose, correspondente a uma de solubilização de 85,1% desta pentose, utilizando 130 ºC, 30 min, 2,9% (m/v) de H_2SO_4 e 1:4 sólido:líquido. Nestas condições, a concentração de compostos tóxicos no hidrolisado hemicelulósico foi de 3,19 gL^{-1} de ácido acético, 0,56 gL^{-1} de furfural e 0,17 gL^{-1} de 5-hidroximetilfurfural (MOUTTA et al., 2012).

Como parte da preparação do hidrolisado hemicelulósico como meio de fermentação para a produção de xilitol, é realizado um procedimento de concentração à vácuo com o objetivo de elevar o teor de xilose para favorecimento da bioconversão desta a xilitol. Rodrigues et al. (2003a) realizaram um estudo da concentração à vácuo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, avaliando a influência do pH e temperatura sobre a produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037. Neste estudo, a produção de xilitol foi favorecida quando a concentração à vácuo foi realizada empregando uma temperatura de 61,5 ºC para atingir um teor de xilose de 51 gL^{-1} (RODRIGUES et al., 2003a).

2.4.2 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico

Rao et al. (2016) indicaram que o maior desafio da hidrólise ácida é a degradação dos açúcares liberados e formação de compostos que podem inibir os micro-organismos e consequentemente a conversão de xilose em xilitol. Segundo Felipe (2004) o efeito inibitório dos compostos tóxicos que podem estar presentes nos hidrolisados é dependente das concentrações destes e atividades sinérgicas entre eles. De acordo com Kumar et al. (2009)

e Jonssön, Alriksson e Nilvebrant (2013), a tolerância a estes compostos tóxicos é dependente do micro-organismo e sua capacidade de adaptação e do tipo de processo fermentativo empregado.

Compostos fenólicos derivados da degradação parcial da lignina, como ácido vanílico, siríngico e siringaldeído, são os principais inibidores obtidos durante a hidrólise ácida, cujo efeito é atribuído aos danos causados na integridade da membrana biológica (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; RAO et al., 2016). Estudos têm atribuído diferentes níveis de toxicidade a estes compostos, a exemplo do trabalho de Cortez e Roberto (2010), que demonstraram que a mistura de vanilina (2 gL^{-1}) e siringaldeído (2 gL^{-1}) inibiu completamente o crescimento celular e produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 em meio semidefinido, sendo que o siringaldeído mostrou maior poder inibitório quando avaliados individualmente. Entretanto, é importante destacar que já foi reportada a capacidade de certas leveduras de converter alguns aldeídos aromáticos a seus respectivos álcoois ou ácidos, reduzindo assim sua toxicidade e possibilitando a adaptação do micro-organismo ao meio de fermentação (FITZGERALD; STRATFORD; NARBAD, 2003; CORTEZ; ROBERTO, 2010). Particularmente no caso de *C. guilliermondii* FTI 20037, Cortez e Roberto (2010) constataram que em condições microaerofílicas esta levedura foi capaz de converter a vanilina e o siringaldeído em vanilil álcool e ácido siríngico, respectivamente.

Por outro lado, como resultado das altas temperaturas e tempos de residência da hidrólise ácida, as pentoses e hexoses liberadas podem ser degradadas a compostos furanos, denominados furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) respectivamente, os quais podem afetar as atividades enzimáticas da célula, a estrutura do DNA e inibir a síntese proteica (RAO et al., 2016). Similar ao comentado em relação aos compostos fenólicos, já foi demonstrado que a bioconversão dos grupos aldeídos dos furanos a seu álcool ou ácido correspondente contribui a reduzir sua toxicidade (ALMEIDA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009). Entretanto, este processo causa também concorrência pelos cofatores NADH e/ou NADPH entre as oxidoredutases envolvidas nesta bioconversão e as enzimas do metabolismo central e particularmente da xilose, o qual indiretamente também pode alterar o balanço redox na célula, diminuir a energia celular disponível e causar dano estrutural (ALMEIDA et al., 2008; ALMEIDA et al., 2009). A este respeito, Almeida et al. (2009) sugeriram que a via das Pentoses Fosfato (PPP) era essencial para a tolerância a furfural e para a resposta ao estresse oxidativo de maneira geral, uma vez que *S. cerevisiae* poderia

converter furfural e 5-HMF a seus derivados alcoólicos, usando reduções dependentes de NAD(P)H durante a fase *lag* sob condições anaeróbicas ou durante o metabolismo respiro-fermentativo.

Um terceiro grupo de compostos tóxicos que podem também estar presentes nos hidrolisados hemicelulósicos são ácidos alifáticos, como acético, fórmico e levulínico, os quais podem ser formados como produtos da desacetilação da hemicelulose ou degradação dos furanos (RAO et al., 2016). No caso do ácido acético, seu efeito inibitório é devido a sua entrada na célula por difusão passiva na sua forma não dissociada e sua dissociação no interior por causa do maior pH intracelular, o qual gera um incremento na concentração intracelular de prótons e do íon acetato, o que em consequência pode afetar os gradientes de prótons envolvidos no transporte de nutrientes e na produção de energia (VERDUYN et al., 1992; LIMA et al., 2004). Para compensar o efeito da diminuição do pH intracelular, a ATPase de membrana catalisa a expulsão de prótons com demanda de ATP (VERDUYN et al., 1992; LIMA et al., 2004). Caso se apresente um funcionamento não adequado da ATPase de membrana, causado por sua saturação e/ou por fornecimento insuficiente de ATP, a acidificação do pH intracelular pode resultar na inibição do crescimento e morte celular (VERDUYN et al., 1990). Segundo Lima et al. (2004), concentrações de ácido acético inferiores a 5,0 gL^{-1} não tiveram efeitos significativos no consumo de xilose e produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 avaliada tanto em meio definido quanto em hidrolisado hemicelulósico com concentrações inicias de xilose de 42 ± 4 gL^{-1}. Por sua vez, Felipe et al. (1995) reportaram que a produção de xilitol em meio semidefinido (xilose inicial 60 gL^{-1}) foi afetada em concentrações maiores a 3 gL^{-1} deste ácido. Destaca-se Lima et al. (2004) e Felipe et al. (1995) sugeriram que a produção de xilitol poderia ser favorecida por baixas concentrações de ácido acético, menores a 1,0 gL^{-1}, segundo Felipe et al. (1995).

Além dos compostos acima mencionados, traços de elementos metálicos como cromo, cobre, ferro e níquel podem estar presentes nos hidrolisados hemicelulósicos, os quais podem ser provenientes do material vegetal, do solo ou dos equipamentos de hidrólise (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1997; CONVERTI; PEREGO; DOMÍNGUEZ, 1999). Estes elementos metálicos podem afetar as vias metabólicas do micro-organismos por inibição das enzimas (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Diferentes procedimentos já foram investigados para a remoção de compostos tóxicos até concentrações mínimas que não interfiram com a atividade fermentativa do micro-organismo e assim favorecer a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos

(ARRUDA et al., 2008; RAO et al., 2016). Segundo Rao et al. (2006) a eficiência destes procedimentos depende do tipo de matéria-prima, do processo hidrolítico e do micro-organismo empregado na etapa fermentativa. Já foram empregados métodos de alteração de pH (ROBERTO et al., 1991; MARTINEZ et al., 2001), combinação de alteração de pH e adsorção com carvão ativado (ALVES et al., 1998; MARTON et al., 2006), adsorção com carvão ativado seguido de resinas de troca iônica (CARVALHO; MARTON; FELIPE, 2005; VILLAREAL et al., 2006), tratamento só com resinas de troca iônica (ARRUDA et al., 2011) e floculação usando polímeros vegetais (ARRUDA et al., 2008; SILVA-FERNANDES et al., 2017), celites e hidrotalcitas (COSTA et al., 2014). Salienta-se que durante o processo de concentração à vácuo para aumento de teor de xilose mencionado previamente (RODRIGUES et al., 2003a), ocorre também a diminuição na concentração de compostos tóxicos voláteis, como ácido acético e furanos (VILLAREAL et al., 2006), porém permite o acúmulo de compostos não voláteis, como os derivados fenólicos (RODRIGUES et al., 2003a). Além destes, métodos não convencionais também já foram testados, como extração com trialquilamina, nanofiltração, destoxificação eletroquímica e biodestoxificação (RAO et al., 2016).

Dentre esses procedimentos destaca-se o uso de resinas de troca iônica e a adsorção com carvão vegetal ativado como os métodos mais eficientes para destoxificação de hidrolisados (RAO et al., 2016). Apesar dos resultados satisfatórios em remoção de compostos tóxicos e favorecimento da bioconversão de xilose em xilitol obtidos com resinas de troca iônica (VILLAREAL et al., 2006; ARRUDA et al., 2011), o alto custo destas e as extensivas etapas de regeneração necessárias para sua reutilização limitam a possibilidade de sua utilização convencional (ARRUDA et al., 2008). Por sua vez, a adsorção com carvão ativado é considerada um método bem estabelecido, eficiente e de baixo custo (RAO et al., 2016), apesar da geração de resíduos e a impossibilidade de sua reutilização (VILLAREAL et al., 2006). Este método pode ser usado em combinação com a alteração de pH, a qual promove a precipitação e/ou instabilidade de compostos tóxicos. A metodologia para destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por alteração de pH e adsorção com carvão ativado foi estabelecida na EEL/USP por Marton et al. (2006).

2.4.3 Fermentação do hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol

A etapa subsequente ao preparo do hidrolisado hemicelulósico rico em xilose é a conversão desta pentose em xilitol, processo que pode ser por via fermentativa ou enzimática, baseado na capacidade de diversos micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, de reduzir a xilose em xilitol (RAO et al., 2016). É importante destacar que condições operacionais do processo fermentativo já foram definidas na EEL/USP com a levedura *C. guilliermondii*[1] FTI 20037, selecionada por Barbosa et al. (1988), em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Foi definida a idade do inóculo (24 h) (FELIPE et al., 1997a), e a fonte de carbono para seu preparo (xilose) (ARRUDA et al., 2011); concentração de xilose no hidrolisado entre 50 e 60 gL^{-1} (FELIPE et al., 1997a; RODRIGUES et al., 2003a), relação glicose:xilose de 1:5 (SILVA; FELIPE, 2006), suplementação nutricional com farelo de arroz (SILVA et al., 2003), pH entre 5,5 e 6,5 (FELIPE et al., 1997b) e temperatura de 30 ºC (BARBOSA et al., 1998; SENE et al., 2000).

Diferentes estratégias já foram estudadas para o favorecimento da capacidade fermentativa de *C. guilliermondii* FTI 20037, como a adaptação desta ao hidrolisado hemicelulósico (SENE et al., 2001); imobilização celular em reatores de tanque agitado (CARVALHO et al., 2004) ou de leito fluidizado (SARROUH; SILVA, 2008); operação do processo em batelada alimentada (RODRIGUES; SILVA; FELIPE, 1999), em semi-contínuo com células imobilizadas (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008) ou em contínuo (MARTÍNEZ et al., 2003).

Salienta-se que estudos de ampliação de escala deste bioprocesso em fermentadores piloto já foram realizados, a exemplo do trabalho desenvolvido por Arruda et al. (2017), no qual o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) foi selecionado como critério para aumento da escala em fermentadores de 2,4 L, 8 L e 125 L. Estes autores demonstraram que foi possível o escalamento do processo de produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana utilizando K_La de 16 h^{-1}, atingindo-se fatores de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$) entre 0,55 gg^{-1} (125 L) e 0,66 gg^{-1} (2,4 L e 8 L) e produtividades volumétrica de xilitol (Q_P) de aproximadamente 0,31 $gL^{-1}h^{-1}$ nas escalas avaliadas (ARRUDA et al., 2017).

---

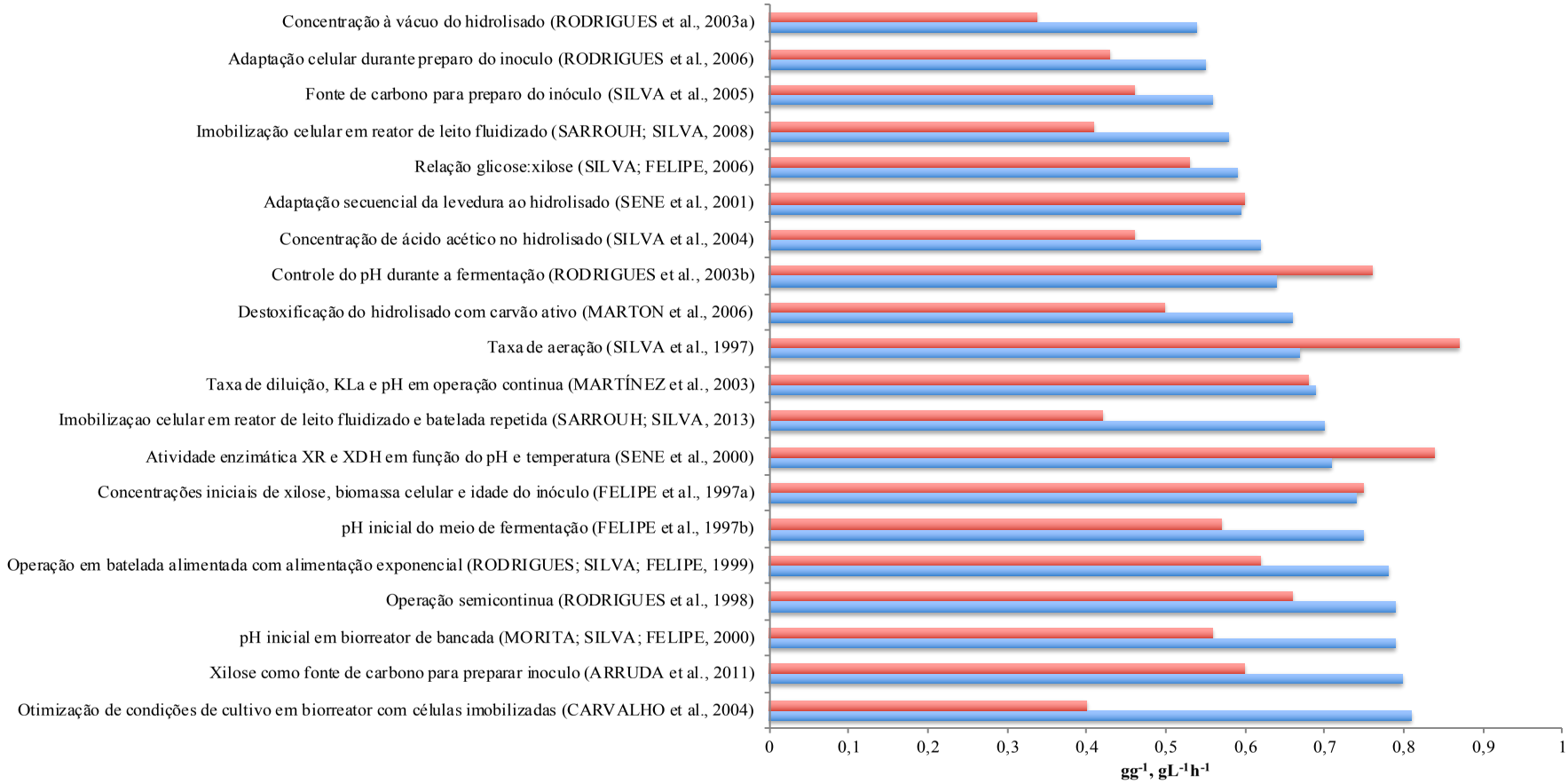
[1] *C. guilliermondii* é uma levedura asporógena pertencente à classe taxonômica Ascomycete, amplamente distribuída no ambiente, e de interesse biotecnológico por seu amplo espectro de substratos assimiláveis e por sua capacidade de produção de riboflavinas, enzimas industrialmente importantes, e particularmente xilitol (SIBIRNY; BORETSKY, 2009; PAPON et al., 2013).

Em relação à alternativa de produção via enzimática, Branco, Santos e Silva (2011) destacaram que com esta podem ser atingidas eficiências de conversão de xilose em xilitol de até 100 %, em função que toda a xilose é transformada a xilitol e não há consumo para crescimento e manutenção celular. Para tanto, estes autores empregaram o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana como substrato e a enzima xilose redutase (XR) dependente de NAPDH, isolada de *C. guilliermondii* FTI 20037, para redução da xilose em xilitol, reação que foi acoplada a uma de regeneração do cofator reduzido, correspondente à do sistema glicose desidrogenase, que oxida glicose a ácido glucônico com participação de $NADP^+$ (BRANCO; SANTOS; SILVA, 2011). Neste trabalho foram obtidas eficiências de conversão superiores a 98% e Q_P próximas a 0,32 $gL^{-1}h^{-1}$ usando proporções de até 40 % (v/v) de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (BRANCO; SANTOS; SILVA, 2011).

Os principais resultados obtidos pelo grupo GMBIO quanto às diferentes estratégias já avaliadas para a produção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana se apresentam na Figura 4. Nas pesquisas mencionadas têm sido obtidos valores variáveis de $Y_{P/S}$ geralmente entre 0,55 e 0,75 gg^{-1} (equivalente a eficiências de bioconversão[2] entre 60% e 80%), e de Q_P, comumente entre 0,4 e 0,7 $gL^{-1}h^{-1}$, sendo evidente que ainda não foi possível se alcançar o favorecimento concomitante do fator de conversão de xilose em xilitol e a produtividade volumétrica de xilitol. De fato, destaca-se nesta figura que os máximos valores destes parâmetros ($Y_{P/S}$ de 0,78-0,81 gg^{-1}, equivalente eficiências de 85–88% e Q_P de 0,75–0,87 $gL^{-1}h^{-1}$) não foram resultados das mesmas estratégias, o que abre a possibilidade de melhoria deste bioprocesso mediante obtenção concomitante de altos valores tanto do fator de conversão quanto de produtividade volumétrica de xilitol.

[2] **Eficiência de bioconversão de xilose em xilitol:** calculada como a relação entre o $Y_{P/S}$ experimental e o teórico, determinada em 0,92 gg^{-1} por Barbosa et al. (1988).

Figura 4 - Valores de produtividade volumétrica de xilitol ($gL^{-1}h^{-1}$) (■) e fator de conversão de xilose em xilitol (gg^{-1}) (■) obtidos em função das diferentes estratégias já avaliadas pelo grupo GMBIO com emprego de *C. guilliermondii* FTI 20037 a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.



Fonte: Arquivo próprio.

2.4.4 Recuperação do xilitol

A etapa posterior à fermentação é a recuperação e purificação do xilitol, a qual é de alta complexidade devido à baixa concentração do produto, grande quantidade de impurezas próprias do hidrolisado, nutrientes adicionados e subprodutos do processo fermentativo (SAMPAIO et al., 2006; ALIAKBARIAN et al., 2012). O esquema de recuperação e purificação do xilitol é a clarificação do meio fermentado, separação e concentração do xilitol, e a cristalização (SAMPAIO et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2007). Para a clarificação do meio fermentado já foi empregado adsorção com carvão ativado, separação por membrana e resinas de troca iônica (CANILHA et al., 2008; WEI et al., 2010; ALIAKBARIAN et al., 2012). A este respeito, destaca-se que no trabalho de Sampaio et al. (2006) foi possível a clarificação do meio fermentado com carvão ativado (20 gL^{-1}) a 25 ºC por 1h, com remoção de aproximadamente 94% de impurezas e de 69% de proteínas, e conservação do xilitol produzido.

Prévio ao processo de cristalização é necessário o aumento na concentração de xilitol até valores próximos ao teor de supersaturação, isto é maior a 700 gL^{-1} (MARTÍNEZ et al., 2007; CANILHA et al., 2008; WEI et al., 2010). Para tanto, Martínez et al. (2007) e Canilha et al. (2008) empregaram concentração à vácuo a 65 ºC e 60 ºC, respectivamente, atingindo-se concentrações de xilitol de 935,4 gL^{-1} e 726,5 gL^{-1} nos hidrolisado hemicelulósicos de bagaço de cana e palha de trigo fermentados, respectivamente. Este mesmo processo foi empregado por Sampaio et al. (2006), porém utilizando uma temperatura de 30 ºC para atingir concentrações entre 675 e 911 gL^{-1} em meio definido.

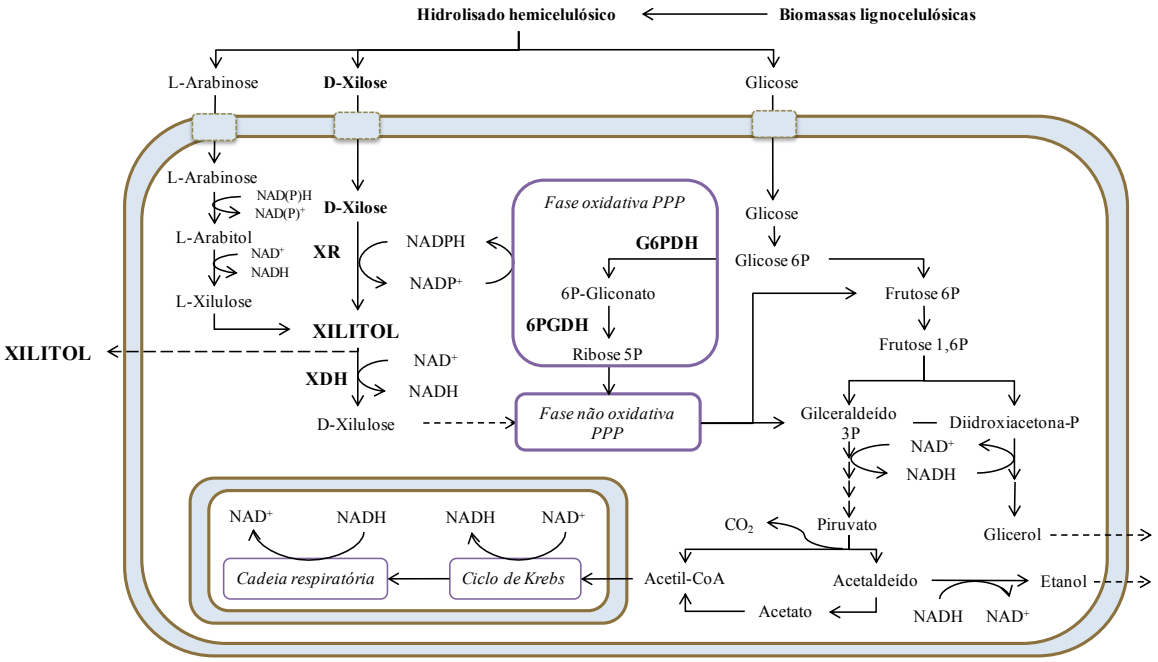
A etapa seguinte corresponde à cristalização, que pode ser realizada em uma ou várias fases, e para a qual já foram avaliadas diferentes temperaturas e adição de solventes, como etanol, e/ou de cristais de xilitol (SAMPAIO et al., 2006; MARTÍNEZ et al., 2007; CANILHA et al., 2008). Martínez et al. (2007) obtiveram cristais de xilitol com pureza próxima a 95% após duas fases de cristalização de resfriamento contínuo a partir de temperaturas de saturação entre 30 e 50 ºC e com adição de cristais de xilitol e etanol para diminuir a solubilidade do xilitol. Por sua vez, Sampaio et al. (2006) encontraram que a eficiência e velocidade da cristalização era positivamente afetada pelo aumento na concentração de xilitol no meio, a diminuição na temperatura e aumento na concentração de xilose residual. Entretanto, estes autores também destacaram que a pureza dos cristais de

xilitol foi favorecida pelo aumento de temperatura e a redução na concentração de xilose residual (SAMPAIO et al., 2006).

2.5 Bioconversão de xilose em xilitol

A produção biotecnológica de xilitol está baseada no metabolismo de xilose em micro-organismos naturalmente fermentadores de pentoses, principalmente leveduras. Em leveduras, a xilose é reduzida a xilitol pela enzima XR dependente de NAD(P)H, seguido pela oxidação do xilitol a xilulose catalisada pela xilitol desidrogenase (XDH) dependente de NAD^+ (GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). A xilulose é o ponto de integração com a fase não oxidativa da PPP e a partir desta com o metabolismo central do carbono para regeneração de cofatores, formação de intermediários carbonados, energia e biomassa celular (FLORES et al., 2000; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). O acúmulo do xilitol é promovido pela restrição da disponibilidade de oxigênio no meio, uma vez que nesta condição a atividade da XDH é limitada pelo desequilíbrio redox $NADH/NAD^+$, resultando na redução da formação de xilulose (GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). O esquema da Figura 5 apresenta um modelo de metabolismo de leveduras fermentadoras de pentoses cultivadas em hidrolisados hemicelulósicos em condições microaeróbicas, com destaque para a assimilação de xilose e formação de xilitol, baseado na revisão feita por Granström, Izumori e Leisola (2007).

Figura 5 - Modelo de metabolismo de leveduras fermentadoras de pentoses cultivadas em hidrolisados hemicelulósicos em condições microaeróbicas, com destaque para a assimilação de xilose e formação de xilitol.



Fonte: Baseado em Granström, Izumore e Leisola (2007).

De acordo com Kim et al. (1999) e Granström, Izumore e Leisola (2007), o fluxo de carbono através das vias metabólicas centrais é diminuído como resultado do acúmulo de xilitol, particularmente através da PPP, a qual é a principal via produtora de NADPH (BRUINENBERG; VAN DIKJEN; SCHEFFERS, 1983). Consequentemente, a regeneração do NADPH se torna um desafio importante na produção de xilitol por leveduras nas quais a XR é dependente de NADPH, como é o caso de *C. guilliermondii* (GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007) e *C. tropicalis* (YOKOYAMA et al., 1995). Granström e Leisola (2002) realizaram experimentos com xilose como única fonte de carbono, em quimiostato e em diferentes taxas de transferência de oxigênio, e reportaram que a XR de *C. guilliermondii* seria exclusivamente dependente de NADPH, enquanto que a de *C. tropicalis* poderia utilizar NADPH ou NADH. Como resultado da regeneração limitada de NADPH e a diminuição do fluxo de carbono proveniente da assimilação da xilose para o metabolismo central em condições limitadas de oxigênio, são afetados processos celulares relacionados com a formação de intermediários carbonados, de energia e crescimento celular (KASTNER; EITEMAN; LEE, 2001; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007).

Assim, o fornecimento de oxigênio desempenha um papel crítico na produção de xilitol, conforme observado experimentalmente em pesquisas desenvolvidas pelo grupo GMBIO. Quando empregado baixo fornecimento de oxigênio, correspondente a valores de

K_La de 10 h^{-1} (MORITA; SILVA; FELIPE, 2000) e 15 h^{-1} (ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999), o $Y_{P/S}$ foi favorecido, atingindo-se valores maiores a 0,72 gg^{-1} (equivalente a eficiências de bioconversão de 79%), porém não se observando o mesmo para a Q_P (menores que 0,56 $gL^{-1}h^{-1}$). Por outro lado, em outros estudos o aumento dos valores de K_La para 22 h^{-1} (RODRIGUES et al., 2003b) e 27 h^{-1} (SILVA et al., 1997) permitiu aumentar os valores da Q_P (superiores a 0,75 $gL^{-1}h^{-1}$), apesar de valores de $Y_{P/S}$ de até 0,67 gg^{-1}. Assim, este comportamento sugere que melhorias neste bioprocesso podem ser alcançadas com pesquisas quanto ao efeito do fornecimento de oxigênio e sua relação com outras condições de cultivo, a exemplo da composição do meio de cultura e preparo do inóculo.

Em relação à composição do meio de cultura, salienta-se a importância da concentração inicial da xilose, a qual esta diretamente relacionada com a obtenção de altas concentrações de xilitol, e consequentemente com a configuração do biorreator e as operações de separação e recuperação do produto (SILVA; ROBERTO, 2001; MUSSATTO; ROBERTO, 2008). Segundo Mussatto e Roberto (2008), a concentração ótima de xilose inicial é dependente do tipo de micro-organismo, bem como da matéria-prima empregada. O favorecimento da produção de xilitol ocorreu com concentrações iniciais de xilose entre 50 e 60 gL^{-1} nos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana (FELIPE et al., 1997a; RODRIGUES et al., 2003a), de cavacos de eucalipto (CANETTIERI; SILVA; FELIPE, 2001) e palha de cevada (MORAES et al., 2018), enquanto que nos de bagaço de malte e de palha de arroz foi verificado com concentrações de xilose de 70 gL^{-1} (MUSSATTO; ROBERTO, 2008) e 82,5 gL^{-1} (SILVA; ROBERTO, 2001), respectivamente.

Entretanto, há limitações para a utilização de altas concentrações iniciais de xilose (superiores a 70 gL^{-1}) em processos em batelada, como a possível inibição da bioconversão por excesso de substrato, o requerimento energético para o aumento da concentração de xilose no hidrolisado e o possível incremento concomitante da concentração de compostos que podem ser tóxicos para o micro-organismo (ácidos orgânicos, furanos e compostos fenólicos) provenientes do processo hidrolítico (MUSSATTO; ROBERTO, 2003: MORAES et al., 2018). Para contornar o problema do aumento paralelo do teor de compostos tóxicos, é necessária a destoxificação eficiente do hidrolisado, bem com o emprego de condições de cultivo para o favorecimento do estado fisiológico da levedura e sua consequente tolerância a estes compostos tóxicos, o que está relacionado com o fornecimento de oxigênio, formulação do meio de cultura, pH e concentração inicial de biomassa celular (FELIPE et al., 1997a; SILVA; ROBERTO, 2001).

No caso da concentração inicial de biomassa celular, a utilização de altas concentrações foi avaliada por Felipe et al. (1997a) como uma estratégia para superar o efeito inibitório de compostos tóxicos. Destaca-se que já foi constatado que um aumento da concentração inicial da biomassa celular de 0,2 para 3,0 gL^{-1} favoreceu o consumo de xilose e produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana (FELIPE et al., 1997a) e palha de arroz (SILVA; ROBERTO, 2001). Segundo Silva, Felipe e Mancilha (1998), o favorecimento da produção de xilitol pelo aumento nas concentrações iniciais de xilose e de biomassa celular é devido a uma redução no oxigênio disponível por diminuição na capacidade de transferência deste no meio de cultura.

Em relação à suplementação nutricional, estudos já demonstraram que podem ocorrer diferenças nos requerimentos nutricionais de meios de fermentação baseados em hidrolisados hemicelulósicos, especificamente quanto aos nutrientes sulfato de amônio, extrato de farelo de arroz e cloreto de cálcio, em função do tipo de biomassa lignocelulósica empregada como matéria-prima e das condições de preparo do hidrolisado hemicelulósico. Já foi constatado que a suplementação nutricional dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (MUSSATTO; ROBERTO, 2005) e bagaço de malte (MUSSATTO; ROBERTO, 2008) com sulfato de amônio, extrato de farelo de arroz e cloreto de cálcio prejudicou significativamente a eficiência de bioconversão e produtividade de xilitol, sendo que os máximos valores destes parâmetros foram obtidos nos hidrolisados não suplementados.

Por outro lado, Almeida et al. (2003) encontraram que a produção de xilitol *C. guilliermondii* FTI 20037 foi favorecida pela otimização da concentração de sulfato de amônio (1,8 gL^{-1}) adicionado ao hidrolisado hemicelulósico de cavacos de eucalipto (45 gL^{-1} xilose), enquanto que a suplementação de extrato de farelo de arroz não teve um efeito significativo no bioprocesso. Recentemente, Moraes et al. (2018) verificaram a maximização da produtividade volumétrica de xilitol (0,70 $gL^{-1}h^{-1}$) quando o hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada (60 gL^{-1} xilose) foi suplementado com sulfato de amônio (1,5 gL^{-1}), cloreto de cálcio (0,75 gL^{-1}) e extrato de farelo de arroz (8,75 gL^{-1}). É importante destacar que estes compostos são usados convencionalmente como suplementos nutricionais na produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (SILVA et al., 2005; SILVA; FELIPE, 2006; ARRUDA et al., 2011; ARRUDA et al., 2017) e recentemente a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana (HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016).

2.5.1 Co-substratos na produção biotecnológica de xilitol

A utilização de co-substratos é uma estratégia complementar ao controle do fornecimento de oxigênio e formulação do meio de fermentação para superar o problema da restrição na regeneração de NADPH e seu impacto negativo na bioconversão de xilose em xilitol. Esta estratégia se baseia na possibilidade de que o metabolismo simultâneo do co-substrato e da xilose permita manter o suprimento de NADPH e atender a demanda por energia e intermediários carbonados para o crescimento e manutenção celular, uma vez que estes são insuficientemente fornecidos a partir só do consumo de xilose em condições de limitação de oxigênio (KIM; RYU; SEO, 1999; TAMBURINI et al., 2010). Embora os hidrolisados hemicelulósicos contem junto à xilose outras fontes de carbono, como a glicose e arabinose, estas poderiam não funcionar como co-substratos apropriados, devido a que a maioria de leveduras conhecidas assimilam xilose só após do consumo de glicose e a redução da concentração desta níveis basais (KIM; RYU; SEO, 1999; TAMBURINI et al., 2010), e também à pobre assimilação da arabinose (SILVA; FELIPE, 2006).

O uso sequencial de glicose e xilose é um dos principais gargalos para a eficiente bioconversão de hidrolisados hemicelulósicos em xilitol. Este problema tem sido atribuído à concorrência por sistemas de transportes entre estes açúcares, e a inibição que a glicose exerce sobre maquinaria enzimática para a assimilação da xilose (ZHANG, G. et al., 2015; HOU et al., 2017). Estratégias vem sendo estudadas para superar este gargalo mediante a eliminação da repressão da glucose extracelular sobre o consumo de xilose, através do desenvolvimento de transportadores com maior afinidade por xilose que por glicose ou insensíveis a esta hexose (ZHANG, G. et al., 2015; HOU et al., 2017).

A utilização de uma fonte de carbono suplementar como co-substrato se apresenta como uma estratégia sustentável para a melhoria da produção de xilitol considerando que subprodutos agroindustriais poderiam ser aproveitados, os quais contribuiriam também como fonte de nutrientes e, portanto, substituiriam nutrientes mais custosos (TAMBURINI et al., 2010). É importante salientar a falta de informação na literatura consultada a respeito da utilização de co-substratos na produção de xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos, sendo que nos poucos trabalhos encontrados foram empregados meios de cultura definidos, como nas pesquisas com cepas nativas de *C. guilliermondii* FTI 20037 (ARRUDA; FELIPE, 2009) e *Candida tropicalis* (TAMBURINI et al., 2010), e com leveduras recombinantes, como *Scheffersomyces stipitis* PXM-4 (antes *Pichia stipitis*) (KIM et al., 2001), *C. tropicalis*

BSXDH-3 (KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006), *Debaryomyces hansenii* DBX 11 (PAL et al., 2013), *Kluyveromyces marxianus* YZJ015 (ZHANG et al., 2014) e *Saccharomyces cerevisiae* (OH et al., 2013).

No caso das leveduras recombinantes, as modificações realizadas foram a supressão da expressão da enzima XDH em cepas naturalmente assimiladoras de xilose (KIM et al., 2001; KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006; PAL et al., 2013; ZHANG et al., 2014) e a expressão só da XR em *S. cerevisiae* (OH et al., 2013). Em ambos casos as leveduras são incapazes de metabolizar o xilitol formado, atingindo assim eficiências de bioconversão próximas a 100 %, mas tornando necessário a adição de um co-substrato como fonte de carbono, energia e, particularmente, de cofator reduzido para XR. Os co-substratos selecionados nestes casos foram glicerol (KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006; PAL et al., 2013; ZHANG et al., 2014), ácido glucônico (KIM et al., 2001) e celobiose (OH et al., 2013).

Quanto aos estudos com cepas nativas de *C. tropicalis* (TAMBURINI et al., 2010) e *C. guilliermondii* FTI 20037 (ARRUDA; FELIPE, 2009), os compostos selecionados como potenciais co-substratos por seu efeito benéfico na bioconversão de xilose em xilitol em meio semidefinido foram a maltose e o glicerol, respectivamente. No estudo de Tamburini et al. (2010) foi constatado que o fornecimento de maltose em uma relação 1:5 de maltose:xilose incrementou o crescimento celular e a formação de xilitol em aproximadamente 30% em comparação com ausência de co-substratos, atingindo-se um $Y_{P/S}$ de 0,56 gg^{-1} e Q_P de 0,58 $gL^{-1}h^{-1}$. Além disto, os autores destacaram que o consumo de xilose não foi prejudicado pela assimilação simultânea da maltose (TAMBURINI et al., 2010). Já Arruda e Felipe (2009) reportaram que a adição de glicerol (0,7 gL^{-1}) em um meio contendo xilose (55 gL^{-1}) resultou no aumento do $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,74 gg^{-1} e 0,84 $gL^{-1}h^{-1}$ para 0,78 gg^{-1} e 1,13 $gL^{-1}h^{-1}$, respectivamente.

É importante destacar que dados de pesquisa apoiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2013/27142-0) e recentemente divulgados (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016) apontaram para o efeito benéfico da sacarose como co-substrato na produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cana. Nesta pesquisa a utilização de sacarose (10 gL^{-1}) como suplemento nutricional do hidrolisado (contendo 57 gL^{-1} de xilose) resultou em aumentos significativos de 8,88% na velocidade volumétrica de consumo de xilose (1,11 $gL^{-1}h^{-1}$), 12,88% na concentração final de xilitol (36,11 gL^{-1}) e 8,69% na Q_P (0,75 $gL^{-1}h^{-1}$), em relação às fermentações com emprego do hidrolisado hemicelulósico não suplementado com

este dissacarídeo (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016). Baseado nestes resultados, os autores propuseram a utilização de fontes complexas de sacarose, como o melaço de cana, como suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, como estratégia para melhoria do desempenho fermentativo da levedura e redução do custo deste bioprocesso (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016).

O melaço de cana é um subproduto do setor sucroalcooleiro obtido durante o processo de cristalização e centrifugação do caldo concentrado para obtenção de açúcar (40 – 60 kg/tonelada cana processada), correspondente ao licor do qual não pode ser mais extraída sacarose pelos métodos convencionais (RAMBLA et al., 1999; MEZAROBA; MENEGUETTI; GROFF, 2010; DUARTE-ALMEIDA et al., 2011). O melaço de cana tem um conteúdo aproximado de 60% de açúcares redutores totais e 83 ºBx (MELAÇOS BRASILEIROS, 2019). Segundo Liu et al. (2008), o preço do melaço de cana seria de aproximadamente 0,10 USD por kg.

O melaço é considerado um substrato relativamente econômico e abundante por seu alto conteúdo de carboidratos, principalmente sacarose (25–50% m/v) (CAZETTA et al., 2007 MEZAROBA; MENEGUETTI; GROFF, 2010; DAI et al., 2015). Além de carboidratos, o melaço contribui como fonte de compostos nitrogenados (como aminoácidos, ácidos nucleicos e proteínas), ácidos carboxílicos, fenóis, sais inorgânicos (principalmente de Mg, Ca, K, Fe e Na) e vitaminas (como riboflavina, ácido pantotênico, inositol e biotina), bem como produtos da transformação dos componentes naturais do suco, como furfural e precursores de melanoidinas que podem ser tóxicos (RAMBLA et al., 1999). Este subproduto já foi utilizado como meio de cultura na produção de etanol de primeira geração e em pesquisas para obtenção de vários bioprodutos, a exemplo de sorbitol (CAZETTA et al., 2005), ácido cítrico (LIU et al., 2008) e 2,3-butanediol (DAI et al., 2015).

2.6 Engenharia metabólica para melhoria da bioconversão de xilose em xilitol

As principais estratégias encontradas na literatura para engenharia das vias metabólicas envolvidas na bioconversão de xilose em xilitol são revisadas e os resultados resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados obtidos a partir da aplicação de estratégias de engenharia metabólica para melhoria da bioconversão de xilose em xilitol

Micro-organismo	Características	Xilose inicial (gL^{-1})	$Y_{P/S}$[1] (gg^{-1})	Q_P[2] ($gL^{-1}h^{-1}$)	Referência
Redução da expressão ou atividade da enzima XDH					
C. tropicalis ARSdR-16	Mutação do gene *xyl2* para atenuação de 60% da atividade XDH	50	0,69	0,62	Ko et al., 2011
S. stipitis PXM-4	Delecão da XDH, ácido glucônico como co-substrato, em batelada alimentada	50	0,92	0,42	Kim et al. 2001
C. tropicalis BSXDH-3	Delecão da XDH e glicerol como co-substrato	50	0,98	3,23	Ko, Kim, J., Kim, J.H., 2006
D. hansenii DBX-11	Delecão da XDH e glicerol como co-substrato	60	0,96	2,34	Pal et al., 2013
K. marxianus YZJ017	Expressão heteróloga de XR de *N. crassa*, delecão da XDH e glicerol como co-substrato	50	1,01	1,04	Zhang et al., 2014
Expressão heteróloga da enzima XR					
C. glycerinogenes WL2002-5	Expressão heteróloga de XR de *S. stipitis* sob controle do pGAPDH	100	0,99	0,81	Zhang, C. et al. (2015)
C. tropicalis LNG2	Expressão heteróloga de XR de *N. crassa* sob controle do pGAPDH, deleção da XDH, glicose como co-substrato	50	0,96	1,44	Jeon et al. (2012)
S. cerevisiae Sc-H2	Expressão heteróloga de xilanase, β-xilosidase e XR, glicose como co-substrato	3 (Xilana)	0,71	0,01	Li et al. (2013)
Aumento da disponibilidade do cofator NADPH					
S. cerevisiae D-10-BT-ScZWF1	Expressão heteróloga de transportador de celodextrina e de uma β-glicosidase, XR e G6PDH, celobiose como co-substrato	100	1,0	0,52	Oh et al. (2013)
S. cerevisiae BJ3505/δXR	Super expressão da G6PDH e 6PGDH, expressão heteróloga de XR, glucose como co-susbtrato em batelada alimentada	100	0,86	2,0	Kwon et al. (2006)
C. tropicalis BSXDH-3-PP	Super expressão da G6PDH e 6PGDH, deleção da XDH, glicerol como co-substrato	50	1,0	1,25	Ahmad et al. (2012)
S. cerevisiae YJO-12	Expressão heteróloga de XR de *S. stipitis*, redução da expressão da PGI, glucose como co-susbtrato em batelada alimentada	100	1,0	-	Oh et al. (2007)
Expressão heteróloga de transportadores de xilose					
C. tropicalis LXT2	Expressão heteróloga de transportador de xilose de *A. thaliana*, de XR *de N. crassa* e deleção de XDH	50	1,0	1,14	Jeon et al., (2013)

[1]**$Y_{P/S}$:** Fator de conversão de xilose em xilitol; [2]**Q_P:** Produtividade volumétrica de xilitol
Fonte: Arquivo próprio

2.6.1 Redução da expressão ou atividade da enzima XDH

A expressão e/ou funcionalidade da enzima XDH pode ser parcial ou totalmente reduzida, com o objetivo de diminuir a oxidação de xilitol a xilulose e assim favorecer o acúmulo deste poliol (KO et al., 2011; PAL; MONDAL; SAHOO, 2016). De acordo com Ko et al. (2011), esta estratégia permitiria não só a melhoria da eficiência de bioconversão, mas também a eliminação da necessidade do controle rigoroso do fornecimento de oxigênio. Estes autores demonstraram que uma atenuação de 60% na atividade de XDH em *C. tropicalis*, devido a mutações pontuais na região de ligação ao NAD^+ desta enzima, resultou em aumentos de 21% e 16% no $Y_{P/S}$ e Q_P (KO et al., 2011).

Conforme mencionado previamente, foi demonstrado para as leveduras *S. stipits* PXM-4 (KIM et al., 2001), *C. tropicalis* BSXDH-3 (KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006), *D. hansenii* DBX-11 (PAL et al., 2013) e *K. marxianus* YZJ015 (ZHANG et al., 2014) que a supressão total da expressão da XDH resultou em valores de $Y_{P/S}$ equivalentes a eficiências próximas a 100% em meios definidos, com a necessidade de suplementação de um co-substrato, a exemplo do glicerol (KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006; PAL et al., 2013; ZHANG et al., 2014) o ácido glucônico (KIM et al., 2001).

2.6.2 Aumento da expressão da enzima XR.

A atividade da enzima XR pode ser melhorada através do aumento da expressão da enzima nativa ou por inserção heteróloga, com a finalidade de favorecer a redução da xilose em xilitol e consequentemente aumentar a produtividade volumétrica deste bioproduto (PAL; MONDAL; SAHOO, 2016). Segundo a revisão realizada por Su et al. (2013), muitos genes de XR já foram caracterizados, clonados e expressados, mas a eficiência catalítica da maioria dos descritos não é alta. Uma estratégia para aumentar a expressão da XR pode ser a substituição do promotor nativo desta enzima induzido por xilose por um promotor constitutivo forte, como o da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (pGAPDH). Zhang, C. et al. (2015) e Jeon et al. (2012) encontraram altos níveis de expressão de enzimas XR provenientes de *S. stipitis* e *Neurospora crassa* em *Candida glycerinogenes* e *C. tropicalis*, respectivamente, utilizando o promotor pGAPDH nativo das cepas receptoras, o que resultou em aumentos na Q_P de até 73%, em comparação com a cepa parental (JEON et al., 2012).

Cepas nativas de *S. cerevisiae* não são capazes de utilizar xilose como fonte de carbono devido à baixa expressão dos genes envolvidos na assimilação desta pentose (PAL; MONDAL; SAHOO, 2016). Vários estudos demonstraram a possibilidade de expressão heteróloga da enzima XR em *S. cerevisiae*, a exemplo de trabalho realizado por Oh et al. (2013). No estudo destes autores, o gene que codifica a enzima XR originária de *S. stipitis* foi expresso em conjunto com os genes de um transportador de celodextrina e de uma β-glicosidase intracelular, visando a assimilação simultânea de xilose e celobiose pela levedura em meio definido, em razão da não concorrência por transportadores, o que possibilita a utilização de celobiose para regeneração do NADPH pela levedura. Com a implementação desta estratégia junto ao melhoramento de sistemas de regeneração de NADPH, foi possível atingir valores de eficiência de bioconversão e produtividade volumétrica de xilitol de 100% e 1,5 $gL^{-1}h^{-1}$, respectivamente (OH et al., 2013). Destaca-se também o estudo realizado por Li et al. (2013), no qual foi proposta a produção de xilitol a partir de xilana utilizando glicose como co-substrato, mediante expressão de xilanase, β-xilosidase e XR em *S. cerevisiae*, conseguindo-se um fator de conversão de 0,71 g xilitol por 1g xilana.

2.6.3 Aumento da disponibilidade do cofator NADPH

Estratégias complementares já foram aplicadas para favorecer indiretamente a atividade da enzima XR mediante o incremento da eficiência da regeneração do NADPH. Considerando que a principal via metabólica de produção deste cofator é a fase oxidativa da via PPP (BRUINENBERG; VAN DIKJEN; SCHEFFERS, 1983), os alvos principais de modificação genética neste caso são as enzimas G6PDH e a 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6PGDH). Pesquisas quanto a super expressão destas duas enzimas resultaram em aumentos de 20% (KWON et al., 2006) e 25% (AHMAD et al., 2012) na Q_P. Nestes estudos foram empregadas cepas recombinantes de *S. cerevisiae* BJ3505/δXR, com expressão heteróloga de uma enzima XR de *S. stipitis* (KWON et al., 2006), e *C. tropicalis* BSXDH-3, com atividade XDH interrompida (AHMAD et al., 2012).

Por outro lado, alguns autores sugeriram que apenas a super expressão das enzimas G6PDH e 6PGDH seria insuficiente para aumentar o fluxo de carbono pela via PPP, o qual impediria uma melhoria efetiva da regeneração de NADPH (KWON et al., 2006; KIM et al., 2011). De acordo com Oh et al. (2007), uma estratégia neste sentido seria a interrupção parcial ou total do fluxo de carbono pela via glicolítica a partir da glicose 6-fosfato, a qual é

o substrato da enzima G6PDH na via PPP, mediante redução parcial ou total da enzima Fosfoglicoisomerase (PGI), responsável pela isomerização da glicose 6-fosfato a frutose 6-fosfato. Estes autores reportaram um aumento de 48% na Q_P mediante diminuição na expressão da enzima PGI através da substituição do promotor nativo e super expressão da G6PDH na cepa recombinante *S. cerevisiae* YJO-12, com expressão heteróloga de uma enzima XR de *S. stipitis*, em comparação com a cepa parental (OH et al., 2007).

2.6.4 Expressão heteróloga de transportadores de xilose

O transporte de xilose ao interior da célula pode ser um passo limitante para a assimilação de xilose e produção de xilitol, pelo qual estudos vêm sendo realizados para aumentar a velocidade de transporte, principalmente em meios com mistura de açúcares, como os hidrolisados hemicelulósicos (SU et al., 2013; PAL; MONDAL; SAHOO, 2016). Na maioria das leveduras assimiladoras de xilose, o transporte desta pentose envolve um sistema de difusão facilitada de alta capacidade e baixa afinidade e um sistema simporte com prótons de baixa capacidade e alta afinidade (PAL; MONDAL; SAHOO, 2016). De maneira geral, glicose e xilose competem pelos mesmos sistemas de transporte, porém estes têm maior afinidade pela hexose que pela pentose, portanto a glicose é consumida primeiro e a assimilação de xilose pode ser inibida em função da concentração da hexose (JEON et al., 2013; PAL; MONDAL; SAHOO, 2016).

De acordo com Dmytruk et al. (2008), já foi estabelecido que os genes *sut*1 de *S. stipitis* e *gxf*1 de *C. intermedia* codificam para transportadores constitutivos de glicose e xilose, respectivamente. Diferente destes transportadores, que apresentam baixa afinidade por xilose, foi identificado um transportador simporte de alta afinidade em *C. intermedia* denominado GXS1 (DMYTRUK et al., 2008). A expressão heteróloga dos transportadores GXF1, SUT1 e AT5G59250 (este isolado de *Arabidopsis thaliana*) foi comparada em uma cepa de *S. cerevisiae*, demonstrando que a introdução do transportador GXF1 na levedura levou à obtenção de maiores taxas de transporte de xilose e de crescimento em xilose (RUNQUIST; HAHN-HÄGERDAL; RADSTROM, 2010).

Por sua vez, Jeon et al. (2013) avaliaram a expressão heteróloga e a otimização de códons do transportador de xilose AT5G59250 de alta afinidade de *A. thaliana* em uma cepa recombinante de *C. tropicalis*, modificada previamente pela inserção da XR de *N. crassa* e interrupção da XDH nativa, sendo verificado um aumento entre 37 e 73% na assimilação de

xilose em função da proporção glicose:xilose (0:1 e 1:2) e aumento de 25% na Q_P. É importante destacar que a expressão heteróloga do transportador não teve efeitos significativos sobre o consumo simultâneo de glicose e xilose, havendo, portanto, a necessidade de adição de glicose por pulsos para ser usada como co-substrato (JEON et al., 2013).

Zhang, J. et al. (2015) estudaram o favorecimento do transporte de xilose e da produção de xilitol na cepa *K. marxianus* YZJ074 com atividade XDH interrompida e expressão da XR de *N. crassa*, mediante super expressão do gene da aquagliceroporina (*KmFPS1)*, e a expressão heteróloga dos genes simporte e facilitador de glicose/xilose (*CiGXS1* e *CiGXF1*, respectivamente) isolados de *C. intermedia*. A super expressão do *KmFPS1* não melhorou o $Y_{P/S}$ ou a Q_P, no entanto, favoreceu o consumo do glicerol que foi empregado como co-substrato (ZHANG, J. et al., 2015). A expressão dos outros dois genes de transportadores em associação com operação em batelada alimentada permitiram aumentar a produção de xilitol em 150% (ZHANG, J. et al., 2015). Foram verificados valores de $Y_{P/S}$ equivalentes a eficiências de 100% de bioconversão e de Q_P de 4,14 $gL^{-1}h^{-1}$ e 2,81 $gL^{-1}h^{-1}$ a 42 ºC e 45 ºC, respectivamente (ZHANG, J. et al., 2015).

Estudos focados na cofermentação de xilose e glicose para a produção de etanol identificaram transportadores de hexose que podem ser modificados para aumentar sua afinidade com a xilose e até mesmo tornarem-se insensíveis à glicose. Farwick et al. (2014) encontraram posições de aminoácidos em transportadores de hexose de levedura que podem ser mutados para produzir transportadores de xilose insensíveis à glicose. O transportador Gxs1 de *C. intermedia* foi modificado para alterar a afinidade da xilose à glicose e para aliviar a inibição da glicose (YOUNG et al., 2012; LI; SCHMITZ; ALPER, 2016).

2.7 Técnicas moleculares para engenharia da via metabólica

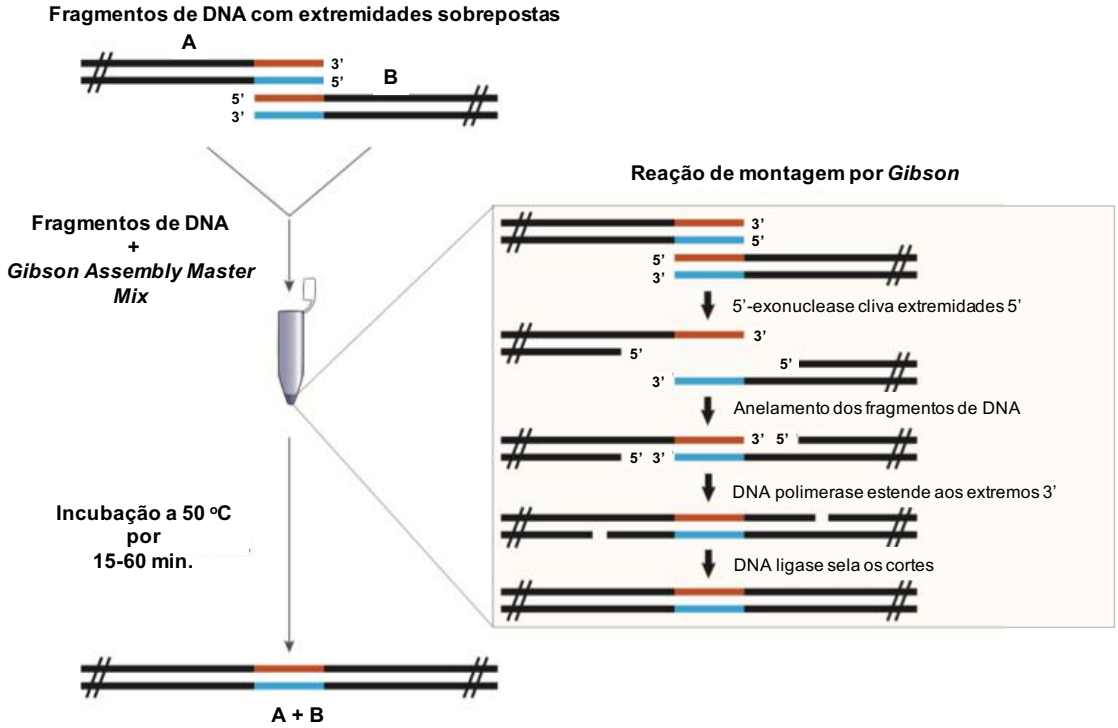
2.7.1 Construção e integração do cassete de expressão ou deleção

A primeira ferramenta necessária para recombinação genética é a montagem de diferentes sequências de DNA em um cassete de expressão, a qual pode ser realizada usando métodos baseados em sequências restritas por sítios de enzimas de restrição, integrases ou clonases, ou em recombinação homóloga (TSAI et al., 2015). Este último grupo tem sido amplamente utilizado em pesquisas com leveduras, principalmente *S. cerevisiae,* a qual

apresenta uma alta atividade de recombinação homóloga. Neste caso as construções podem ser integradas no local alvo do genoma da levedura mediante o desenho de extremidades 5´e 3´ homólogas às sequências flanqueadoras, juntamente com a adição de um marcador de seleção (TSAI et al., 2015).

O método mais conhecido para montagem de sequências de DNA por recombinação homóloga *in vitro* é o denominado *Gibson Assembly* (TSAI et al., 2015). Segundo Gibson et al. (2009), este método se baseia em uma reação isotérmica com o emprego de 3 enzimas para a montagem de múltiplas sequências de DNA sobrepostas: a T5 exonuclease para criar saliências de cadeia simples no sentido 5' – 3', a *Phusion*® DNA polimerase para preencher os espaços após a hibridação das regiões homólogas e a *Taq* DNA ligase para unir as extremidades através de ligação fosfodiéster (Figura 6). De acordo com estes autores, todos os reagentes e enzimas são comercialmente disponíveis, podendo ser armazenados a -20 ºC até sua utilização, que basicamente corresponde à mistura destes com as sequências de DNA sobrepostas e a incubação a 50 ºC entre 15 e 60 min, dependendo do número de fragmentos a serem unidos. Este método é útil para montagem de múltiplas sequências em um vetor de transformação sem depender da disponibilidade de sítios de restrição (GIBSON et al., 2009).

Figura 6 - Esquema de recombinação homóloga em uma única reação isotérmica pela metodologia de *Gibson Assembly*.



Fonte: Tomado e traduzido de New England BioLabs Inc. (2018)

Apesar da alta taxa de sucesso na montagem de DNA com os métodos baseados em recombinação homóloga, estes podem apresentar falhas quando existem sequências de alta similaridade entre os fragmentos a serem integrados (TSAI et al., 2015). A este respeito, métodos baseados em sequências restritas podem ser favoráveis, tais como a clonagem Golden Gate, Golden Braid e Master, os quais são considerados eficientes e flexíveis, empregando enzimas de restrição tipo IIS (TSAI et al., 2015). Este tipo de enzimas reconhece sequências assimétricas específicas e criam saliências de 4 bases, nas quais consecutivamente podem ser ligados os fragmentos de interesse mediante a utilização de uma ligase (TSAI et al., 2015).

Ainda em relação aos cassetes de expressão, estes podem ser montados e amplificados *in vitro* mediante Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para serem posteriormente usados na transformação de micro-organismos, ou podem ser montados e/ou amplificados *in vivo* empregando vetores de expressão, os quais convencionalmente são plasmídeos. A clonagem e amplificação *in vivo* permite diminuir a possibilidade de introdução de erros nas sequências amplificadas, em comparação com os métodos baseados na amplificação *in vitro* por PCR, o qual, além de apresentar maior probabilidade de introdução de erros, também tem limitações para amplificação de fragmentos com tamanho superior a 10 kb (MERRYMAN; GIBSON, 2012).

Os vetores de expressão usualmente apresentam em sua estrutura sequências de DNA correspondentes a elementos de regulação da expressão gênica, como promotores, terminadores, assim como marcadores de seleção e sítios de restrição definidos para inserção do gene de interesse usando nucleases (KLINNER; SCHAFER, 2004). Os vetores podem estar baseados em plasmídeos autoreplicantes ou integrativos. Os autorreplicantes (também chamados de episomais) podem ser replicados, transcritos e traduzidos independente de sua integração no genoma, o que pode resultar em maior eficiência que os integrativos, devido a não necessidade do passo de recombinação homóloga, porém podem ter menor estabilidade (BACKER et al., 1999; KLINNER; SCHAFER, 2004). Já no caso dos integrativos, há possibilidade de maior homogeneidade na população, maior estabilidade mitótica, com consequente menor perda do genótipo transformante, sem requerer a pressão seletiva continua (SIDDIQUI; CHOKSI; SMOLKE, 2014; LÖBS; SCHWARTZ; WHEELDON, 2017).

Com relação à integração de vetores ou cassetes no genoma, ressalta-se que esta pode ocorrer por recombinação homóloga, direcionada para um *locus* específico em função da

presença de regiões de homologia na construção, ou por integração não-homóloga ou ilegítima (*Non-homologous End Joining* – NHEJ), na qual a inserção do vetor ou do cassete acontece de forma aleatória (KLINNER; SCHAFER, 2004; JANG et al., 2018). Estes sistemas atuam de forma independente e competitiva, sendo que na maioria das leveduras a NHEJ é dominante sobre a integração homóloga, a exemplo de *Yarrowia lipolytica*, enquanto que em outras a integração homóloga é dominante sobre a NHEJ, como é o caso de *S. cerevisiae* (LÖBS; SCHWARTZ; WHEELDON, 2017; JANG et al., 2018). No caso de *C. tropicalis*, a eficiência de integração homóloga aumenta proporcionalmente com o incremento do tamanho das regiões de homologia (KLINNER; SCHAFER, 2004). Mesma relação foi encontrada por Millerioux et al. (2011) em *M. guilliermondii*, trabalho no qual foram avaliadas regiões de homologia de até 2 kb. Ressalta-se também que a taxa de ocorrência da NHEJ pode ser diminuída mediante interrupção dos genes *ku70* e *ku80* (LÖBS; SCHWARTZ; WHEELDON, 2017), conforme realizado por Foureau et al. (2013) em *C. guilliermondii*. É importante mencionar também que a linearização de plasmídeos integrativos aumenta consideravelmente a eficiência de transformação, de integração e a sua estabilidade (KLINNER; SCHAFER, 2004).

2.7.2 Marcas de seleção

Um elemento essencial para o sucesso das modificações genéticas é a criação de cepas transformantes com uma marca de seleção definida (PAPON et al., 2013; MANCERA et al., 2019). As marcas de seleção estão baseadas principalmente na auxotrofia para algum nutriente, na resistência a agentes antimicrobianos ou na expressão de genes *reporter* (PAPON et al., 2013). Com relação às marcas auxotróficas, destaca-se o desenvolvimento de estratégias de transformação baseadas na alteração da expressão do gene *ura*3, o qual codifica a enzima Orotidina-5'-fosfato descarboxilase (OMP), a qual é o segundo passo da via de síntese de Uridina Monofosfato a partir de orotato, que faz parte do metabolismo das pirimidinas. Alterações na expressão do gene *ura3*, seja por deleção ou mutação do mesmo, causam deficiência na produção de uracila e uridina, requerendo a suplementação do meio de cultura com estes compostos, assim como menor sensibilidade ao ácido acético (PAPON et al., 2013). Além disto, a mutação no gene *ura*3 gera resistência aumentada ao ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA), permitindo às cepas transformantes crescer na presença deste composto, o qual possibilita a contra-seleção de cepas com o gene *ura3* funcional, uma vez

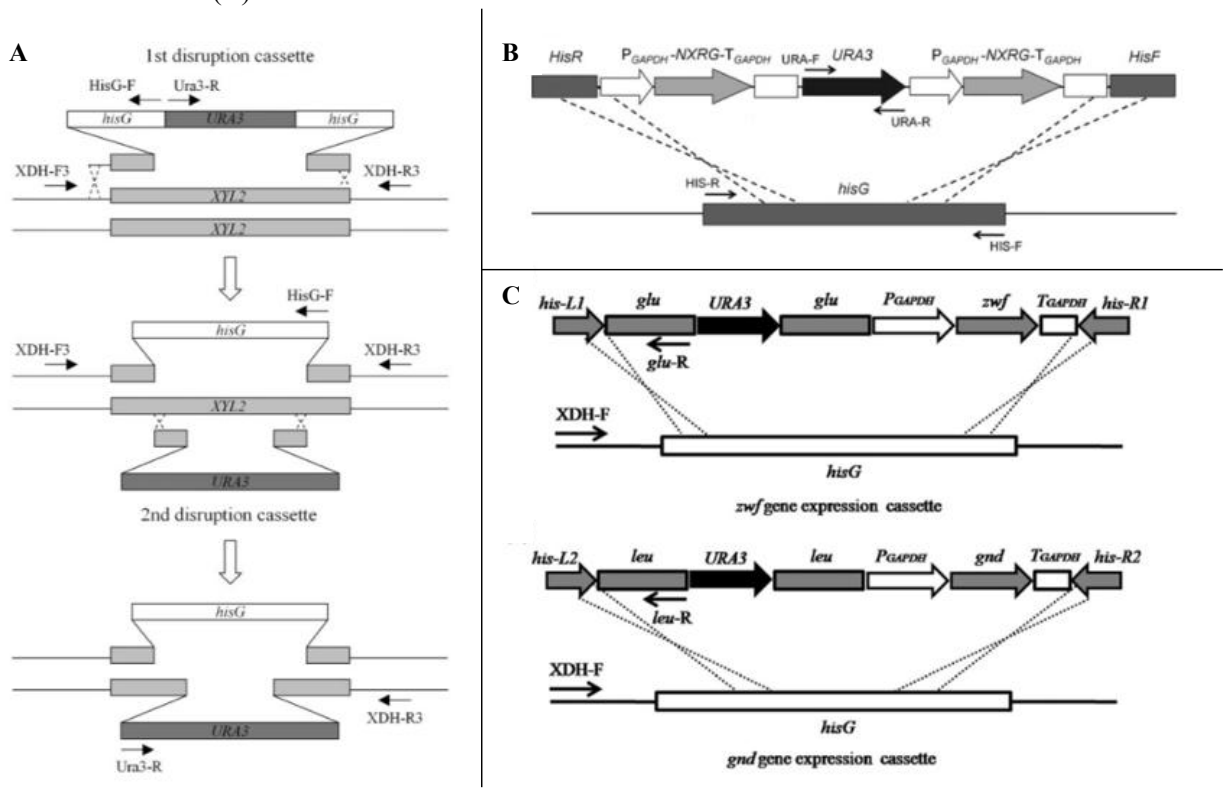
que em cepas selvagens a enzima OMP metaboliza este composto a fluorodeoxiuridina, o qual é tóxico para as células (PAPON et al., 2013).

As alterações no gene *ura3* podem ser causadas mediante mutagênese aleatória, por via química ou por exposição à luz UV (HASS et al., 1990; KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006; BORETSKY et al., 2007), por deleção total do gene ou por modificação do mesmo (FOUREAU et al., 2012). Esta marca de seleção é considerada reciclável, uma vez que este gene pode ser inserido em uma cepa mutante auxotrófica *ura*3^{-}, para reposição da característica prototrófica original, permitindo que cepas transformantes consigam crescer em meios sem suplementação de uracila e uridina, o qual pode ser empregado simultaneamente para a deleção de outro gene de interesse por substituição. A seguir, o gene *ura3* pode ser excisado de novo mediante contra-seleção em meio contendo 5-FOA, método conhecido como *ura3-blasting* (WILSON et al., 2000; KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006; PAPON et al., 2013). Segundo Mancera et al. (2019), quando um gene marcador (a exemplo do *ura3*) é incluído no vetor de transformação para repor uma auxotrofia, é recomendável que este seja exógeno, de forma a diminuir a probabilidade de inserção dentro do *locus* endógeno e a aumentar, portanto, a eficiência de recombinação no alvo pretendido. A exemplo disto, Boretsky et al. (2007) utilizaram o gene *ura3* de *S. cerevisiae,* após otimização de códons, para complementar cepas auxotróficas de *M. guilliermondii* para uracila.

Em trabalhos nos quais o gene *ura3* é empregado como ferramenta de reposição para deleção de genes por substituição, este é colocado flanqueado por sequências de DNA exógenas e repetidas, a exemplo das sequências *hisG* (derivada de *Salmonella* sp.), *lacZ* ou *loxP*, o qual é conhecido como o cassete *ura3-blaster* (WILSON et al., 2000; KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006). Esta montagem do cassete favorece a excisão (*pop-out*) do gene *ura3* por recombinação homóloga intracromossômica quando a cepa é cultivada na presença de 5-FOA (FONZI; IRWIN, 1993; WILSON et al., 2000; FOUREAU et al., 2012). Foureau et al. (2012) verificaram com esta estratégia frequências de recombinação homóloga entre 5 e 20% dos transformantes de *C. guilliermondii.* Entretanto, estes mesmos autores indicaram que a reciclagem desta marca de seleção pode causar perdas progressivas de eficiência de transformação. Com relação às sequências de DNA repetidas flanqueadoras do gene *ura3*, Wilson et al. (2000) sugeriram a utilização de sequências de 200 pb, uma vez que fragmentos de 1 kb poderiam causar excisão do *ura3* durante a amplificação do cassete ou do vetor *in vitro* por PCR.

Ainda com relação ao método de *ura3-blasting,* a sequência de DNA repetida localizada no genoma da levedura após a excisão do gene *ura3* pode ser reutilizada como *locus* alvo para transformações subsequentes, considerando que este só existe no genoma das cepas transformantes, conforme foi demonstrado nos trabalhos com *C. tropicalis* de Ko, Kim, J. e Kim, J.H. (2006) e Jeon et al., (2012) para deleção da XDH (Figura 7A) e expressão heteróloga da XR de *N. crassa* (Figura 7B), respectivamente. Além disso, o estudo de Ahmad et al. (2012) com esta mesma levedura permitiu constatar que a inserção das sequências exógenas repetidas nos dois alelos do gene inicialmente deletado permitiu a integração posterior de dois cassetes de expressão, um em cada alelo. Neste caso, os autores conseguiram a inserção de cassetes contendo os genes *zwf* e *gnd,* para super expressão das enzimas G6PDH e 6PGDH, respetivamente, sob controle do promotor constitutivo forte pGAPDH (Figura 7C).

Figura 7 - Esquema das estratégias empregadas para transformação sequencial usando o método de *ura3-blasting* de *C. tropicalis* para deleção de XDH (A), expressão heteróloga de XR (B) e de G6PDH e 6PGDH (C)



Fonte: A: Ko, Kim, J. e Kim, J.H. (2006); B: Jeon et al. (2012); C: Ahmad et al. (2012).

Marcas de seleção baseadas na inserção de genes exógenos para resistência a antimicrobianos ou genes *reporter* também são empregados na seleção de cepas

transformantes (PAPON et al., 2013). Entre os antimicrobianos que já foram testados como marcas de seleção em leveduras, destacam-se a higromicina, nourseotricina, fleomicina e zeocina (PAPON et al., 2013). Por outro lado, quanto aos genes *reporter*, já foram avaliados aqueles que codificam para as enzimas β-glucuronidases, β-galactosidases, cloranfenicol aciltransferases, luciferases, dentre outras (DEFOSSE et al., 2014). Entretanto, no caso das leveduras pertencentes ao grupo denominado CTG *clade*, como *C. tropicalis,* a expressão da proteína funcional codificada por estes genes depende da otimização de códons, principalmente do códon CTG, o qual nestas leveduras é traduzido preferencialmente como serina e não como leucina, que é a forma universal, a exemplo de *S. cerevisiae* (HARA et al., 2000; PAPON et al., 2012). No caso de *C. tropicalis*, o códon preferencial para leucina em é TTG (JEON et al., 2012). Uma alternativa que pode ser útil para as leveduras do CTG *clade* é o gene *reporter lac4*, que codifica a β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis*, pois os códons CTG nesta proteína ocupam posições conservadas cuja tradução errada a serina não geraria perda de atividade (DEFOSSE et al., 2014).

A otimização de códons pode ser feita mediante mutação sítio-dirigida ou síntese do gene. Exemplos da primeira destas ferramentas são os trabalhos de Boretsky et al. (2007) no qual os códons CTG do gene *ura3* isolado de *S. cerevisiae* foram otimizados para ser introduzido em *M. guilliermondii,* e de Hara et al. (2001), que fizeram similar para inserção do gene de resistência a higromicina em *C. tropicalis*. A este respeito, Basso et al. (2010) relataram que apenas a substituição por mutação sítio-dirigida dos códons CTG por códons alternativos para tradução de leucina, conforme feito por Hara et al. (2001), não foi suficiente para expressar uma proteína funcional e conferir resistência. Estes autores indicaram que foi necessária a síntese do gene de resistência à higromicina com todos os códons otimizados para os preferenciais em *C. tropicalis* para poder obter cepas mutantes resistentes a este antimicrobiano. De maneira similar, Jeon et al. (2012) demonstraram que a síntese do gene *xyl2* de *N. crassa* com códons otimizados para *C. tropicalis* foi eficiente para a expressão heteróloga deste gene.

A exemplo de trabalhos que empregaram marcas de seleção baseadas na inserção de genes exógenos em *C. tropicalis*, destaca-se o estudo recente de Mancera et al. (2019), no qual foi empregado o cassete dominante reutilizável SAT1, o qual fornece resistência a nourseotricina (400 $\mu g\ mL^{-1}$), para deleção dos dois alelos de um gene de interesse. Este cassete tem como principais particularidades que o gene *sat1* empregado tem apenas 1 códon CTG, bem como conter uma recombinase sítio-específica FLP sob controle de promotores

endógenos constitutivos ou induzíveis. Esta enzima é ativa em duas regiões de reconhecimento (FRT), que são colocadas como sequências repetidas flanqueando o cassete que tem o marcador de seleção, e permite controlar a remoção do marcador de seleção em função do promotor empregado.

2.7.3 Ferramentas para controle da expressão e edição gênica

O controle de expressão de genes alvo é uma das principais estratégias para modificações de vias metabólicas. Uma das ferramentas para este fim é a modulação da transcrição do gene de interesse mediante o uso de diversos promotores (HAMMER; MIJAKOVIC; JENSEN, 2006). A engenharia destes reguladores em leveduras tem sido baseada em promotores constitutivos conhecidos com diferentes níveis de expressão, a exemplo dos promotores da álcool desidrogenase (pADH), citocromo C1 (pCYC1) e o pGAPDH (TSAI et al., 2015). Mediante deleção ou duplicação de elementos dentro das sequências dos promotores podem ser construídas bibliotecas de promotores com diferentes capacidades de expressão (TSAI et al., 2015). Como exemplo deste tipo de estratégia, destaca-se o pGAPDH, que controla a expressão da GAPDH que é uma enzima envolvida na via glicolítica e é expressa constitutivamente em altos níveis. No estudo de Jeon et al. (2012) foi identificada a região promotora do gene que codifica esta enzima em *C. tropicalis*, com um tamanho de 1455 pb e com presença de estruturas conservadas na sequência tipo CAAT e TATA. Estes autores demonstraram que a redução no tamanho da sequência do promotor permitiu a construção de uma biblioteca de promotores com diferentes níveis de expressão da enzima heteróloga XR, isolada de *N. crassa*.

Por outro lado, o uso de promotores induzíveis é uma das formas mais simples para regular a expressão gênica, uma vez que esta pode ser controlada pelo emprego de níveis conhecidos do indutor (HAMMER; MIJAKOVIC; JENSEN, 2006; KEASLING, 2010), porém pode se apresentar hipersensibilidade do promotor e heterogeneidade nos níveis de expressão na população de células (HAMMER; MIJAKOVIC; JENSEN, 2006). Segundo Keasling (2010), apesar que já foram descritos muitos sistemas de promotores induzíveis para bactérias, há ainda poucos disponíveis para leveduras o que faz da regulação de vias metabólicas destes micro-organismos ainda um desafio.

Além do controle da expressão gênica, a edição de genes alvo é também uma estratégia para a modificação de vias metabólicas, a qual pode ser realizada através de

métodos de deleção, interrupção ou atenuação do gene, os quais são baseados em recombinação homóloga e dependente de marcadores de seleção (TSAI et al., 2015). Uma das técnicas para o estudo de efeitos mutagênicos *in vivo*, como deleção ou atenuação de genes, é a substituição gênica por doação, a qual permite que sequências gênicas nativas sejam substituídas por sequências mutadas ou por outros genes mediante recombinação homóloga (ROITGRUND; STEINLAUF; KUPIEC, 1993). De acordo com estes autores, esta técnica se baseia na possibilidade de que um cassete ou plasmídeo linearizado seja utilizado para substituir a sequência homóloga dentro do cromossomo alvo, com o qual já foram encontradas frequências de transformação de até 1,5% dos transformantes. No caso de *C. tropicalis,* a aplicação desta técnica permitiu a deleção dos dois alelos do gene *xyl2* com cassetes *ura3-blaster*, de forma que nos *loci* do *xyl2* ficou uma sequência exógena repetida *hisG* na cepa modificada (KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006). Posteriormente, esta cepa foi utilizada como hospedeira para super expressão dos genes *zwf* e *gnd* nos *loci* do *xyl2* mediante substituição gênica com cassetes contendo estes genes em frame com o gene *ura3* e regiões de homologia para a sequência *hisG* (AHMAD et al., 2012).

Outra técnica de edição gênica é a mutagênese sítio-dirigida, a qual permite a substituição de resíduos de aminoácidos específicos em proteínas mediante modificação do gene correspondente, de forma tal a modificar a estrutura e/ou interromper a atividade de uma enzima (PERACCHI, 2001). Entre as metodologias aplicadas para este tipo de mutação, destaca-se a técnica de *Overlap Extension PCR* na qual dois fragmentos da sequência alvo são amplificados em reações paralelas de PCR utilizando em cada uma sequência iniciadora, regiões mutadas, as quais por complementariedade formarão um novo modelo de DNA, de maneira que o novo produto será amplificado durante a denominada *overlap extension* (URBAN; NEUKIRCHEN; JAEGER, 1997). A técnica de mutagênese sítio-dirigida foi empregada, por exemplo, para modificar a especificidade de cofator da enzima XDH de NAD^+ para $NADP^+$ de *S. stipitis* (WATANABE; KODAKI; MAKINO, 2005). Neste estudo foi possível a inserção de mutações em 4 sítios específicos da sequência do gene a partir de reações sequenciais de PCR, com o intuito de trocar aminoácidos específicos na região de ligação com o cofator da proteína.

É importante também mencionar as técnicas de mutagênese aleatória por via química, por exemplo com nitrosoguanidina (NTG), ou física, pela exposição à luz UV, já amplamente empregadas para seleção de cepas com fenótipos específicos a partir de alterações genéticas não definidas. Exemplos de mutagênese por NTG são os trabalhos de

Hass et al. (1990) e de Jeon, Shin e Rogers (2011), para a seleção de cepas de *C. tropicalis* auxotróficas para uridina (*ura3*$^{-}$), e com deficiência na assimilação de xilitol, respectivamente. Entretanto, mutações introduzidas em leveduras como *C. tropicalis* ou *Candida albicans* por mutagênese química ou por exposição a luz UV podem gerar cepas com múltiplas alterações não definidas, as quais não podem ser removidas por *backcrossing* pela falta de um ciclo sexual (FONZI; IRWIN, 1993). Assim, as consequências genotípicas e fenotípicas não podem ser antecipadas e podem também causar erros de interpretação com mutações de interesse (FONZI; IRWIN, 1993). Outro ponto a ser considerado com relação à mutagênese aleatória é a reversão da mutação através das gerações (HASS et al., 1990; HAMEDI et al., 2013). Por exemplo, Hass et al. (1990) demonstraram que cepas de *C. tropicalis ura3*$^{-}$ selecionadas após mutagênese com NTG apresentavam uma baixa frequência de reversão, resultado similar ao reportado por Hamedi et al. (2013), em cujo estudo cepas de *S. boulardii ura3*$^{-}$ foram selecionados usando a metodologia para mutagênese por exposição a luz UV.

Por fim, destaca-se a aplicação da tecnologia CRISPR-Cas9 para edição de genoma, a qual corresponde a um sistema para clivagem direcionada da dupla fita de DNA em um alvo específico, a partir do sistema encontrado em *Streptococcus pyogenes*, seguida pela reparação mediada pelas vias de integração homóloga ou NHEJ (LÖBS; SCHWARTZ; WHEELDON, 2017), previamente mencionadas. De acordo com a revisão realizada por estes autores, dois requerimentos são importantes para a expressão funcional do sistema CRISPR-Cas9 em leveduras: 1) um cassete de expressão Cas9 com códons otimizados e um sinal de localização nuclear; 2) uma sequência curta do RNA guia (RNAsg), o qual é responsável pelo direcionamento para o *locus* desejado e contém uma sequência estrutural para interação com a Cas9. Após a formação da ribonucleoproteína CRISPR-Cas9 e a localização da sequência alvo complementária a uma porção do RNAsg, o domínio nucleasse do Cas9 cliva as duas fitas de DNA (LÖBS; SCHWARTZ; WHEELDON, 2017). O reparo, após a clivagem da fita dupla, pode ser feito via *NHEJ*, resultando em inserções ou deleções aleatórias, ou via integração homóloga, a qual permite uma edição precisa do genoma se há um molde de homologia (LÖBS; SCHWARTZ; WHEELDON, 2017). O sistema CRISPR-Cas9 já foi empregado para modificar ou deletar genes e/ou integrar construções específicas sem marcas de seleção para diversas leveduras não convencionais, a exemplo de *C. albicans* (LÖBS; SCHWARTZ; WHEELDON, 2017; MANCERA et al., 2019).

2.7.4 Técnicas para transformação da levedura

Diversos métodos já foram avaliados para a transformação de leveduras, particularmente *S. cerevisiae*, correspondente à introdução do DNA exógeno dentro da célula para causar sua mutação genética. Kawai, Hashimoto e Murata (2010) realizaram uma revisão de literatura sobre métodos de transformação de *S. cerevisiae* e sua aplicação em outras leveduras, a exemplo de *Schizosaccharomyces pombe, Pichia pastoris* e *C. albicans*. Um dos métodos empregados em leveduras é o baseado na formação de esferoplastos a partir da digestão enzimática da parede celular da levedura, por exemplo com a enzima liticase, suspensão destes em uma solução tamponada de suporte osmótico, composta principalmente por sorbitol, e em contato com o DNA transformante (BURGERS; PERCIVAL, 1987; KAWAI; HASHIMOTO; MURATA, 2010). Quando empregado este método para *C. tropicalis*, eficiências de transformação entre 10^3-10^4 transformantes por µg de DNA plasmidial foram obtidas (HASS et al., 1990). Segundo a revisão realizada por Kawai, Hashimoto e Murata (2010), a frequência de transformação depende da concentração de esferoplastos e da quantidade de DNA empregado. Estes autores indicam que, apesar de poder atingir altos valores de eficiência e frequência de transformação, o método de esferoplastos não é comumente usado devido ao laborioso e complexo procedimento de regeneração dos transformantes.

Um dos métodos mais empregados para a transformação de células íntegras de leveduras é o químico baseado no emprego de acetato de lítio (LiAc), polietilenoglicol (PEG) e choque térmico (42 ºC), o qual foi usado por exemplo nos trabalhos de Ko, Kim, J. e Kim, J.H. (2006), Jeon et al. (2012) e Ahmad et al. (2012) com *C. tropicalis*. Segundo Kawai, Hashimoto e Murata (2010), o método químico é considerado mais rápido e simples que o método de esferoplastos, e não precisa de equipamentos especiais. Hass et al. (1990) relataram que a eficiência de transformação de *C. tropicalis* com método químico com emprego de LiAc resultou maior que o método de protoplastos, o qual no estudo de Rohrer e Picataggio (1992) teve eficiência comparável com a eletroporação. Ainda neste sentido, Boretsky et al. (2007) indicaram que não foi possível obter transformantes estáveis de *M. guilliermondii* (antes *Pichia guilliermondii*) quando empregado eletroporação e esferoplastos, e sim quando usado método químico com LiAc.

O método químico de transformação é baseado no aumento da permeabilidade da parede de células íntegras pelo tratamento com LiAc, PEG e o choque térmico (KAWAI; HASHIMOTO; MURATA, 2010; TRIPP et al., 2013). O cátion monovalente Li^+ favorece mais a eficiência de transformação que outros como Na^+, K^+, Rb^+, ou divalentes como Ca^{2+}, o qual pode estar relacionado ao efeito caotrópico moderado durante a transformação (KAWAI; HASHIMOTO; MURATA, 2010). Adicionalmente, o PEG é útil para favorecer a ligação do DNA transformante à superfície celular (KAWAI; HASHIMOTO; MURATA, 2010; TRIPP et al., 2013). A eficiência da transformação por este método é dependente também da utilização de células na fase *log* intermediária (KAWAI; HASHIMOTO; MURATA, 2010). Já foi também demonstrado que a adição de um DNA *carrier,* como timo de bezerro ou testículo de salmão, e de ditiotreitol (DTT), 2-mercaptoetanol, dimetil sulfóxido (DMSO) ou etanol melhoravam a eficiência da transformação (KAWAI; HASHIMOTO; MURATA, 2010; TRIPP et al., 2013). Segundo estes autores, este tipo de transformação promove a introdução do DNA exógeno na levedura através de uma invaginação da membrana tipo endocitose, mas não está claro como o DNA entra no núcleo, sendo hipotetizado que poderia ocorrer durante a mitose ou por fusão de endossomos com a membrana do núcleo.

A eletroporação é outro dos métodos amplamente empregados para transformação de leveduras. Backer et al. (1999) e Rohrer e Picataggio (1992) otimizaram as condições de eletroporação para *C. albicans* e *C. tropicalis*, respectivamente. Destaca-se que o estudo de Rohrer e Picattagio (1992) empregaram células íntegras na fase *log* intermediária, correspondente a uma densidade ótica a 600 nm entre 0,76 e 1,0 e uma concentração celular de 10^8 células mL^{-1}, sendo que na transformação empregaram uma quantidade de 10^7 células. Estes autores avaliaram massas do DNA transformante entre 1,0 e 6,0 µg, bem como a adição do denominado DNA *carrier*, cuja função não foi definida, porém demonstrando uma melhoria na eficiência de transformação de 25% ou 37% quando utilizadas massas de 1,0 ou 6,0 µg de DNA, respectivamente. Foi progressivamente encontrado que o LiAc (0,1 M), DTT (0,01 M) e sorbitol (1 M) melhoravam a eficiência de eletroporação em *S. cerevisiae* e *C. albicans*, relacionado com aumento da permeabilidade da parede celular ao DNA a ser inserido e o suporte osmótico da levedura durante e após a transformação (BACKER et al., 1999; KAWAI; HASHIMOTO; MURATA, 2010). Segundo a revisão feita por Klinner e Schafer (2004), a quantidade de DNA transformante é um dos fatores limitantes para a eficiência da transformação. De acordo com estes autores, quando são empregadas

quantidades de células entre 10^7–10^8, são utilizados entre 1–10 µg de DNA do vetor de interesse com tamanho próximo a 4 kb.

2.8 *Candida tropicalis*

C. tropicalis é uma levedura asporogênica dimórfica, pertencente à classe taxonômica *Hemiascomycetes*, e de amplo interesse médico, industrial e investigativo (CHAI; DENNING; WARN, 2010). Quanto à sua morfologia macroscópica, destaca-se a formação de colônias globosas ou ovoides, simples ou em pares, após cultivo por 72h, a 25 ºC em meio composto por glicose, extrato de levedura e peptona (YPD) (KURTZMAN; FELL, 2000). Nas mesmas condições de cultivo, a morfologia microscópica desta levedura comumente corresponde a células esferoidais ou elipsoidais, com gemulação multilateral, encontrando-se células individuais, pares, cadeias curtas ou inclusive formação de pseudo-hifas (BUTLER et al., 2009; CHAI; DENNING; WARN, 2010). Diferentes compostos podem ser utilizados como fonte de carbono e energia por esta espécie, tais como glicose, galactose, xilose, sacarose, maltose, celobiose, glicerol, etanol, entre outros (KURTZMAN; FELL, 2000). Adicionalmente, já foi relatado que *C. tropicalis* pode utilizar carboximetilcelulose e palha de trigo pré-tratada como fontes de carbono, devido à expressão de celulases e xilanases (MATTAM et al., 2016).

Entre as características particulares de *C. tropicalis*, destaca-se sua capacidade para metabolizar alcanos e ácidos graxos como únicas fontes de carbono e energia, com produção de ácidos dicarboxílicos de cadeia longa, os quais são matéria-prima importante na indústria química, mediante engenharia metabólica da via de β-oxidação (HASS et al., 1990; PICATAGGIO et al., 1992). *C. tropicalis* também se destaca por sua alta capacidade de conversão de xilose em xilitol em condições microaeróbicas (KYM; RYU; SEO, 1999; GRANSTRÖM; LEISOLA, 2002; TAMBURINI et al., 2010).

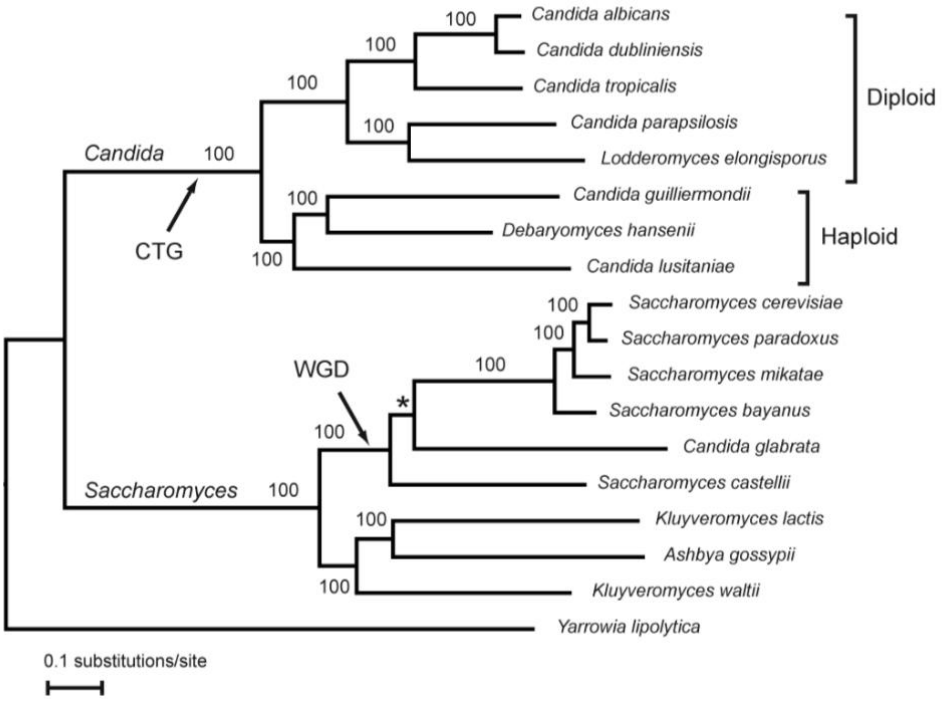
É importante ressaltar também que *C. tropicalis* é uma levedura diploide, não havendo registro de cepas haploides, e não tem um ciclo sexual conhecido (KURTZMAN; FELL, 2000; MANCERA et al., 2019). Estas características resultam em uma dificuldade intrínseca na modificação genética desta levedura, uma vez que as mutações recessivas, como os marcadores nutricionais de auxotrofia, devem ser introduzidas por transformação em ambos alelos do gene, de forma a gerar homozigotos recessivos que permita a expressão do fenótipo recessivo (FONZI; IRWIN, 1993; WILSON et al., 2000). O desenvolvimento

de cepas homozigotas tem sido feito mediante mutagênese aleatória por via química ou física (exposição à luz UV), bem como mediante transformações sequenciais com dois marcadores de seleção diferentes ou o mesmo marcador reciclável (FONZI; IRWIN, 1993; WILSON et al., 2000). Adicionalmente, destaca-se que o genoma de *C. tropicalis* já foi completamente sequenciado, constatando-se um tamanho aproximado de 14,5 Mb, aproximadamente 5920 genes com tamanhos médios de 1400 pb (BUTLER et al., 2009).

Outro desafio da modificação genética de *C. tropicalis* é o fato que nesta levedura o códon CTG é traduzido como serina e não como leucina, que é a forma convencional (BLANDIN et al., 2000; PAPON et al., 2012). As leveduras que apresentam esta característica são denominadas como parte do CTG *clade*, no qual também são agrupadas outras espécies do género *Candida*, como *C. albicans, C. guilliermondii, C. parapsilosis, C. dubliniensis, C. lusitaniae* e *C. auris* (MANCERA et al., 2019). A expressão de proteínas heterólogas nestas leveduras requer no mínimo da otimização do códon CTG no gene que codifica a proteína de interesse, conforme mencionado previamente. Na revisão feita por Papon et al. (2012) foram consideradas várias ferramentas moleculares para as leveduras do CTG *clade*, tais como marcadores de seleção dominantes, baseados na resistência a antimicrobianos e genes *reporter*. Entretanto, estes autores não contemplam marcas de auxotrofia por serem considerados como marcas recessivas. Destaca-se também que estes autores concluem que a eficiência das marcas de seleção foi favorecida em diversos estudos quando todos os códons dos genes avaliados foram otimizados, e também quando estes foram colocados sob controle de promotores e terminadores constitutivos fortes (PAPON et al., 2012).

Apesar de *C. tropicalis* se encontrar amplamente distribuída no ambiente natural e fazer parte da microbiota saprófita humana, é considerada um patógeno oportunista, uma vez que se encontra entre as 4 principais espécies envolvidas em aproximadamente 95% dos casos de candidíase (junto com *C. albicans, C. glabatra* e *C. parapsilosis*). *C. tropicalis* apresenta proximidade filogenética com estas outras espécies de gênero *Candida*, conforme apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Relação filogenética de *C. tropicalis* com outras leveduras do CTG *clade* e de interesse industrial e/ou acadêmico.



Fonte: Butler et al. (2009).

Por fim, é importante mencionar que em pesquisa recente de nosso grupo, desenvolvida paralelamente com o presente trabalho, foi constatado que a linhagem até então classificada como *C. guilliermondii* FTI 20037 corresponde verdadeiramente à espécie *C. tropicalis* (QUEIROZ, 2019). Assim foi confirmado mediante amplificação, sequenciamento e análise de alinhamento da região conservada ITS 1 (*Internal transcribed spacer*) e do gene *xyl1*, que codifica para a enzima XR, as quais mostraram 100% de identidade com sequências existentes para *C. tropicalis* no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information – NCBI*. Estes resultados corroboram os obtidos por Lima, Felipe e Torres (2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

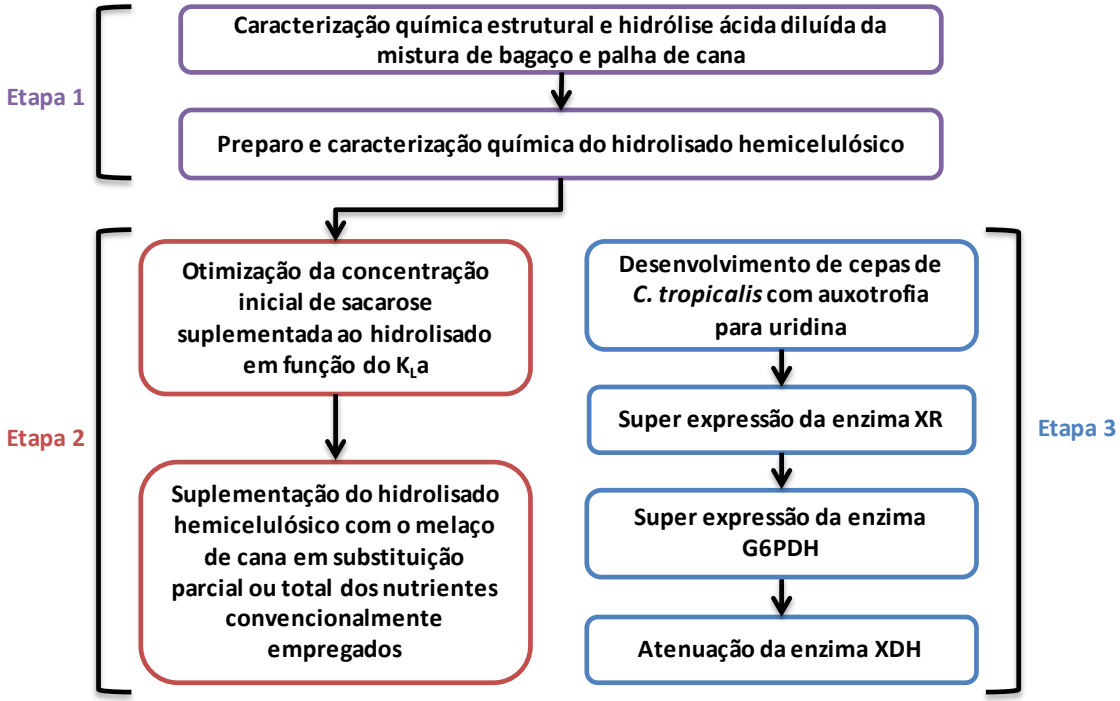
Contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de produção biotecnológica de xilitol baseada no aproveitamento do bagaço, palha e melaço de cana, visando a integração deste bioprocesso com os do setor sucroalcooleiro no contexto de uma biorrefinaria.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos dos fatores coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) e concentração inicial de sacarose sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. tropicalis,* em hidrolisado hemicelulósico obtido da mistura de bagaço e palha cana-de-açúcar, para maximização do fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica de xilitol.
- Estudar o efeito da suplementação do hidrolisado hemicelulósico obtido da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar com o melaço de cana em substituição parcial ou total dos suplementos convencionalmente empregados durante o cultivo de *C. tropicalis* para a produção de xilitol.
- Desenvolver cepas de *C. tropicalis* auxotróficas para uridina para ser empregada como hospedeira de transformações sequenciais para super expressão das enzimas xilose redutase, glucose-6-fosfato desidrogenase, e atenuação da enzima xilitol desidrogenase, e estudar o efeito na produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico obtido da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar.

Para cumprir com os objetivos propostos, a execução do presente projeto foi dividida em três etapas, conforme apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Fluxograma de trabalho proposto no presente projeto.



Fonte: Arquivo próprio.

Os experimentos correspondentes às etapas 1 e 2 foram realizados no Laboratório Fermentações II da EEL/USP, coordenado pela profa. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe, em cooperação com os laboratórios de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis, coordenado pelo prof. Dr. Sílvio Silvério da Silva; de Biopolímeros, Biorreatores e Simulação de Processos, coordenado pelo prof. Dr. Júlio César Santos, e de Absorção Atômica e Emissão Ótica, coordenado pelo professor Dr. Hélcio José Hizário Filho, todos da EEL/USP. Os métodos empregados e resultados atingidos são descritos e discutidos nos Capítulos 1 e 2 do presente trabalho. Por outro lado, os experimentos referentes à etapa 3 foram executados no Laboratório de Biologia Sintética e Molecular, sob coordenação do prof. Dr. Fernando Segato, também da EEL/USP. Os métodos utilizados e resultados obtidos são apresentados no Capítulo 3.

CAPÍTULO 1 - OBTENÇÃO E PREPARO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DA MISTURA DE BAGAÇO E PALHA DE CANA DE AÇÚCAR.

1.1 Introdução

A utilização de diversas biomassas lignocelulósicas como matérias-primas para a produção biotecnológica de xilitol vem sendo estudada na EEL/USP durante mais de duas décadas. Destaca-se o bagaço de cana como um dos principais protagonistas nestas pesquisas, em função da sua abundância e importância competitiva para o Brasil, devido à possibilidade de permitir a diversificação do portfólio de produtos da agroindústria da cana no contexto de biorrefinaria (LAGO et al., 2012; RENÓ et al., 2014). Ao bagaço vem progressivamente se somando a palha de cana, subproduto lignocelulósico obtido durante a colheita sem queima da cana, cuja disponibilidade vem aumentando desde 2007 em função da implementação deste tipo de colheita no país (LEAL et al., 2013; CARVALHO et al., 2016; LISBOA et al., 2019). Recentemente, pesquisas do grupo GMBIO da EEL/USP empregaram a palha de cana como matéria-prima para obtenção de xilitol por via biotecnológica (HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA, FELIPE, 2016; HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016). Com relação ao emprego da mistura de bagaço e palha de cana como matéria-prima neste bioprocesso, só foi encontrada na literatura uma pesquisa recente de nosso grupo (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2019b).

Os estudos na EEL/USP têm permitido estabelecer uma rota de etapas sucessivas para a conversão de matérias-primas com alto conteúdo de xilose em xilitol, o qual é um produto de alto valor agregado, com mercado crescente e importantes aplicações em diferentes segmentos industriais (SILVA; CHANDEL, 2012). As etapas definidas correspondem à solubilização da xilose contida na fração hemicelulósica da matriz lignocelulósica da parede celular vegetal, tratamento do hidrolisado obtido para aumento do conteúdo de xilose e redução de compostos potencialmente tóxicos ao micro-organismo, fermentação para conversão da xilose em xilitol, e por fim recuperação e purificação deste produto. Diversos métodos, configurações de processo e condições de operação já foram avaliados para cada umas das etapas indicadas, entre as quais algumas foram selecionadas por sua maior eficiência e/ou viabilidade técnica passando a serem convencionalmente empregadas nos diferentes estudos ao longo do tempo.

A esse respeito, a hidrólise ácida diluída tem sido amplamente explorada para a desconstrução da biomassa lignocelulósica e solubilização da xilose, a qual é considerada um método de baixo custo, efetivo e de fácil operação (RAO et al., 2006; KUMAR; SHARMA, 2017; ARCAÑO et al., 2018). Condições de operação deste processo já foram estudadas para bagaço (PESSOA Jr.; MANCILHA; SATO, 1997; RODRIGUES et al., 2010) e palha de cana separadamente (MOUTTA et al., 2012). De maneira similar, procedimentos de concentração à vácuo (RODRIGUES et al., 2003a) e destoxificação mediante ajuste de pH e adsorção com carvão ativado (MARTON et al., 2006) são convencionalmente empregados para o preparo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, em função de sua eficácia para aumentar a concentração de xilose redução a de compostos tóxicos, e operação relativamente simples. Estas etapas de preparo do hidrolisado já foram empregadas também em estudos de produção de xilitol a partir de palha de cana (HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA, FELIPE, 2016; HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016).

Assim, neste capítulo são discutidos os resultados da implementação das etapas de hidrólise ácida diluída, concentração à vácuo e destoxificação, em condições de operação convencionalmente empregadas para bagaço de cana e recentemente com palha, para a obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico da mistura destes dois subprodutos, visando sua utilização como meio de fermentação para conversão de xilose em xilitol por *C. tropicalis*. Adicionalmente, são explorados resultados relevantes quanto a caracterização química estrutural da matéria-prima. Por fim, são apresentados dados da caracterização parcial do melaço de cana-de-açúcar, cuja utilização como suplemento nutricional do hidrolisado foi proposto no presente trabalho e será discutida posteriormente no capítulo 2.

1.2 Material e métodos

1.2.1 Caracterização química da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar

O bagaço e a palha de cana foram doados pela Usina Pederneiras, Tietê, SP, na safra 2015/2016. A palha foi colhida diretamente no campo após a colheita, seca ao sol e moída mecanicamente. Após a secagem do bagaço ao sol, misturas 1:1 de bagaço e palha foram feitas (Figura 1.1) e estocadas à temperatura ambiente nas dependências da EEL/USP até sua utilização. A umidade da mistura de bagaço e palha de cana e destes materiais individualmente foi determinada mediante balança de peso seco rápido, com câmara de UV

a 105 °C. A mistura de bagaço e palha de cana, bem como estas biomassas individualmente, foram caracterizados quanto a seus polímeros estruturais, cinzas e extrativos baseado nos procedimentos analíticos estabelecidos pelo *National Renewable Energy Laboratory* - NREL (SLUITER et al., 2008a, b; SLUITER et al., 2011), conforme descrito a seguir.

Figura 1.1 - Fotografias da palha e bagaço de cana, e da mistura 1:1 destas biomassas

Palha de cana-de-açúcar **Bagaço de cana-de-açúcar** **Mistura de palha e bagaço de cana-de-açúcar**

Fonte: Arquivo próprio.

1.2.1.1 Determinação de extrativos

A granulometria dos materiais foi ajustada a 20 Mesh mediante peneiramento. Para determinação de extrativos, 1,4 g de cada biomassa em triplicata foram colocados em envelopes de papel filtro, os quais foram levados a um extrator Soxhlet para tratamento com etanol por 6 h. Após este tempo, os materiais foram secos a 105 ºC até peso constante e a umidade foi determinada. Para determinação de extrativos foi utilizada a equação 1.1:

$$\%\,Extrativos = \frac{mPFA - mPF}{m_{amostra}} \times 100 \qquad (1.1)$$

Onde *mPF* e *mPFA* e correspondem à massa seca do papel filtro com amostra antes e após remoção de extrativos e secagem, respectivamente, e $m_{amostra}$ equivale à massa seca de cada amostra.

1.2.1.2 Determinação de cinzas

Aproximadamente 1 g de cada biomassa após remoção de extrativos em triplicata foram pesados em cadinhos de porcelana, os quais foram colocados em uma mufla a 500 ºC por 24 h até peso constante. O teor de cinzas foi calculado segundo a equação 1.2:

$$\%\ Cinzas = \frac{m_{cinzas}}{m_{amostra}} \times 100 \qquad (1.2)$$

Onde m_{cinzas} e $m_{amostra}$ correspondem à massa das cinzas após processo na mufla e massa seca de cada amostra.

1.2.1.3 Determinação de celulose e hemicelulose

Após remoção de extrativos, 0,3 g de cada biomassa em triplicata foram colocados em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 3 mL de H_2SO_4 72 % (m/v) e colocados em banho termostatizado a 30 ºC por 1h. Com ajuda de um bastão de vidro o conteúdo de cada tubo foi misturado a cada 5 min durante o processo. Após 1h, o conteúdo dos tubos foi passado a frascos Erlenmeyer de 250 mL com adição de 84 mL de água destilada, os quais foram a seguir colocados em autoclave a 120 ºC, 1 atm. por 1h. Após 1h e esfriamento do conteúdo dos frascos Erlenmeyer, este foi filtrado em funil de vidro sinterizado. O filtrado foi utilizado para preparação de amostras para análises de glicose, xilose, arabinose e ácido acético por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os teores de celulose e hemicelulose foram determinados empregando as equações 1.3 e 1.4, respectivamente.

$$\%\ Celulose = \frac{C_{Glicose} \times Vol \times Fc}{m_{amostra}} \times 100 \qquad (1.3)$$

$$\%\ Hemicelulose = \frac{(C_{xil} \times Vol \times Fc_{xil}) + (C_{ara} \times Vol \times Fc_{ara}) + (C_{AA} \times Vol \times Fc_{AA})}{m_{amostra}} \times 100 \qquad (1.4)$$

Onde $C_{Glicose}$, C_{xil}, C_{ara}, e C_{AA} correspondem às concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, respectivamente. Fc, Fc_{xil}, Fc_{ara} e Fc_{AA} correspondem aos fatores

de conversão da celulose em glicose (0,9), da hemicelulose em xilose (0,88), em arabinose (0,88) e em ácido acético (0,983), respectivamente. *Vol* equivale ao volume de filtrado e $m_{amostra}$ à massa seca de cada amostra no tubo de ensaio.

1.2.1.4 Determinação de lignina

O filtrado foi utilizado para quantificação de lignina solúvel, mediante diluição das amostras e leitura da absorbância a 276 nm, utilizando espectrofotômetro DU 800® (Beckman Coulters). O teor de lignina solúvel foi determinado conforme a equação 1.5:

$$\%\ \text{Lignina solúvel} = \frac{ABS \times Vol \times Dil}{\varepsilon \times m_{amostra} \times Passo\ ótico} \times 100 \qquad (1.5)$$

Onde *ABS* corresponde à absorbância a 276 nm, *Vol* ao volume do filtrado e *Dil* à Diluição. ε correspondente à absortividade da biomassa a 276 nm (foi utilizado a absortividade do bagaço de cana, que é 25 $Lg^{-1}cm^{-1}$). $m_{amostra}$ equivale à massa seca de cada amostra no tubo de ensaio e *Passo ótico* ao comprimento da cubeta usada no espectrofotômetro (1 cm).

O material sólido retido foi utilizado para determinação de lignina insolúvel, mediante secagem a 105 ºC por 24h até peso constante. O teor de lignina foi determinado com base na equação 1.6:

$$\%\ Lignina\ insolúvel: \frac{mCA - mCV}{m_{amostra}} \times 100 \qquad (1.6)$$

Onde *mCA* e *mCV* correspondem à massa do funil com amostra após secagem e do funil vazio. $m_{amostra}$ equivale à massa seca de cada amostra no tubo de ensaio.

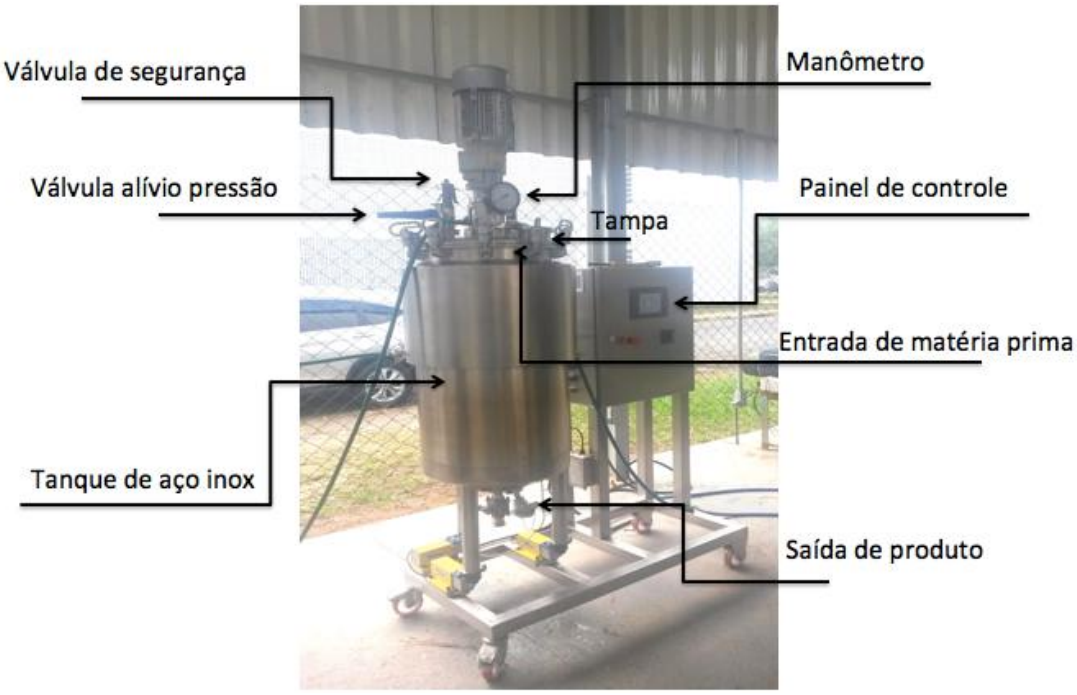
Para determinação de lignina total foi utilizada a equação 1.7:

$$\%\ Lignina\ total = \%\ Lignina\ solúvel + (\%\ Lignina\ soluvel - \%\ Cinzas) \qquad (1.7)$$

1.2.2 Obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana

O hidrolisado hemicelulósico foi obtido por hidrólise ácida diluída da mistura de bagaço e palha de cana, baseada nas seguintes condições já empregadas para o bagaço de cana (SILVA; FELIPE, 2006; RODRIGUES et al., 2010) e recentemente para palha de cana (HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016): 20 minutos, 121 ºC, 1% (m/v) de H_2SO_4 e relação matéria seca:solução ácida 1:10 (m/v). O processo foi realizado em reator de aço inoxidável de capacidade total de 80 L (Allbiom CR80) (Figura 1.2), carregado com aproximadamente 3,5 kg de biomassa em base seca para cada batelada. A fração líquida, correspondente ao hidrolisado hemicelulósico, foi separada do subproduto sólido (celulignina) por filtração, e mantida em câmara fria (4 ºC) até sua caracterização e utilização. A celulignina foi lavada com água corrente em centrífuga até que a água de lavagem tivesse um pH neutro, posteriormente esta biomassa foi seca ao sol até uma umidade próxima a 10%. A celulignina foi caracterizada quanto à sua composição estrutural seguindo os mesmos protocolos descritos para a biomassa *in natura*.

Figura 1.2 - Fotografia do reator de hidrólise Allbiom CR80.



Fonte: Nolasco (2016).

O hidrolisado hemicelulósico obtido foi concentrado à vácuo a 70 ºC usando um fator de concentração de 6, baseado na metodologia estabelecida por Rodrigues et al. (2003a). Em seguida o hidrolisado hemicelulósico foi destoxificado por ajuste de pH e adsorção em carvão vegetal ativado, baseado na metodologia definida por Marton et al. (2006). Para tanto, o pH do hidrolisado foi aumentado de aproximadamente 0,76 para 7,0 com CaO (grau comercial) e na sequência, reduzido para 2,5 com H_3PO_4. Em seguida, foi adicionado carvão vegetal ativado 1,0% (m/v) ao hidrolisado, e mantido sob agitação de 100 rpm por 30 min a 60 ºC em shaker com agitação orbital. Os precipitados formados durante o processo foram removidos mediante filtração à vácuo. Os hidrolisados original, concentrado e destoxificado foram caracterizados quanto concentração de xilose, glicose, arabinose, celobiose, furfural, 5-HMF, ácido acético, compostos fenólicos totais e íons metálicos.

1.2.3 Caracterização do melaço de cana-de-açúcar

O melaço de cana, doado pela Usina Pederneiras, Tietê, SP, na safra 2015/2016, foi caracterizado quanto aos teores de carboidratos, especificamente sacarose, glicose e frutose, bem como de furanos (5-hidroximetilfurfural e furfural) e íons metálicos. Para realização destes procedimentos foi necessária a diluição 1:3 em massa do melaço com água destilada em função de sua alta viscosidade.

1.2.4 Métodos analíticos

1.2.4.1 Concentração de açúcares, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural.

A concentração de açúcares (xilose, glicose, arabinose) e do ácido acético foram determinadas por CLAE. Foi usado um cromatógrafo Agilent 1200 (Kyoto, Japão), com um detector de índice de refração e coluna Bio Rad (Hercules, CA) Aminex HPX-87H, mantida a 45 ºC, com H_2SO_4 0,01 N como eluente, e fluxo de 0,6 mL min^{-1}. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro *Sep Pak* C18 (Millipore). A concentração de sacarose e frutose foram determinadas também por CLAE, usando o mesmo cromatógrafo com detector de índice de refração, porém com uma coluna Bio Rad (Hercules, CA) Aminex HPX- 87P, mantida a 60 ºC, com água deionizada como eluente, e fluxo de 0,4 mL min^{-1}. As amostras foram também previamente diluídas e filtradas em filtro *Sep Pak* C18

(Millipore). Para determinação das concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural foi empregado o mesmo cromatógrafo, mas com detector de luz ultravioleta e uma coluna Zorbax C18 Eclipse Plus, a 25 ºC, com acetonitrila:água (1:9) e ácido acético 1 % (v/v) como eluente, e fluxo de 0,8 mL min^{-1}. As amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em membranas com poros de 0,45 µm (Millipore). Em todos os casos, as concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

1.2.4.2 Concentração de compostos fenólicos totais

As concentrações de compostos fenólicos totais foram determinadas por espectrofotometria baseado na metodologia definida por Gouveia et al. (2009), utilizando espectrofotômetro DU 800® (Beckman Coulters). As amostras foram diluídas com água deionizada e o pH ajustado para 12,0 com NaOH 6N. A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria a 280nm, usando as equações 1.8 e 1.9.

$$CF = \left(4{,}187 \times 10^{-2} \times \left(A_{t280} - A_{pd280}\right)\right) - 3{,}279 \times 10^{-4} \qquad (1.8)$$

$$A_{pd280} = (C_{Fur} \times \in_{Fur}) + (C_{HMF} \times \in_{HMF}) \qquad (1.9)$$

Onde *CF* corresponde à concentração de compostos fenólicos totais (gL^{-1}). A_{t280} e A_{pd280} correspondem à absorbância da amostra e dos produtos de degradação dos açúcares (furfural e 5-HMF), respectivamente. A_{pd280} é calculada com a Equação 9, na qual C_{Fur} e C_{HMF} correspondem à concentração de furfural e 5-HMF (gL^{-1}), respectivamente, determinada por CLAE, e $\in_{Fur}$ e $\in_{HMF}$ são as absortividades destes compostos (146,85 e 114,00 L $g^{-1}cm^{-1}$, respectivamente).

1.2.4.3 Concentração de íons metálicos

As concentrações dos íons metálicos sódio, potássio, cálcio, cromo, ferro, níquel e zinco foram determinadas por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-AES), mediante colaboração com o Laboratório de Absorção Atômica e Emissão Ótica da EEL/USP, coordenado pelo professor Dr. Hélcio José Hizário Filho. Para tanto, amostras de aproximadamente 0,5 g foram pesadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, às quais foi adicionado 2 mL de H_2SO_4 grau analítico e os frascos colocados em chapa de aquecimento a 300 ºC até verificar queima da amostra. A seguir, as amostras foram

esfriadas e adicionado a cada uma delas 2 mL de H_2O_2 e aproximadamente 10 mL de água destilada. Os frascos foram novamente colocados na chapa de aquecimento e mantidos até total evaporação do líquido. Após esfriamento das amostras, foi adicionado 2 mL de uma mistura de HNO_3:HCl (1:3) e os frascos foram mantidos na chapa de aquecimento para digestão das amostras, até total consumo do HNO_3:HCl, evidente pela ausência de N_2O (gás amarelo) e sem borbulhamento. Após a digestão, as amostras foram diluídas com água deionizada em balão volumétrico de 50 mL e submetidas a análise por espectrometria no equipamento ICP modelo Analyst 8000 da Perkin Elmer.

1.2.4.4 Determinação de remoção e recuperação de xilose nas etapas de obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana

Foram realizados balanços de massa estimados para as etapas subsequentes de obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico. Para a etapa de hidrólise ácida diluída, foi calculado o rendimento mássico, a remoção de xilose presente na biomassa *in natura,* e a recuperação de xilose no hidrolisado hemicelulósico e na celulignina. Para as etapas de concentração à vácuo e destoxificação do hidrolisado foi calculado a recuperação de xilose em cada uma delas e também com relação à xilose presente na biomassa *in natura*.

a. Rendimento mássico do processo de hidrólise ácida diluída

$$\%RM = \frac{m_{CL}}{m_{Bio}} \; x \; 100 \qquad (1.10)$$

Onde $\%RM$ corresponde ao rendimento mássico em porcentagem, m_{Bio}(g) à massa seca da biomassa *in natura* submetida à hidrólise ácida diluída, e a m_{CL} (g) à massa seca da celulignina obtida nesta etapa.

b. Remoção da xilana presente na biomassa in natura após a hidrólise ácida diluída

$$\%\, Rem_{Xilose} = \frac{(m_{Bio} \; x \; Xil_{Bio}) - ((m_{CL} \; x \; Xil_{CL}) \; x \; RM)}{(m_{Bio} \; x \; Xil_{Bio})} \; x \; 100 \qquad (1.11)$$

Onde $\% Rem_{Xilose}$ corresponde à porcentagem de remoção de xilana, m_{Bio}(g) à massa seca da biomassa *in natura* submetida à hidrólise ácida diluída, Xil_{Bio}(g/100g) ao teor de xilana na biomassa *in natura*, m_{CL} (g) à massa seca da celulignina obtida na hidrólise ácida diluída, Xil_{CL}(g/100g) ao teor de xilana na celulignina, e RM ao rendimento mássico do processo de hidrólise.

c. Recuperação de xilose no hidrolisado hemicelulósico após hidrólise ácida diluída

$$\% RecX_{HH} = \frac{(Vol_{HH}\ x\ Xil_{HH})}{(m_{Bio}\ x\ Xil_{Bio})}\ x\ 100 \qquad (1.12)$$

Onde $\% RecX_{HH}$ corresponde à porcentagem de recuperação de xilose no hidrolisado hemicelulósico original, Vol_{HH} (L) ao volume de hidrolisado obtido, Xil_{HH} (gL^{-1}) à concentração de xilose no hidrolisado, m_{CL} (g) à massa seca da celulignina obtida, Xil_{CL}(g/100g) ao teor de xilana na celulignina, RM ao rendimento mássico do processo de hidrólise, m_{Bio}(g) à massa seca da biomassa *in natura* submetida à hidrólise ácida diluída, e Xil_{Bio}(g/100g) ao teor de xilana na biomassa *in natura*.

d. Recuperação de xilana residual na celulignina após hidrólise ácida diluída

$$\% RecX_{CL} = \frac{((m_{CL}\ x\ Xil_{CL})\ x\ RM)}{(m_{Bio}\ x\ Xil_{Bio})}\ x\ 100 \qquad (1.13)$$

Onde $\% RecX_{CL}$ corresponde à porcentagem de recuperação de xilana na celulignina após a hidrólise ácida diluída, m_{CL} (g) à massa seca da celulignina obtida, Xil_{CL}(g/100g) ao teor de xilana na celulignina, RM ao rendimento mássico do processo de hidrólise, m_{Bio}(g) à massa seca da biomassa *in natura* submetida à hidrólise ácida diluída, e Xil_{Bio}(g/100g) ao teor de xilana na biomassa *in natura*.

e. Recuperação de xilose após as etapas de concentração à vácuo (eq. 14) e destoxificação do hidrolisado (eq. 15).

$$\% RecX_{HC} = \frac{(Vol_{HC}\ x\ Xil_{HC})}{(Vol_{HH}\ x\ Xil_{HH})}\ x\ 100 \qquad (1.14)$$

$$\% \, RecX_{HD} = \frac{(Vol_{HD} \; x \; Xil_{HD})}{(Vol_{HC} \; x \; Xil_{HC})} \; x \; 100 \qquad (1.15)$$

Onde $\% \, RecX_{HC}$ e $\% \, RecX_{HD}$ correspondem às porcentagens de recuperação de xilose no hidrolisado hemicelulósico concentrado (HC) e destoxificado (HD), respectivamente. Vol_{HH} (L), Vol_{HC} (L) e Vol_{HD} (L) correspondem aos volumes de hidrolisado obtidos após a hidrólise ácida diluída, concentração à vácuo e destoxificação, respectivamente. Xil_{HH} (gL^{-1}), Xil_{HC} (gL^{-1}) e Xil_{HD} (gL^{-1}) correspondem às concentrações de xilose no hidrolisado após a hidrólise ácida diluída, concentração à vácuo e destoxificação, respectivamente.

f. Recuperação de xilose após as etapas de concentração à vácuo (eq. 16) e destoxificação do hidrolisado (eq. 17) com relação à biomassa in natura

$$\% \, RecXB_{HC} = \frac{(Vol_{HC} \; x \; Xil_{HC})}{(m_{Bio} \; x \; Xil_{Bio})} \; x \; 100 \qquad (1.16)$$

$$\% \, RecXB_{HD} = \frac{(Vol_{HD} \; x \; Xil_{HD})}{(m_{Bio} \; x \; Xil_{Bio})} \; x \; 100 \qquad (1.17)$$

Onde $\% \, RecXB_{HC}$ e $\% \, RecXB_{HD}$ correspondem às porcentagens de recuperação de xilose no hidrolisado hemicelulósico concentrado (HC) e destoxificado (HD), respectivamente, com relação à biomassa *in natura.* Vol_{HC} (L) e Vol_{HD} (L) correspondem aos volumes de hidrolisado obtidos após a concentração à vácuo e destoxificação, respectivamente. Xil_{HC} (gL^{-1}) e Xil_{HD} (gL^{-1}) correspondem às concentrações de xilose no hidrolisado após a concentração à vácuo e destoxificação, respectivamente. m_{Bio} (g) corresponde à massa seca da biomassa *in natura* submetida à hidrólise ácida diluída, e Xil_{Bio}(g/100g) ao teor de xilana na biomassa *in natura*.

1.3 Resultados e discussão

A mistura (1:1) de bagaço e palha de cana foi submetida ao processo de hidrólise ácida diluída para obtenção do hidrolisado hemicelulósico rico em xilose, e um subproduto sólido rico em celulose e lignina (celulignina). Os resultados da caracterização da biomassa lignocelulósica *in natura* e a celulignina, bem como do hidrolisado hemicelulósico são

discutidos a seguir. É importante mencionar que foram realizadas um total de 9 bateladas de hidrólise para compor o volume total de hidrolisado hemicelulósico necessário para a execução dos experimentos propostos no presente projeto. Cada batelada de hidrólise foi alimentada com 3,46 ± 0,11 kg de biomassa seca, com obtenção de 26,78 ± 0,87 L de hidrolisado hemicelulósico e 1,85 ± 0,12 kg de celulignina. Assim, foi gerado um volume total de 241 L de hidrolisado hemicelulósico e 12,65 kg de celulignina.

1.3.1 Caracterização química estrutural da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar

A composição química estrutural da mistura de bagaço e palha de cana *in natura*, em termos do conteúdo de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas e extrativos, é apresentada na Tabela 1.1. Nesta tabela é incluída também a composição química da celulignina.

Tabela 1.1 - Composição química estrutural da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar *in natura* e da celulignina após hidrólise ácida diluída

Componente	**Biomassa *in natura* (g/100g)**	**Celulignina**	
		Valor bruto (g/100g)	**Valor corregido pelo rendimento mássico[1] (g/100g biomassa original)**
Celulose	35,99 ± 2,09	62,31 ± 0,58	33,29 ± 0,31
Hemicelulose	29,53 ± 1,18	6,35 ± 0,24	3,39 ± 0,13
Xilana	22,19 ± 1,04	5,37 ± 0,13	2,87 ± 0,07
Arabinana	3,00 ± 0,21	0,46 ± 0,02	0,25 ± 0,01
Acetil	4,34 ± 0,08	0,52 ± 0,16	0,28 ± 0,09
Lignina	19,85 ± 0,48	20,60 ± 0,73	11,01 ± 0,39
Cinzas	10,46 ± 1,90	15,53 ± 0,10	8,30 ± 0,05
Extrativos	5,73 ± 0,70	-	-
Total	101,57 ± 1,27	104,79 ± 1,65	55,99 ± 0,88

[1]**Rendimento mássico (%):** 53,43 ± 3,63
Fonte: Arquivo próprio

Destaca-se que a fração hemicelulósica da mistura de bagaço e palha de cana correspondeu a 45,07 % do conteúdo de carboidratos deste material, sendo que 75,15% desta fração é composta por xilana, a qual, portanto, corresponde a 33,87 % do conteúdo total de carboidratos desta biomassa. O conteúdo de xilana na fração hemicelulósica da mistura de bagaço e palha de cana foi similar à encontrada em palha de cana por Szczerbowski et al. (2014) (75 %). A partir do balanço de massa realizado com base nas composições químicas das biomassas *in natura* e da celulignina e do rendimento mássico, tem-se que a remoção da massa de xilana presente na biomassa *in natura* foi de 93,09% nas condições de processo empregadas, uma vez que apenas 6,91% da xilana foi recuperada na celulignina. No caso

dos outros componentes quantificados, observou-se remoções de 50,54%, 70,35% e 69,91% das massas de celulose, lignina e cinzas, respectivamente.

Na Tabela 1.2 é apresentada uma comparação da composição química estrutural da matéria-prima *in natura* com as derivadas da caracterização individual do bagaço e da palha empregados na mistura, bem como com valores reportados por outros estudos para estas e outras biomassas lignocelulósicas.

Tabela 1.2 - Comparação da composição química estrutural da mistura de bagaço e palha de cana-de-acúcar com outras biomassas lignocelulósicas.

Matéria-Prima	Componente (g/100g)					Referências
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Extrativos	
Mistura de bagaço e palha de cana (1:1)	35,99 ± 2,09	29,53 ± 1,18	19,85 ± 0,48	10,46 ± 1,90	5,73 ± 0,70	Presente trabalho
Palha de cana	30,49 ± 2,13	29,17 ± 1,38	12,56 ± 0,85	14,88 ± 1,37	13,11 ± 0,66	Presente trabalho
Bagaço de cana	40,79 ± 2,30	32,68 ± 1,14	16,61	10,75	2,93 ± 0,45	Presente trabalho
Palha de cana	31,7	27,0	31,1	1,5	N.D.	Hernández-Pérez, Arruda e Felipe (2016)
Bagaço de cana	43,1 ± 0,5	28,6 ± 0,4	20,8 ± 0,2	2,9 ± 0,1	4,6 ± 0,1	Arruda (2011)
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2	11,4	5,9	Mussatto e Roberto (2002)
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1	7,0	N.D.	Canilha (2006)
Cascas de aveia	29,3	28,4	22,2	4,5	N.D.	Tamanini et al. (2004)

N.D.: Não determinado
Fonte: Arquivo próprio

Destaca-se que o conteúdo de hemicelulose constatado na mistura de bagaço e palha de cana (29,53 ± 1,18 g/100g) foi similar aos encontrados quando estas biomassas foram caracterizadas individualmente, bem como em outras que já foram avaliadas para a produção biotecnológica de xilitol em outros estudos (Tabela 1.2). Os teores elevados de hemicelulose na mistura de bagaço e palha de cana corroboram a importância da valorização desta fração desta biomassa em processos de conversão no contexto de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar. Especificamente, o teor elevado de xilana na fração hemicelulósica permitem afirmar o potencial da mistura de bagaço e palha de cana como matéria-prima para a obtenção de xilitol pela rota biotecnológica.

Com relação ao conteúdo de celulose da mistura de bagaço e palha de cana, salienta-se que o valor determinado (35,99 ± 2,09 g/100g) foi intermediário entre os encontrados para bagaço e palha separadamente (Tabela 1.2), o qual é coerente com a mistura 1:1 feita com

estas duas biomassas. Conforme mostrado na Tabela 1.2, os teores de celulose no bagaço e na palha de cana constatados no presente estudo foram similares aos reportados em outros trabalhos com as mesmas biomassas (ARRUDA, 2011; HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016). Destaca-se que a celulose na mistura de bagaço e palha de cana correspondeu a 54,93 % do conteúdo de carboidratos deste material. Este resultado suporta a importância do aproveitamento desta fração não só para a produção de etanol de segunda geração, principal rota sugerida para esta fração do bagaço e da palha, mas também para obtenção de produtos de alto valor agregado, a exemplo de nanocelulose que é um biomaterial com potenciais aplicações em diversas indústrias como automotriz, aeroespacial, alimentícia, biomedicina, construção civil, química e eletrônica (SHATKIN et al., 2014).

Com relação aos componentes não carboidratos da mistura de bagaço e palha de cana, correspondentes a lignina, cinzas e extrativos, destaca-se que o conteúdo de lignina (19,85 ± 0,48 g/100g) foi similar ao reportado para outras biomassas lignocelulósicas já avaliadas para a produção biotecnológica de xilitol (Tabela 1.2). No entanto, foram constatadas diferenças nos teores de lignina do bagaço e da palha determinados no presente estudo com os reportados por outros autores para estas biomassas (ARRUDA, 2011; HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016). Constata-se também na Tabela 1.2 que o teor de cinzas tanto na mistura de bagaço e palha quanto nestas biomassas caracterizadas individualmente foi consideravelmente superior aos encontrados por outros autores para estas mesmas biomassas e outras já avaliadas para a produção de xilitol, sendo apenas similar com a reportada por Mussatto e Roberto (2002) para palha de arroz.

As diferenças encontradas quanto aos conteúdos de lignina e cinzas podem estar associadas a características próprias da cultura de cana, como variedade, idade e condições de cultivo (SAKA, 2001). No caso das cinzas, podem ser elencadas também outros fatores como as propriedades do solo, uso de fertilizantes para cultivo, e metodologias de colheita, lavagem e/ou armazenamento de cada biomassa (BAEZA; FREER, 2001; PIPPO et al., 2011). Além disso, o alto conteúdo de cinzas na mistura de bagaço e palha de cana pode impactar o processo de produção biotecnológica de xilitol, considerando que as cinzas podem conter diferentes minerais e íons metálicos (como sílica, óxidos de ferro, alumínio, cálcio, magnésio, sódio ou potássio), oligoelementos e vitaminas que podem afetar positiva ou negativamente o crescimento e comportamento fermentativo da levedura (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998; MUSSATTO; ROBERTO, 2004), bem como

causar danos por corrosão ou incrustações nos equipamentos empregados para a hidrólise ácida diluída e a concentração à vácuo do hidrolisado hemicelulósico (CAI et al., 2017).

1.3.2 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar

Na Tabela 1.3 é apresentada a caracterização do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana após as subsequentes etapas seguidas para o preparo deste como meio de fermentação para a produção de xilitol por *C. tropicalis*. Nesta tabela foi incluída como uma etapa a formulação do meio de fermentação, a qual correspondeu à diluição do hidrolisado hemicelulósico destoxificado e autoclavado, pela adição dos outros componentes do meio, conforme será descrito no próximo capítulo. A caracterização do hidrolisado hemicelulósico correspondeu à composição química média, em termos de carboidratos, componentes potencialmente tóxicos e elementos inorgânicos, bem como o pH e a recuperação da massa de xilose após cada etapa e com relação à massa original desta pentose na biomassa *in natura*.

Tabela 1.3 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar após hidrólise ácida diluída, concentração à vácuo (FC=6), destoxificação e formulação do meio de fermentação.

Componente	**Etapa**			
	Hidrólise ácida diluída	**Concentração à vácuo (FC=6)**	**Destoxificação**	**Formulação meio de fermentação**
Composição carboidratos				
Glicose (gL^{-1})	1,44	10,16	10,07	8,23
Xilose (gL^{-1})	13,18	75,73	75,60	60,52
Arabinose (gL^{-1})	2,63	11,82	12,19	9,74
Composição componentes potencialmente tóxicos				
Ácido acético (gL^{-1})	2,02	3,35	3,08	2,76
Furfural (gL^{-1})	0,24	0,29	0,06	0,05
5-Hidroximetilfurfural (gL^{-1})	0,07	0,41	0,18	0,14
Compostos fenólicos totais (gL^{-1})	3,38	16,97	3,62	2,80
Composição íons metálicos				
Fe (mgL^{-1})	388,85	3391,70	3,00	0,95
Cr (mgL^{-1})	87,55	292,3	64,80	62,20
Ni (mgL^{-1})	30,60	305,65	114,55	98,10
Zn (mgL^{-1})	3,75	15,05	0,85	2,50
Ca (mgL^{-1})	130,75	269,40	79,90	123,15
Na (mgL^{-1})	175,60	426,60	4780,85	2526,35
K (mgL^{-1})	375,70	2019,05	1761,55	1526,05
Outros				
pH	1,18	0,76	5,58	5,39

continua

conclusão

Componente	Etapa			
	Hidrólise ácida diluída	**Concentração à vácuo (FC=6)**	**Destoxificação**	**Formulação meio de fermentação**
Recuperação de xilose após cada etapa (%)	45,95	95,37	60,90	100,0
Recuperação de xilose após cada etapa com relação à massa de xilana na biomassa *in natura* (%)	45,95	43,78	26,66	26,66

Fonte: Arquivo próprio

Conforme apresentado na Tabela 1.3, após a etapa de hidrólise ácida diluída da mistura de bagaço e palha de cana, verifica-se que a xilose é o monossacarídeo encontrado em maior proporção no hidrolisado hemicelulósico, correspondendo a 77,76% do conteúdo de carboidratos. Este resultado é coerente com o teor de xilana encontrada na fração hemicelulósica desta biomassa (77,71%), conforme mencionado previamente. A elevada proporção de xilose no hidrolisado hemicelulósico em comparação com os outros monossacarídeos corrobora o potencial da mistura de bagaço e palha de cana como matéria-prima para a produção biotecnológica de xilitol. A proporção de xilose no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana é superior ao constatado por Hernández-Pérez, Arruda e Felipe (2016) quando o hidrolisado hemicelulósico foi proveniente apenas de palha de cana (71%), enquanto que inferior ao encontrado por Arruda et al. (2011) com emprego do bagaço de cana (82,79%).

Balanços de massa foram estimados para cada uma das etapas de obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico. No caso da etapa de hidrólise ácida diluída, foi considerado a composição da biomassa *in natura* e da celulignina, apresentada na Tabela 1.2, o rendimento mássico calculado para esta etapa, o volume de hidrolisado hemicelulósico obtido e a composição química deste (Tabela 1.3). A partir deste balanço, calculou-se que apenas 45,95% da xilana presente na biomassa *in natura* foi recuperada como xilose no hidrolisado hemicelulósico, o qual equivale a 49,37% da xilana efetivamente solubilizada desta biomassa. Este resultado, somado ao da presença de xilana na celuliginina previamente mencionado, indica que apenas 52,87% da xilana na biomassa *in natura* foi recuperada nas frações sólidas e líquidas resultantes do processo hidrolítico, o que corresponde à perda de xilana de 47,13%. Isto pode estar associado à degradação da xilose formada durante o processo hidrolítico com geração de furfural, cuja presença foi constatada no hidrolisado hemicelulósico (Tabela 1.3), e à hidrólise parcial da hemicelulose com formação de oligossacarídeos, cuja concentração no hidrolisado não foi determinada.

Baseado nas considerações previas, destaca-se a necessidade de um estudo detalhado do processo de hidrólise ácida diluída da mistura de bagaço e palha de cana, no que se refere à otimização das condições de operação para maximizar a solubilização da xilose e sua recuperação no hidrolisado hemicelulósico em altas concentrações. Como isto se esperaria diminuir não só a perda de xilose durante os procedimentos que fazem parte da etapa de hidrólise, mas também a necessidade de concentração do hidrolisado hemicelulósico para favorecer a etapa fermentativa. Ambas situações podem contribuir a aumentar a viabilidade técnica e econômica da produção biotecnológica de xilitol.

A esse respeito, estudos já demonstraram a maximização da recuperação de xilose a partir de bagaço ou palha de cana a partir do estudo das condições de hidrólise ácida diluída, porém em reatores de diferentes volumes úteis e sistemas de agitação ao empregado no presente trabalho. Pessoa Jr, Mancilha e Sato (1997) indicaram que máxima recuperação de xilose a partir de bagaço de cana (83%) foi obtida com 140 ºC, 20 min, relação sólido:líquido 1:10 e H_2SO_4 100mg/g matéria seca, em reator de escala semipiloto (25 L), obtendo-se um hidrolisado com 18,5 gL^{-1} de xilose. Rodrigues et al. (2010) reportaram uma eficiência de extração de xilose de 74% quando empregado 121ºC, 10 min, relação sólido:líquido 1:10 e H_2SO_4 100mg/g matéria seca, em reator de escala piloto (350 L). No caso da palha de cana, Moutta et al. (2012) otimizaram as condições de hidrólise (130 ºC, 30 min, relação sólido:líquido 1:4, e 2,9% m/v H_2SO_4) e obtiveram 85,1% de recuperação de xilose e um hidrolisado com 56,5 gL^{-1} desta pentose. Utilizando as condições otimizadas para palha de cana para hidrólise da mistura desta biomassa com bagaço (1:1), Moutta, Ferreira-Leitão e Bon (2014) reportaram 90,7% de solubilização de hemicelulose e obtenção de um hidrolisado com 58,4 gL^{-1} de xilose.

Os outros monossacarídeos encontrados no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana foram a glicose e arabinose, os quais corresponderam a 8,49% e 13,80% do conteúdo de carboidratos do hidrolisado hemicelulósico (Tabela 1.3). Já foi demonstrado que a presença de glicose no hidrolisado hemicelulósico pode impactar positiva ou negativamente o consumo de xilose e produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 em função da proporção de glicose:xilose no meio de fermentação (SILVA; FELIPE, 2006). Pela avaliação dos dados da Tabela 1.3, verifica-se que a proporção de glicose:xilose no hidrolisado hemicelulósico foi de aproximadamente 1:9. A este respeito, destaca-se que Silva e Felipe (2006) constataram que o aumento na proporção de glicose:xilose de 1:25 para 1:5, esta última definida como ótima, resultou no favorecimento das taxas de consumo de

xilose e de produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Em relação à presença de arabinose no hidrolisado hemicelulósico, a proporção desta com a xilose foi aproximadamente 1:6. Segundo Su et al. (2013), ainda é objeto de estudo a influência desta na bioconversão de xilose em xilitol.

Após obtenção do hidrolisado hemicelulósico, este foi submetido a um processo de concentração à vácuo para incremento da concentração de xilose, de forma a favorecer a etapa de fermentação. Conforme observa-se na Tabela 1.3, houve o aumento do teor dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana após esta etapa, porém em um fator de concentração menor ao esperado (6 vezes), com exceção da glicose. No caso especifico da xilose, a massa recuperada após a concentração à vácuo foi de 95,37%. Considerando que não houve perda de volume de hidrolisado nesta etapa, pode ser sugerida a degradação de 4,63% da xilose. Apesar que a temperatura usada no processo (70 ºC) é menor à reportada como causante de degradação térmica de carboidratos por caramelização (KROH, 1994), estes resultados poderiam ser devidos à perda destes açúcares por degradação em função da necessidade de expor o hidrolisado hemicelulósico à temperatura mencionada por um tempo prolongado (aproximadamente 8 h). Considerando a possibilidade de degradação dos açúcares nas condições do processo de concentração à vácuo, bem como o gasto energético do mesmo, torna-se necessária a otimização das condições de hidrólise da mistura de bagaço e palha de cana para o aumento da recuperação da xilose em alta concentração no hidrolisado hemicelulósico.

Após a concentração à vácuo, foi realizada a etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana, objetivando a redução da concentração de compostos potencialmente tóxicos para a levedura, de forma a favorecer a bioconversão de xilose em xilitol, cujos resultados são discutidos posteriormente. É importante mencionar quen na etapa de destoxificação não ocorreu considerável alteração no teor de carboidratos do hidrolisado hemicelulósico em comparação com a etapa de concentração a vácuo (Tabela 1.3), mas houve uma perda de volume de aproximadamente 39%, o que resultou em uma recuperação de xilose de 60,90% nesta etapa. Considerando que a formulação do meio de fermentação após a destoxificação correspondeu apenas a uma diluição do hidrolisado hemicelulósico pela adição dos outros nutrientes do meio (descrito no item 2.2.1.2 do Capítulo 2), pode ser afirmado que a xilose no meio de fermentação representa apenas 26,66% da xilana presente originalmente na mistura de bagaço e palha de cana *in natura.* Este resultado demonstra a importância de futuros estudos sobre as condições de obtenção e

preparo do hidrolisado hemicelulósico para maximizar a recuperação de xilose presente na matéria-prima, uma vez que isto pode ter um significativo impacto na viabilidade técnica e econômica da produção biotecnológica de xilitol.

Por outro lado, constata-se na Tabela 1.3 a presença de compostos que podem ser tóxicos para a levedura no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana, tais como o ácido acético, gerado a partir da desacetilação da hemicelulose, furfural e 5-HMF, produzidos pela desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente, e compostos fenólicos totais, derivados da degradação parcial da lignina (MUSSATTO; ROBERTO, 2004; RAO et al., 2016). Foi verificada também a presença de íons metálicos no hidrolisado hemicelulósico, os quais podem ser provenientes da própria biomassa, do solo onde esta foi colhida e dos equipamentos empregados para a hidrólise ácida diluída, os quais podem resultar também inibitórios para a produção de xilitol (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1997; CONVERTI; PEREGO; DOMÍNGUEZ, 1999; MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Destaca-se que as concentrações de ácido acético, furfural e 5-HMF encontradas no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana (Tabela 1.3) foram menores às reportadas como inibitórias para a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 quando cultivada em meio semidefinido (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988; FELIPE et al., 1995; CONVERTI et al., 2000; LIMA et al., 2004; KELLY et al., 2008), bem como em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana (LIMA et al., 2004) e de malte (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2005). Em relação aos compostos fenólicos totais, a concentração determinada destes no presente trabalho (3,38 gL^{-1}) foi 11% e 42% maior que às constatadas nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de cana (HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015) e de bagaço de cana (RODRIGUES et al., 2010), respectivamente, obtidos em condições similares de hidrólise. No entanto, salienta-se que estudos em meios definidos já se identificaram concentrações de alguns destes compostos que de forma individual ou misturados podem resultar inibitórias para o crescimento celular e produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, a exemplo da mistura de vanilina (2gL^{-1}) e siringaldeído (2 gL^{-1}) (CORTEZ; ROBERTO, 2010).

O processo de concentração à vácuo pode contribuir na remoção de compostos tóxicos voláteis, como o furfural e ácido acético (RODRIGUES et al., 2001; MUSSATTO; ROBERTO, 2004). A este respeito, verifica-se na Tabela 1.3 que a concentração destes compostos aumentou, porém não proporcionalmente com o fator de concentração

empregado, o que pode ser devido ao caráter volátil destes compostos. Por outro lado, foram verificados aumentos nos teores do 5-HMF e os compostos fenólicos totais superiores ao fator de concentração empregado. Quanto ao 5-HMF, este resultado pode ser um indicativo da degradação térmica de hexoses (KROH, 1994) e estar relacionado com a possível perda de glicose conforme discutido previamente. Já no caso dos compostos fenólicos totais, o aumento de sua concentração poderia ser devido à degradação de oligômeros derivados da lignina remanentes no hidrolisado hemicelulósico (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Após a etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, 79,31 %, 56,09 %, 8,06 % e 78,67% dos conteúdos de furfural, 5-HMF, ácido acético e compostos fenólicos totais, respectivamente, foram removidos (Tabela 1.3). Destaca-se que apesar da remoção de 5-HMF, ácido acético e compostos fenólicos totais, a concentração destes no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana destoxificado foi 3, 1,52 e 1,38 vezes maior à verificada após a hidrólise ácida diluída, respectivamente. Apesar deste fato, as concentrações destes compostos no hidrolisado hemicelulósico destoxificado foram menores às reportadas como inibitórias em meios semidefinidos (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988; FELIPE et al., 1995; CONVERTI et al., 2000; LIMA et al., 2004; KELLY et al., 2008), bem como em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana (LIMA et al., 2004) e de malte (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2005). Adicionalmente, pode ser mencionado inclusive que após a formulação do meio de fermentação, a concentração dos compostos fenólicos totais foi diluída a uma menor à do hidrolisado hemicelulósico original.

Por outro lado, foi verificada a presença de diversos íons metálicos no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana, conforme apresentado na Tabela 1.3. Os resultados aqui obtidos podem ser comparados com os reportados por Rodrigues et al. (2010), em estudo com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana obtido em condições similares de hidrólise ácida diluída. Destaca-se que o hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana obtido no presente trabalho teve teores maiores de Cr, Ca, Na e K, menores de Fe e Zn, e similar de Ni que os encontrados por Rodrigues et al. (2010), quem indicou que estes elementos podem ser utilizados como micronutrientes pelo micro-organismo. As diferenças entre o presente estudo e o de Rodrigues et al. (2010) podem estar relacionadas com a presença da palha no presente estudo, uma vez que a esta pode contribuir com vários destes elementos, a exemplo do K e Na, conforme indicado por Menandro et al. (2017).

Os íons metálicos determinados no presente estudo tiveram seus teores aumentados após a etapa de concentração à vácuo (Tabela 1.3), entretanto, estes aumentos não foram proporcionais com o fator de concentração empregado (FC=6), estando na faixa entre 2 vezes (para o Ca) e 10 vezes (para o Ni). Após a etapa de destoxificação, foi constatada a redução nos teores destes elementos, com exceção do Na, para o qual foi verificado um aumento de aproximadamente 10 vezes (Tabela 1.3). A este respeito, é importante mencionar que no final da etapa de destoxificação, o pH do hidrolisado foi ajustado para 5,5 com micropérolas de NaOH, prévio à utilização deste como meio de fermentação. A diminuição dos teores dos íons metálicos após a destoxificação esteve na faixa entre 12% (para o K) e 94% (para o Zn). Por fim, após a formulação do meio de fermentação, os teores dos íons metálicos foram diluídos, com exceção do Zn e Ca. Adicionalmente, a redução na concentração destes íons não foi proporcional com a diluição do hidrolisado hemicelulósico, pelo qual pode ser sugerido que os componentes suplementados ao meio como fontes nutricionais podem contribuir com estes íons. Destaca-se que, com exceção do Na, K e Ni, os teores dos íons metálicos no meio de fermentação foram menores aos encontrados no hidrolisado hemicelulósico após a hidrólise ácida diluída.

É importante mencionar que poucos estudos foram encontrados na literatura quanto ao efeito destes íons metálicos no desempenho de *C. tropicalis.* No entanto, já foi relatado que esta levedura mostrou tolerância a Zn (1400 mgL^{-1}), Ni (1000 mgL^{-1}) e Cr (1200 mgL^{-1}) em meio YPD, concentrações que são maiores às encontrados no hidrolisado hemicelulósico no presente estudo. No caso específico de Zn, já foi indicado que células de *C. tropicalis* imobilizadas em alginato de cálcio foram utilizadas para biosorção deste elemento em soluções aquosas (AHMAD; HAYDAR; QURAISHI, 2013). A respeito do Zn, é importante considerar que já foi reportado que a enzima xilitol desidrogenase (XDH) de *C. tropicalis* contém Zn no seu sítio ativo (KO; JUNG; KIM, 2006; LIMA et al., 2006). Por outro lado, Lee, Koo e Kim (2003) demonstraram que a enzima xilose redutase de *C. parapsilosis* não era inibida por Zn ou Ca.

1.3.3 Caracterização do melaço de cana-de-açúcar

Um dos objetivos principais do presente projeto foi o aproveitamento do melaço de cana, subproduto dos processos de açúcar e álcool, com base no seu elevado teor de sacarose e seu conteúdo de compostos nitrogenados, vitaminas e minerais. Na Tabela 1.4 é

apresentada a caracterização do melaço de cana utilizado no presente trabalho, a qual corresponde à composição parcial em termos de carboidratos, furanos e íons metálicos.

Tabela 1.4 - Composição química parcial do melaço de cana-de-açúcar

Componente	Concentração (gL^{-1})
Sacarose	506,48
Glicose	62,52
Frutose	53,52
Furfural	0,04
5-Hidroximetilfurfural	0,36
Fe	0,048
Cr	0,188
Ni	ND
Zn	0,009
Ca	4,98
Na	1,18
K	19,28

ND: Não detectado
Fonte: Arquivo próprio

Conforme esperado, destaca-se o elevado conteúdo de sacarose do melaço de cana, equivalente a 81,36% do conteúdo de carboidratos (Tabela 1.4). O teor de sacarose no melaço de cana aqui apresentado é maior que o relatado por Liu et al. (2008), correspondente a 350 gL^{-1}, e similar ao reportado por Dai et al., 2015) (495 gL^{-1}). Já as concentrações de glicose e frutose foram similares quando comparadas com os estudos mencionados. Verifica-se na Tabela 1.4 também a presença de íons metálicos, principalmente de K e Ca. Estes resultados são coerentes com os relatos na literatura quanto à composição deste subproduto (OLIVEIRA et al., 2007; LIU et al., 2008; DAI et al., 2015). Além dos íons verificados no presente estudo, já foi relatado a presença de sais inorgânicos de Mg, Mn, SO_4, PO_4 (DAI et al., 2015). Apesar dos escassos estudos sobre o efeito de íons metálicos no desempenho de *C. tropicalis,* já foi indicado que estes podem ser utilizados por micro-organismos como micronutrientes dispensando a necessidade de suplementação ao meio quando empregado melaço, mas também podem resultar inibitório em função do teor no meio de cultura (LIU et al., 2008; RODRÍGUES et al., 2010; DAI et al., 2015). A este respeito é importante destacar que Oliveira et al. (2007) associaram a redução na produção de levano por *Zymomonas mobilis* em melaço de cana, comparado com glicose ou xarope de cana, pela presença de altos teores de sais de K, Ca e Na.

Adicional aos componentes determinados no presente trabalho, já foi reportado que o melaço de cana tem um conteúdo de aproximadamente 4,3 % (m/m) de proteínas (LIU et al., 2008). No trabalho destes autores, não foi necessário a suplementação de fontes de

nitrogênio adicionais para permitir o crescimento e produção de ácido succínico por *A. succinogenes*. Duarte-Almeida et al. (2011) relataram a presença de compostos fenólicos no melaço, particularmente ácidos cinâmicos e flavonoides. Estes autores também verificaram uma alta atividade antioxidante quando comparados com outros coprodutos e subprodutos do processo de obtenção de açúcar e álcool.

É importante mencionar que o melaço de cana já foi empregado como meio de cultura de baixo custo em diversos bioprocessos, a exemplo de etanol (CAZETTA et al., 2007), ácido cítrico (LIU et al., 2008), 2,3-butanediol (DAI et al., 2015) e sorbitol (CAZETTA et al., 2005). Nos trabalhos de Liu et al. (2008) e Dai et al. (2015) foi concluído que a utilização do melaço de cana como meio de fermentação resultava na redução do custo da formulação do meio, pelo emprego de uma fonte de carbono mais econômica que a glicose. No entanto, Liu et al. (2008) ressaltaram que com o melaço de cana um maior número de impurezas é introduzido no meio de fermentação, o que pode dificultar os procedimentos de *downstream* para recuperação do produto de interesse.

1.4 Conclusão

O potencial da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção biotecnológica de xilitol foi corroborado tanto pelo conteúdo de hemicelulose (29,53%) similar ao teor de biomassas já avaliadas para este bioprocesso, como pelo alto teor de xilose (33,87%), principal componente da fração hemicelulósica, entre os carboidratos componentes desta biomassa. O processo de hidrólise ácida diluída executado no presente trabalho baseado nas condições empregadas para bagaço e palha individualmente, resultou na solubilização de 45,95% da xilana presente na biomassa *in natura* como xilose no hidrolisado hemicelulósico. Foi obtido um hidrolisado hemicelulósico com alta proporção de xilose (77,76 %) em relação com os outros monossacarídeos constituintes, uma relação glicose:xilose de 1:9, e teores de compostos potencialmente tóxicos menores aos já reportados como inibitórios para *C. guilliermondii* FTI 20037 em estudos com meios semidefinidos e hidrolisados hemicelulósicos de outras biomassas.

As etapas de concentração à vácuo e destoxificação se mostraram eficazes para o incremento do teor de xilose e redução da concentração dos componentes potencialmente tóxicos. O hidrolisado hemicelulósico resultante das etapas de preparo foi considerado como

apropriado para sua utilização como base do meio de fermentação na etapa subsequente deste processo de produção de xilitol.

No entanto, após as etapas de preparo do hidrolisado hemicelulósico para ser preparado como meio de fermentação, determinou-se que a xilose presente no meio representou 26,67% do conteúdo original de xilana na biomassa *in natura*. A partir destes resultados, ressalta-se a necessidade de estudos de otimização das condições de hidrólise ácida diluída da mistura de bagaço e palha de cana, com o intuito de maximizar a recuperação da xilose presente na matéria-prima e, consequentemente, reduzir o requerimento e/ou intensidade da etapa de concentração do hidrolisado, bem como minimizar a formação de compostos potencialmente tóxicos para evitar a etapa de destoxificação. Os resultados destes estudos poderão contribuir para a viabilidade técnica e econômica deste bioprocesso, particularmente se integrado a uma biorrefinaria de cana-de-açúcar.

CAPÍTULO 2 – ESTUDO DA OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES DE CULTIVO E APROVEITAMENTO DO MELAÇO DE CANA COMO SUPLEMENTO NUTRICIONAL

2.1 Introdução

O ajuste fino da disponibilidade de oxigênio no meio de fermentação é um dos principais fatores interferentes na capacidade de leveduras nativas para converter xilose em xilitol. Diversos estudos a este respeito já demonstraram que uma alta disponibilidade deste nutriente pode promover o metabolismo respiratório, no qual a assimilação da xilose como fonte de carbono e energia resulta em um alto ganho energético, o qual se traduz em maior crescimento celular (FLORES et al., 2000; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). Por outro lado, uma baixa disponibilidade de oxigênio favorece o metabolismo fermentativo, no qual há menor ganho energético, menor crescimento celular, porém é favorecido o acúmulo e excreção do xilitol, devido à geração de desequilíbrio redox entre $NADH/NAD^+$ pela restrição do metabolismo respiratório (GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). Ao mesmo tempo, a baixa disponibilidade de oxigênio resulta também em redução da capacidade da levedura para consumir xilose e usá-la como fonte de carbono e energia para o crescimento e manutenção celular, o qual, consequentemente, pode ter um efeito negativo na produção de xilitol (KASTNER; EITEMAN; LEE, 2001; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007).

A disponibilidade de oxigênio é dependente da suplementação e da transferência deste para as células suspensas no meio, em consideração que o oxigênio é um nutriente limitante em função da sua baixa solubilidade em meios aquosos (GUPTA; RAO, 2003; GARCÍA-OCHOA; GOMEZ, 2009). O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) é uma medida de quanto oxigênio o sistema pode oferecer para as células no cultivo, permitindo, portanto, ter uma noção da disponibilidade de oxigênio para o micro-organismo (GARCÍA-OCHOA; GOMEZ, 2009). O K_La é um dos critérios mais empregados para ampliação de escala de bioprocesso, uma vez que se considera que a utilização de mesmos valores deste parâmetro promove comportamentos similares em um mesmo micro-organismo cultivado em biorreatores diferentes (GUPTA; RAO, 2003). O K_La é dependente de aeração e agitação do sistema fermentativo, do tipo de biorreator e sua configuração, e a

composição do meio de fermentação (GUPTA; RAO, 2003; GARCÍA-OCHOA; GOMEZ, 2009).

Por outro lado, uma pesquisa recente de nosso grupo demonstrou o uso potencial de sacarose como co-substrato na produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana e na escala de frascos agitados (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016). Os resultados desse estudo mostraram um efeito positivo no consumo de xilose e produtividade volumétrica de xilitol da adição deste dissacarídeo ao meio em concentração inicial de 10 gL^{-1}. Estes efeitos positivos foram associados com a possibilidade que o metabolismo da sacarose pudesse compensar a limitação de fonte de carbono e energia, derivada do metabolismo parcial da xilose pelo acúmulo e excreção de xilitol em condições de baixa disponibilidade de oxigênio.

Assim, o intuito desta etapa do presente trabalho foi estudar o efeito da suplementação de sacarose ao hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana na produção de xilitol por *C. tropicalis* em função da variação de K_La, considerando a importância deste fator neste bioprocesso e empregando um biorreator do tipo *stirred tank reactor* (STR) de 1 L de capacidade. Esperava-se que a otimização conjunta destes dois fatores permitisse tanto o favorecimento do acúmulo do xilitol pela limitação na disponibilidade de oxigênio, evidenciado no fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$), quanto do consumo de xilose pela atuação da sacarose como co-substrato, o que poderia se refletir consequentemente na produtividade volumétrica de xilitol (Q_P).

Nesse sentido, a fase inicial deste estudo foi a otimização dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose para maximização conjunta dos parâmetros $Y_{P/S}$ e Q_P. A partir dos resultados desta fase, o estudo foi estendido para a exploração mais detalhada do efeito da sacarose como co-substrato a partir de duas estratégias: 1) avaliação de diferentes concentrações iniciais de sacarose, porém fixando a condição de K_La que favoreceu o consumo de xilose; 2) estudo do efeito da alimentação parcelada de sacarose durante a fermentação, usando a condição de K_La otimizada e outra na qual o consumo de xilose foi favorecido. Por último, são apresentados resultados da avaliação preliminar do efeito da suplementação de melaço de cana ao meio de fermentação e a possível substituição de nutrientes na produção de xilitol por *C. tropicalis*.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Otimização dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose para maximização da produção de xilitol por C. tropicalis

Um planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi utilizado para avaliar a significância dos efeitos das variáveis K_La (Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) e concentração inicial de sacarose (gL^{-1}). As variáveis de resposta foram o consumo de xilose (%), fator de conversão de xilose em xilitol (gg^{-1}), a produtividade volumétrica de xilitol ($gL^{-1}h^{-1}$) e crescimento celular, expresso como biomassa celular formada (gL^{-1}). Os níveis dos fatores avaliados, junto com os correspondentes valores reais e codificados, em função dos experimentos realizados são apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Níveis codificados e reais dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose avaliados no Delineamento Composto Central Rotacional.

Exp.	Níveis codificados		Níveis reais	
	X_1	X_2	K_La (h^{-1}) X_1	Concentração inicial de sacarose (gL^{-1}) X_2
1	-1	-1	5	5
2	+1	-1	25	5
3	-1	+1	5	25
4	+1	+1	25	25
5	-1,41	0	0,9	15
6	+1,41	0	29,1	15
7	0	-1,41	15	0,9
8	0	+1,41	15	29,1
9	0	0	15	15
10	0	0	15	15
11	0	0	15	15

Fonte: Arquivo próprio

2.2.1.1 Micro-organismo e preparo do inóculo

Foi utilizada a levedura *C. tropicalis*, previamente denominada *C. guilliermondii* FTI 20037 (ATCC 201935), a qual foi selecionada por Barbosa et al. (1988) por sua capacidade de produção de xilitol. A levedura foi identificada como *C. tropicalis* mediante amplificação e sequenciamento da região do ITS 1, conforme descrito por Queiroz (2019) e indicado previamente. Para conservação a curto prazo, a levedura foi mantida a 4 ºC em ágar extrato de malte. Estes cultivos foram empregados para o preparo do inóculo em meio com a

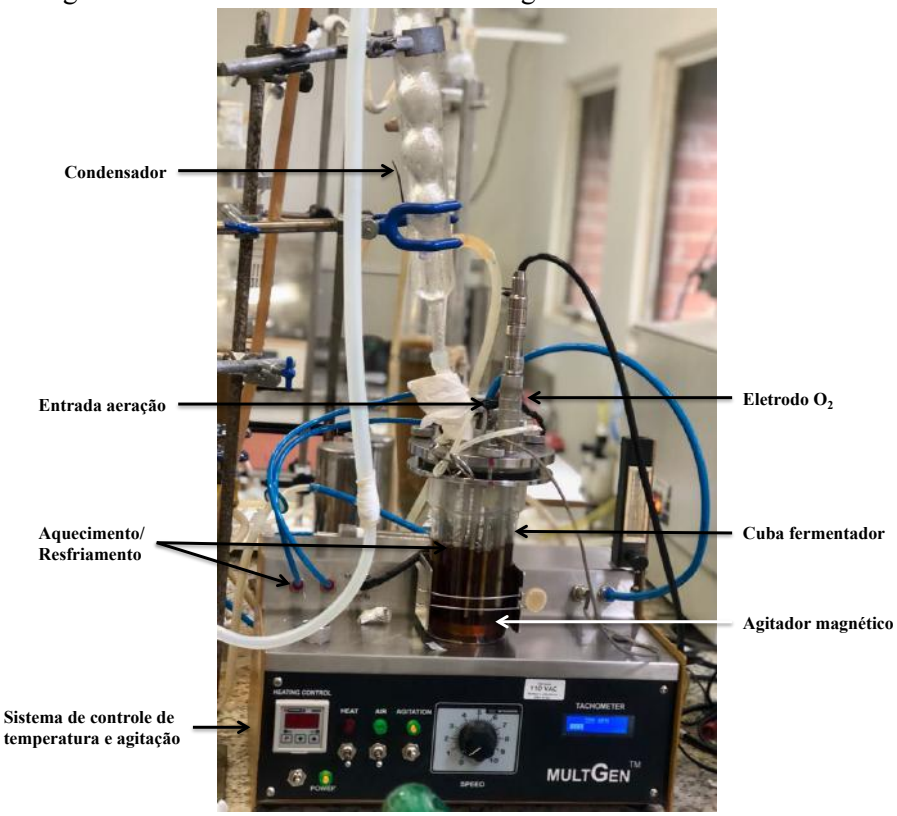
seguinte composição (gL^{-1}): xilose (30,0), solução de extrato de farelo de arroz (20,0), $(NH_4)_2SO_4$ (2,0) e $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,1). O pH inicial do meio foi ajustado a 5,5 com NaOH 6 N. O cultivo ocorreu em frascos Erlenmeyer de 2000 mL com 800 mL do meio, incubados a 30 ºC em shaker de agitação orbital ajustada em 200 rpm, por 24 h. Após esse tempo, os cultivos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 min para separação da biomassa celular, a qual foi lavada e posteriormente ressuspendida em agua destilada estéril em volume adequado, de forma a que após ser inoculada no meio de fermentação se obtivesse uma concentração celular inicial de 1 gL^{-1}, correspondente a aproximadamente 10^7 células/mL.

2.2.1.2 Meios e condições de fermentação

O meio de fermentação foi constituído pelo hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana concentrado e destoxificado, conforme procedimentos apresentados no item 1.2.2, e posteriormente autoclavado a 115 ºC por 15 min. O hidrolisado hemicelulósico foi suplementado (gL^{-1}) com: solução de extrato de farelo de arroz (20,0), $(NH_4)_2SO_4$ (2,0), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,1). Sacarose foi adicionada também ao meio de cultura nas concentrações estabelecidas no planejamento, conforme Tabela 2.1. O pH inicial do meio foi ajustado a 5,5 com NaOH micro pérolas e não controlado durante as fermentações.

Foi utilizado o biorreator de bancada Multgen (New Brunswick Scientific Ltda.) (Figura 2.1), do tipo tanque agitado (*STR*), com capacidade total de 1,0 L e volume máximo de trabalho de 800 mL. O biorreator é equipado com duas turbinas Rushton (com 15 mm de separação entre elas) com 6 pás planas (16 mm de largura e 10 mm de comprimento), controle de temperatura e oxigênio dissolvido. O volume utilizado foi de 400 mL, a agitação foi fixada em 350 rpm e a aeração foi ajustada em função dos valores de K_La estabelecidos no planejamento (Tabela 2.1) e tempo de fermentação foi 72 h. Amostras foram coletadas nos tempos 0, 8, 24, 48 e 72 h.

Figura 2.1 - Fotografia do fermentador de bancada Multgen.



Fonte: Arquivo próprio.

Fermentações foram realizadas para confirmação das condições simuladas para maximização das variáveis $Y_{P/S}$ e Q_P, bem como sem adição de sacarose na condição de K_La otimizada como experimento controle. Experimentos adicionais foram executados com o intuito de realizar uma exploração do efeito da sacarose como co-substrato na produção de xilitol por *C. tropicalis*, correspondentes a fermentações com K_La 15 h^{-1}, com adição de sacarose em concentração 5 gL^{-1} e sem suplementação deste dissacarídeo, bem como à avaliação da alimentação parcelada da sacarose. Para este último, os experimentos foram realizados com K_La 6,5 h^{-1} e 15 h^{-1}, e com adição da sacarose em parcelas a cada 24 h, desde o início da fermentação até 96 h, prolongando o cultivo até 120 h. A sacarose foi alimentada a partir de soluções concentradas, ajustadas para fornecer uma concentração de 5 gL^{-1} no meio (adicional ao presente no meio antes do meio) e com adição do mesmo volume em todas as parcelas. Neste caso, amostras foram tiradas nos tempos (h): 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120. No caso dos tempos 24, 48, 72 e 96 h, amostras foram tiradas antes e depois da adição da parcela de sacarose correspondente.

2.2.2 Avaliação preliminar do melaço de cana como suplemento nutricional do meio de fermentação

Foi empregado um planejamento fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central para avaliação da significância dos efeitos dos fatores melaço de cana e suplementação nutricional de referência sobre as variáveis consumo de xilose (%), fator de conversão de xilose em xilitol (gg^{-1}) e produtividade volumétrica de xilitol ($gL^{-1}h^{-1}$), conforme níveis apresentados na Tabela 2.2. A suplementação nutricional de referência foi definida como aquela convencionalmente empregada nos estudos de produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 a partir de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço ou palha de cana na EEL/USP, a exemplo dos trabalhos de Arruda et al. (2017) e Hernández-Pérez et al. (2016), respectivamente. Os níveis do fator melaço de cana foram definidos em função da concentração de sacarose no meio de fermentação resultante da adição do melaço, baseado nos resultados de pesquisa recente sobre o efeito da adição de sacarose ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana na produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016).

Tabela 2.2 – Níveis codificados e reais dos fatores melaço de cana e suplementação nutricional de referência avaliados no planejamento fatorial completo 2^2.

Exp.	**Níveis codificados**		**Níveis reais**	
	X_1	X_2	**Melaço de cana (Sacarose gL^{-1})** X_1	**Suplementação nutricional de referência** X_2
1	-1	-1	0	Ausente
2	+1	-1	20	Ausente
3	-1	+1	0	Completa[1]
4	+1	+1	20	Completa[1]
5	0	0	10	Parcial[2]
6	0	0	10	Parcial[2]
7	0	0	10	Parcial[2]

[1]**Suplementação nutricional de referência completa (gL^{-1}):** Solução de extrato de farelo de arroz (20,0); $(NH_4)_2SO_4$ (2,0) e $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,1); [2]**Suplementação nutricional de referência parcial (gL^{-1}):** $(NH_4)_2SO_4$ (2,0).
Fonte: Arquivo próprio

Foi utilizada a levedura *C. tropicalis* e preparo de inóculo conforme apresentado no item 2.2.1.1, exceto pelo emprego para os cultivos de frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL do meio. O meio de fermentação foi constituído pelo hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana, concentrado, destoxificado e autoclavado, conforme indicado no item 2.2.1.2. O hidrolisado hemicelulósico foi suplementado conforme as

condições estabelecidas na Tabela 2.2. O pH do meio de fermentação foi ajustado a 5,5 com micropérolas de NaOH e não foi controlado durante os experimentos. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL do meio, incubados a 30 ºC durante 72h em shaker de agitação orbital, ajustada a 200 rpm. Amostras foram coletadas nos tempos (h) 0, 24 e 48.

2.2.3 Análise estatística

Para análise estatística dos dados obtidos foram empregados os *softwares Design Expert* e *Statistica*. No caso dos experimentos do item 2.1, a análise da significância dos efeitos dos fatores e análise de variância (ANOVA) dos modelos compostos foi realizada empregando ambos programas, verificando a obtenção dos mesmos resultados. Foram empregadas as ferramentas gráficas de *Statistica* para os gráficos de Pareto e superfícies de resposta 3D. O *software Design Expert* foi utilizado para otimização gráfica dos fatores e simulação das condições dentro da região ótima com base nos modelos compostos. No caso dos experimentos do item 2.2, o *software Statistica* foi usado para análise da significância dos efeitos e construção dos gráficos de Pareto correspondentes.

2.2.4 Métodos analíticos

2.2.4.1 Concentração e viabilidade celular

A concentração celular foi quantificada mediante turbidimetria correlacionando a concentração em massa seca das células com a absorbância a 600nm, utilizando espectrofotômetro DU 800® (Beckman Coulters), a partir de uma curva padrão, obtida a partir do cultivo da levedura em meio semidefinido com xilose como única fonte de carbono. A viabilidade celular foi determinada mediante visualização de lâminas preparadas a fresco com azul de metileno, enquanto que a pureza do cultivo foi avaliada mediante visualização de lâminas fixadas e coradas com safranina.

2.2.4.2 Concentração de açúcares, xilitol, etanol, glicerol, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural.

As concentrações de açúcares (xilose, glicose, arabinose), glicerol, xilitol, etanol e ácido acético foram determinadas por CLAE. Foi usado um cromatógrafo Agilent 1200 (Kyoto, Japão), com um detector de índice de refração e coluna Bio Rad (Hercules, CA) Aminex HPX-87H, mantida a 45 ºC, com H_2SO_4 0,01 N como eluente, e fluxo de 0,6 mL min^{-1}. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro *Sep Pak* C18 (Millipore). A concentração de sacarose foi determinada também por CLAE, usando o mesmo cromatógrafo com detector de índice de refração, porém com uma coluna Bio Rad (Hercules, CA) Aminex HPX- 87P, mantida a 60 ºC, com água deionizada como eluente, e fluxo de 0,4 mL min^{-1}. As amostras foram também previamente diluídas e filtradas em filtro *Sep Pak* C18 (Millipore). Em todos os casos, as concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

2.2.4.3 Coeficiente de transferência de oxigênio (K_La)

Os valores de K_La foram determinados empregando a metodologia de *gassing-out* (PIRT, 1975), o qual foi baseado no método de medição dinâmica proposto por Bandyopadhay, Humphrey e Taguchi (1967). O eletrodo de oxigênio dissolvido foi polarizado e calibrado seguindo as recomendações do fabricante. Para tanto, inicialmente foi realizada eliminação completa do oxigênio mediante injeção de nitrogênio até obter uma concentração de oxigênio dissolvido igual a zero, correspondente à calibração de 0% de oxigênio, seguido pela restituição do fluxo de ar no sistema até registrar uma concentração de oxigênio dissolvido máximo e constante, definida como 100% de oxigênio. Para determinação do K_La, o meio de fermentação em ausência de micro-organismos foi novamente desoxigenado mediante injeção de nitrogênio para reduzir a concentração de oxigênio dissolvido a zero. A seguir, as condições de agitação e aeração foram ajustadas e o fluxo de ar iniciado no sistema. Os valores de concentração de oxigênio dissolvido foram registrados a cada 5s durante a reoxigenação do sistema até 120s. O balanço de massa de oxigênio dissolvido na fase líquida quando não há assimilação de oxigênio, e o valor de K_La foram expressos conforme as equações 2.1 e 2.2, respectivamente.

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a\,(C^* - C_L) \qquad (2.1)$$

$$\ln\left(1 - \frac{C_L}{C^*}\right) = -K_L a \times t \qquad (2.2)$$

Onde C_L corresponde a concentração de oxigênio dissolvido e C^* à concentração de saturação de oxigênio no líquido. A fração $\frac{C_L}{C^*}$ corresponde à leitura do eletrodo em cada instante registrado. Os valores do termo $\ln\left(1 - \frac{C_L}{C^*}\right)$ foram plotados em função do tempo (s) para determinação do K_La (h^{-1}), correspondente à inclinação da curva obtida.

2.2.4.4 Determinação de parâmetros fermentativos

a. Fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$)

O fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$), expressado em gg^{-1}, correspondeu ao coeficiente angular na equação 2.3, obtida do gráfico da concentração de xilitol (*ΔP*) em função da concentração de xilose (*ΔS*).

$$\Delta P = Y_{P/S} \times (-\Delta S) + b \qquad (2.3)$$

b. Eficiência de bioconversão de xilose em xilitol:

A eficiência de fermentação (η), expressada em %, correspondeu à relação entre o fator de conversão de xilose em xilitol calculado a partir dos resultados experimentais ($Y_{P/S}$) e aquele definido como teórico ($Y_{P/S\,teo}$), determinado em 0,917 gg^{-1}por Barbosa et al. (1998), conforme equação 2.4:

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S\,teo}} \times 100 \qquad (2.4)$$

c. Produtividade volumétrica de xilitol (Q_P):

A produtividade volumétrica de xilitol (Q_P), expressada em $gL^{-1}h^{-1}$, correspondeu coeficiente angular na equação 2.5, obtida do gráfico da concentração de xilitol (*ΔP*) em função do tempo (*Δt*).

$$\frac{\Delta P}{\Delta t} = Q_P \qquad (2.5)$$

d. Velocidade volumétrica de consumo de xilose (r_S) ou de sacarose (r_{Sac}):

As velocidades volumétricas de consumo de xilose ou de sacarose, expressadas em $gL^{-1}h^{-1}$, corresponderam aos coeficientes angulares nas equações 2.6 e 2.7, respectivamente, obtidas dos gráficos das concentrações de xilose (*ΔS*) ou sacarose (*ΔSac*), respectivamente, em função do tempo (*Δt*).

$$\Delta S = -r_S \times (\Delta t) + b \qquad (2.6)$$

$$\Delta Sac = -r_{Sac} \times (\Delta t) + b \qquad (2.7)$$

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Otimização dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose para maximização da produção de xilitol por C. tropicalis

Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi empregado para avaliar a significância dos efeitos dos fatores K_La (h^{-1}) e concentração inicial de sacarose (gL^{-1}) nas variáveis consumo de xilose (S, %), fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$, gg^{-1}), a produtividade volumétrica de xilitol (Q_P, $gL^{-1}h^{-1}$) e crescimento celular (X, gL^{-1}). A partir dos resultados dos experimentos deste planejamento, foram estabelecidos modelos para $Y_{P/S}$ e Q_P e foi realizada uma otimização gráfica dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose para maximizar estas duas variáveis. Por fim, experimentos foram realizados nas condições definidas como ótimas para comprovação das simulações feitas baseadas nos modelos ajustados.

2.3.1.1 Avaliação da significância dos efeitos de K_La e concentração inicial de sacarose no consumo de xilose, produção de xilitol e crescimento celular de *C. tropicalis*

Na Tabela 2.3 são apresentados os resultados de consumo de sacarose e xilose, produção de xilitol e crescimento celular de *C. tropicalis* sob as diferentes condições de K_La e concentração inicial de sacarose estabelecidos no DCCR.

Tabela 2.3 - Consumo de xilose e sacarose, produção de xilitol e crescimento celular de *C. tropicalis*, cultivada durante 72 h no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana, sob diferentes condições de K_La e de concentração inicial de sacarose.

Exp.	Fatores codificados		Fatores experimentais		Consumo de sacarose		Consumo de xilose			Produção de xilitol			Crescimento celular
	X_1	X_2	K_La (h^{-1})	Sacarose (gL^{-1})	[1]Sac (%)	[2]r_{sac} ($gL^{-1}h^{-1}$)	Xilose inicial (gL^{-1})	[3]S (%)	[4]r_S ($gL^{-1}h^{-1}$)	[5]P (gL^{-1})	[6]$Y_{P/S}$ (gg^{-1})	[7]Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	[8]X (gL^{-1})
1	-1	-1	5	5	100	0,26	63,20	74,50	0,62	32,27	0,68	0,45	9,48
2	+1	-1	25	5	100	0,27	60,50	52,82	0,55	0,00	0,00	0,00	15,98
3	-1	+1	5	25	100	0,31	63,06	75,40	0,70	22,65	0,48	0,33	6,47
4	+1	+1	25	25	100	0,29	59,38	62,52	0,59	11,90	0,32	0,18	18,64
5	-1,41	0	0,9	15	71,10	0,16	60,48	39,98	0,30	12,62	0,52	0,18	2,13
6	+1,41	0	29,1	15	100	0,51	63,93	63,99	0,59	0,00	0,00	0,00	11,20
7	0	-1,41	15	0,9	100	0,03	59,95	98,23	0,92	31,19	0,53	0,43	18,55
8	0	+1,41	15	29,1	100	0,40	61,68	78,57	0,72	22,44	0,44	0,31	18,42
9	0	0	15	15	100	0,29	62,48	59,16	0,53	11,40	0,31	0,16	18,55
10	0	0	15	15	100	0,27	62,56	63,15	0,55	13,44	0,33	0,19	16,35
11	0	0	15	15	100	0,33	61,88	64,99	0,56	13,89	0,35	0,19	18,17

[1]**Sac** = Sacarose consumida; [2]r_{sac} = Velocidade volumétrica de consumo de sacarose; [3]**S** = Xilose consumida; [4]r_s = Velocidade volumétrica de consumo de xilose; [5]**P** = Xilitol produzido após 72h; [6]$Y_{P/S}$ = Fator de conversão de xilose em xilitol; [7]Q_P = Produtividade volumétrica de xilitol; [8]**X** = Biomassa celular formada após 72h.

Fonte: Arquivo próprio

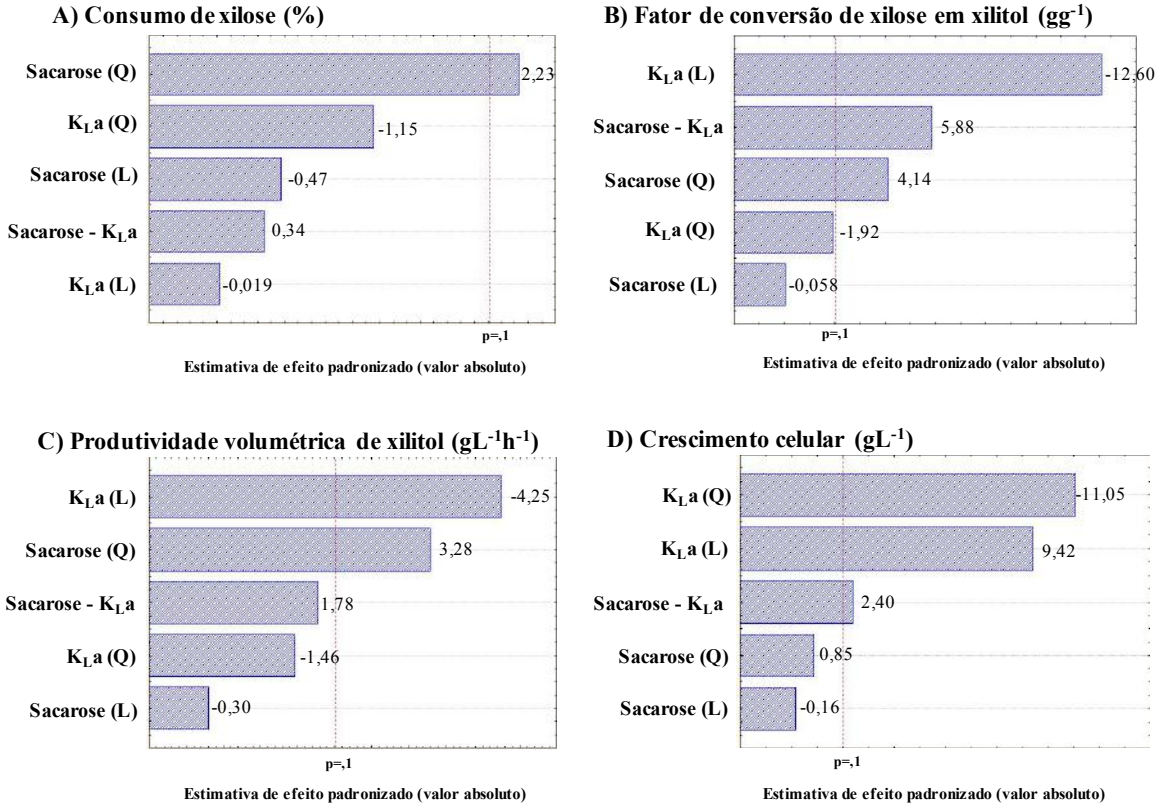
Verifica-se na Tabela 2.3 o esgotamento da sacarose suplementada ao meio de fermentação nos experimentos realizados, com exceção do experimento com o menor K_La (0,9 h^{-1}) e o ponto central para concentração inicial de sacarose (15 gL^{-1}) (Experimento 5). A velocidade volumétrica de consumo de sacarose (r_{sac}) foi positivamente influenciada pelo aumento do K_La e da concentração inicial deste dissacarídeo. Não foram encontrados relatos na literatura quanto ao mecanismo de transporte e hidrólise da sacarose específicos para *C. tropicalis*. Entretanto, para *C. albicans*, uma levedura filogeneticamente próxima a *C. tropicalis*, Williamson, Huber e Bennet (1993) demonstraram que a sacarose era transportada por um sistema induzível simporte com H^+ e clivada por uma α-glicosidase intracelular, a qual era induzida por sacarose e maltose e reprimida por glicose. A este respeito, é importante mencionar que não foi detectado acúmulo de glicose ou frutose no meio de fermentação ao longo do cultivo em nenhuma das condições aqui avaliadas. Se o mesmo sistema de *C. albicans* for empregado por *C. tropicalis*, o aumento na concentração inicial de sacarose favoreceria a indução do transporte e hidrólise deste dissacarídeo, constatável por um aumento na r_{Sac}, conforme observado no presente trabalho.

Observou-se consumo simultâneo de sacarose e xilose principalmente a partir de 8h, coincidente com o esgotamento da glicose (dados não apresentados), e até a depleção deste dissacarídeo. O consumo simultâneo da xilose e sacarose é desejável para que este dissacarídeo seja utilizado pela levedura como co-substrato (KIM; RYU; SEO, 1999; TAMBURINI et al., 2010). Este comportamento foi verificado também por Hernández-Pérez et al. (2016) durante o cultivo de *C. guilliermondii* FTI 20037 no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana suplementado com sacarose (15 gL^{-1}), porém com emprego de frascos agitados. Consumo simultâneo de xilose e sacarose até esgotamento deste dissacarídeo (24 h) foi também relatado no estudo de Tamburini et al. (2010), no qual foi avaliado o efeito da suplementação de sacarose (30 gL^{-1}) ao meio definido contendo xilose (50 gL^{-1}) sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. tropicalis* em escala de frascos agitados.

Constata-se na Tabela 2.3 que os maiores valores de consumo de xilose (98,23%) e de velocidade volumétrica de consumo de xilose (r_S, 0,92 $gL^{-1}h^{-1}$) foram obtidos na condição com a menor concentração de sacarose testada (0,9 gL^{-1}) e no valor central de K_La (15 h^{-1}) (Experimento 7). Por outro lado, o menor valor de consumo desta pentose (39,98%) e r_S (0,30 $gL^{-1}h^{-1}$) foi obtido no experimento com menor valor de K_La (0,9 h^{-1}) e com valor central de concentração inicial de sacarose (15 gL^{-1}) (experimento 5). A análise estatística da

significância dos efeitos, apresentado na Figura 2.2 A, mostrou que apenas a concentração de sacarose teve um efeito significativo ($p < 0,1$) no consumo de xilose, o qual foi positivo e quadrático. O caráter quadrático positivo do efeito dificulta a definição de um nível ótimo para este fator, porém indica que o consumo de xilose foi favorecido não só por baixas concentrações de sacarose (como observado no experimento 7), mas também por altas concentrações deste dissacarídeo. De fato, consumos de xilose superiores a 74% foram obtidos nos experimentos com concentrações iniciais de sacarose de 25 e 29,1 gL^{-1} e valores de K_La de 5 e 15 h^{-1} (experimentos 3 e 8), respectivamente, os quais foram próximos ou inclusive maiores que os obtidos com menores concentrações iniciais de sacarose com os mesmos valores de K_La (Tabela 2.3).

Figura 2.2 - Gráfico de Pareto para a significância dos efeitos das variáveis concentração de sacarose e K_La no: A) consumo de xilose; B) fator de conversão de xilose em xilitol; C) produtividade volumétrica de xilitol (C); D) crescimento celular.



Fonte: Arquivo próprio

O efeito significativo quadrático positivo da concentração inicial da sacarose sobre o consumo de xilose por *C. tropicalis* indica que o aumento neste fator resultou em um impacto negativo até certo nível dentro da faixa estudada, a partir do qual o impacto foi positivo. A exploração dos dados apresentados na Tabela 2.3 permite sugerir impacto

negativo seria verificável até uma concentração inicial de sacarose de 15 gL^{-1}, mas que poderia ser influenciada pelo valor de K_La. No entanto, constata-se na Figura 2.2 A que a interação entre os fatores avaliados mostrou ter um efeito não significativo negativo, o que sugere que estas variáveis poderiam ser estudadas separadamente.

O impacto negativo do aumento da concentração inicial de sacarose sobre o consumo de xilose sugere uma possível interferência da assimilação do dissacarídeo sobre o metabolismo da pentose. Pode ser considerado que esta interferência seria mínima ou inexistente quanto à concorrência pelo sistema de transporte entre estes açúcares, uma vez que foi demonstrado que são consumidos simultaneamente, diferente do relatado na literatura com relação à glicose (TAMBURINI et al., 2010; ZHANG, G. et al., 2015; HOU et al., 2017). Por outro lado, a hidrólise intracelular da sacarose e liberação de glicose e frutose poderia ter um efeito repressivo na indução e/ou atividade da XR e/ou da XDH, conforme reportado na literatura para glicose (ZHANG, G. et al., 2015; HOU et al., 2017). No entanto, esta hipótese não seria suficiente para explicar o impacto positivo do aumento da concentração inicial de sacarose a valores maiores que 15 gL^{-1} sobre o consumo de xilose nas condições do presente estudo (Tabela 2.3). Neste sentido poderia se considerar que um dos efeitos do metabolismo da sacarose, simultâneo com o da xilose, pode ser promover a regeneração de cofatores, a exemplo do NADPH na PPP, o que indiretamente resultaria em um favorecimento da atividade da XR. Desta forma, o favorecimento do consumo de xilose teria ocorrido pelo balanço entre os impactos negativos e positivos do metabolismo simultâneo desta com o da sacarose em função da concentração inicial deste dissacarídeo.

Por outro lado, apesar que o fator K_La teve um efeito não significativo no consumo de xilose, destaca-se que o efeito quadrático deste foi superior ao efeito linear, mas que em ambos casos foi negativo. Isto sugere que nas condições do presente estudo o K_La favoreceu o consumo de xilose até certo nível dentro da faixa estudada, sugerindo a possível existência de um ponto ótimo. A exploração dos dados apresentados na Tabela 2.3 permite sugerir que este ponto ótimo de K_La seria menor a 25 h^{-1}, possivelmente próximo a 15 h^{-1}. Entretanto, a ANOVA para o modelo empírico composto para a variável consumo de xilose em função do K_La e concentração inicial de sacarose, apresentado na Tabela 2.4, mostrou que este foi não significativo ($p>0,05$), enquanto que a falta de ajuste foi significativa ($p<0,05$). Este resultado impossibilita o uso do modelo empírico construído para otimização dos fatores estudados para maximização do consumo de xilose.

Tabela 2.4 - Teste ANOVA para o modelo quadrático composto para os efeitos do K_La e concentração inicial de sacarose no consumo de xilose

Fonte	Soma de quadrados	[1]GL	Média dos quadrados	F valor	P valor	
Modelo	1456,89	5	291,38	1,78	0,2711	Não significativo
K_La (X_1)	0,062	1	0,062	$3,82 \times 10^{-4}$	0,9852	
Sacarose (X_2)	36,99	1	36,99	0,23	0,6545	
X_1X_2	19,36	1	19,36	0,12	0,7449	
X_1^2	217,28	1	217,28	1,33	0,3014	
X_2^2	816,55		816,55	4,99	0,0758	
Residual	818,47	5	163,69			
Falta de ajuste	800,70	3	266,90	30,05	0,0324	Significativa
Erro puro	17,76	2	8,88			
Total	2275,36	10				
R^2	0,64					

[1]**GL** = Graus de liberdade; * Nível de confiança 95%
Fonte: Arquivo próprio

Com relação à produção de xilitol, os maiores valores de $Y_{P/S}$, (0,68 gg^{-1}) e Q_P (0,45 $gL^{-1}h^{-1}$) foram obtidos no experimento com K_La 5 h^{-1} e concentração de sacarose 5 gL^{-1} (Experimento 1) (Tabela 2.3). Resultado similar de Q_P (0,43 $gL^{-1}h^{-1}$) foi obtido no experimento com a menor concentração de sacarose avaliada (0,9 gL^{-1}) e o ponto central para K_La (15 h^{-1}) (experimento 7), no qual foi também constatado a maior r_S e menor r_{Sac}, conforme discutido previamente. A análise estatística da significância dos efeitos dos fatores estudados no $Y_{P/S}$ (Figura 2.2B) e no Q_P (Figura 2.2C) mostraram que tanto o K_La quanto a concentração inicial de sacarose tiveram efeitos significativos nestas variáveis, sendo que o maior efeito em ambos casos foi o do K_La, o qual foi linear e negativo. Já o efeito significativo da concentração inicial de sacarose para ambas variáveis foi quadrático positivo, como foi também constatado para o consumo de xilose (Figura 2.2A) e previamente discutido. Destaca-se que no caso do $Y_{P/S}$ a interação entre os fatores teve um efeito significativo superior ao da concentração inicial de sacarose.

O crescimento celular de *C. tropicalis* também foi monitorado durante as fermentações e considerado na análise estatística, sem o intuito de maximização desta variável. Verifica-se na Tabela 2.3 que os maiores valores de crescimento celular foram atingidos nos experimentos com K_La 15 h^{-1} e 25 h^{-1}, correspondente a valores entre 15 e 18 gL^{-1}. A análise estatística da significância dos efeitos, apresentado na Figura 2.2D, indica que apenas o K_La teve efeito significativo, tanto linear positivo quanto quadrático negativo. Este resultado demonstra que o aumento no K_La favoreceu o crescimento celular, o qual é coerente com o favorecimento do metabolismo respiratório pela alta disponibilidade de

oxigênio, porém com a presença de um ponto ótimo na faixa de valores estudados no presente trabalho.

Testes ANOVA foram realizados para os modelos quadráticos compostos para as respostas Yp/s, Q_P e crescimento celular, e os resultados são apresentados na Tabela 2.5, Tabela 2.6 e Tabela 2.7, respectivamente. Os modelos são mostrados com valores reais nas equações 1, 2 e 3, respectivamente, os quais tiveram coeficientes de determinação (R^2) de 0,96, 0,84 e 0,98, respectivamente. Coeficientes com baixa significância foram excluídos dos modelos, exceto quando necessário para manter a hierarquia do modelo. O ajuste adequado dos valores de resposta para compor as equações foi determinada pela significância do modelo ($P<0,05$) e a não significância do teste de falta de ajuste ($p > 0,05$) com nível de confiança de 95%. Para melhor compreensão do efeito dos fatores estudados na Q_P, utilizou-se o modelo correspondente para compor a superfície de resposta, apesar de sua significativa falta de ajuste (Tabela 2.6). Assim, baseado nos modelos quadráticos estabelecidos, superfícies de resposta 3D foram plotadas para revelar o efeito das variáveis estudadas sobre o $Y_{P/S}$ (Figura 2.3A), Q_P (Figura 2.3B) e crescimento celular (Figura 2.3C).

Tabela 2.5 - Teste ANOVA para o modelo quadrático composto para os efeitos do K_La e concentração inicial de sacarose no fator de conversão de xilose em xilitol.

Fonte	Soma de quadrados	[1]GL	Média dos quadrados	F valor	P valor	
Modelo	0,43	4	0,11	37,66	0,0002	Significativo
K_La (X_1)	0,31	1	0,31	109,97	<0,0001	
Sacarose (X_2)	$6,62 \times 10^{-6}$	1	$6,62 \times 10^{-6}$	$2,35 \times 10^{-3}$	0,9629	
X_1X_2	0,068	1	0,068	23,96	0,0027	
X_2^2	0,047	1	0,047	16,72	0,0064	
Residual	0,017	6	$2,82 \times 10^{-3}$			
Falta de ajuste	0,016	4	$4,03 \times 10^{-3}$	10,08	0,0923	Não significativa
Erro puro	$8,0 \times 10^{-4}$	2	$4,0 \times 10^{-4}$			
Total	0,44	10				
R^2	0,96					

[1]**GL** = Graus de liberdade; * Nível de confiança 95%
Fonte: Arquivo próprio

Tabela 2.6 - Teste ANOVA para o modelo quadrático composto para os efeitos do K_La e concentração inicial de sacarose na produtividade volumétrica de xilitol.

Fonte	Soma de quadrados	[1]GL	Média dos quadrados	F valor	P valor	
Modelo	0,18	4	0,045	7,66	0,0154	Significativo
K_La (X_1)	0,089	1	0,089	15,24	0,0080	
Sacarose (X_2)	$4,46 \times 10^{-4}$	1	$4,46 \times 10^{-4}$	0,076	0,7920	
X_1X_2	0,016	1	0,016	2,67	0,1535	
X_2^2	0,074	1	0,074	12,66	0,0119	
Residual	0,035	6	$5,86 \times 10^{-3}$			
Falta de ajuste	0,034	4	$8,59 \times 10^{-3}$	21,47	0,0450	Significativo
Erro puro	$8,0 \times 10^{-4}$	2	$4,0 \times 10^{-4}$			
Total	0,21	10				
R^2	0,84					

[1]**GL** = Graus de liberdade; * Nível de confiança 95%
Fonte: Arquivo próprio

Tabela 2.7 - Teste ANOVA para o modelo quadrático composto para os efeitos do K_La e concentração de sacarose sobre o crescimento celular.

Fonte	Soma de quadrados	[1]GL	Média dos quadrados	F valor	P valor	
Modelo	327,17	4	81,79	61,36	<0,0001	Significativo
K_La (X_1)	124,08	1	124,08	93,08	<0,0001	
Sacarose (X_2)	0,036	1	0,036	0,027	0,8755	
X_1X_2	8,04	1	8,04	6,03	0,0494	
X_2^2	195,02	1	195,02	146,30	<0,0001	
Residual	8,0	6	1,33			
Falta de ajuste	5,23	4	1,31	0,95	0,5720	Não significativo
Erro puro	2,77	2	1,38			
Total	335,17	10				
R^2	0,98					

[1]**GL** = Graus de liberdade; * Nível de confiança 95%
Fonte: Arquivo próprio

$$Y_1 = 1{,}08273 - 0{,}039224X_1 - 0{,}045797X_2 + 1{,}30x10^{-3}X_1X_2 + 8{,}73529x10^{-4}X_2^2 \qquad (\mathbf{2.1})$$

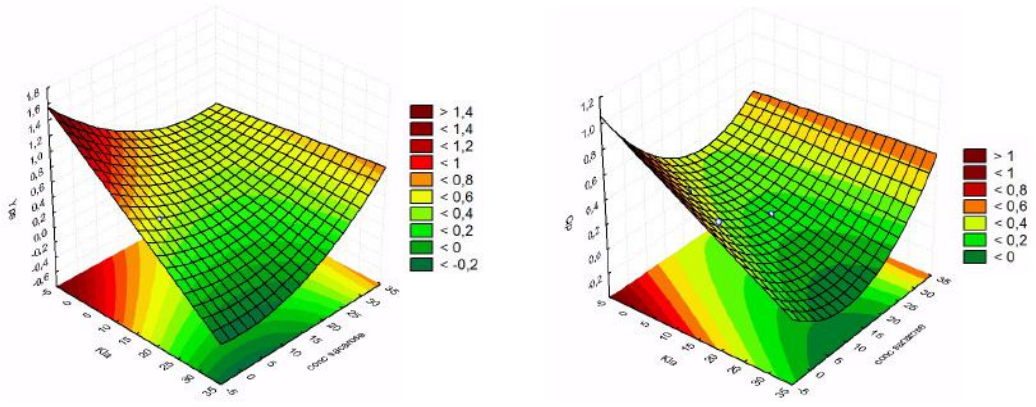
$$Y_2 = 0{,}69624 - 0{,}019954X_1 - 0{,}042989X_2 + 6{,}25x10^{-4}X_1X_2 + 1{,}09559x10^{-3}X_2^2 \qquad (\mathbf{2.2})$$

$$Y_3 = 2.76084 + 1.87510X_1 - 0.21930X_2 + 0.014175X_1X_2 - 0.05644X_1^2 \qquad (\mathbf{2.3})$$

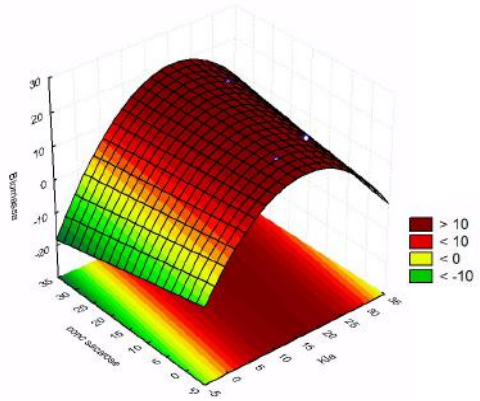
Onde Y_1 é o fator de conversão de xilose em xilitol (gg^{-1}), Y_2 é a produtividade volumétrica de xilitol ($gL^{-1}h^{-1}$), Y_3 é o crescimento celular (gL^{-1}), X_1 é o K_La (h^{-1}) e X_2 é a concentração inicial de sacarose (gL^{-1}).

Figura 2.3 - Superfícies de resposta 3D para o fator de conversão de xilose em xilitol (A), produtividade volumétrica de xilitol (B) e crescimento celular (C) em função dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose.

A) Fator de conversão de xilose em xilitol (gg^{-1}) **B) Produtividade volumétrica de xilitol ($gL^{-1}h^{-1}$)**



C) Crescimento celular (gL^{-1})



Fonte: Arquivo próprio

Os gráficos de superfície de resposta para $Y_{P/S}$ (Figura 2.3A) e Q_P (Figura 2.3B) demonstram que o aumento dos valores nestas variáveis foi inversamente proporcional ao incremento de K_La na faixa estudada no presente trabalho. Estes resultados corroboram a importância da limitação da disponibilidade de oxigênio na bioconversão de xilose em xilitol, conforme relatado para *C. guilliermondii* FTI 20037 e com emprego de hidrolisados hemicelulósicos provenientes unicamente do bagaço de cana (SILVA et al., 1997; MARTÍNEZ; SILVA; FELIPE, 2000; MORITA; SILVA, 2000; ARRUDA et al., 2017) ou palha de arroz (ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999). Destaca-se que o efeito inversamente proporcional do K_La sobre o $Y_{P/S}$ e a Q_P foi evidente principalmente quando empregadas concentrações iniciais de sacarose próximas ou menores a 15 gL^{-1}, uma vez que com concentrações maiores deste dissacarídeo, a redução dos valores destas variáveis com o aumento do K_La foi mínima. Assim, os maiores valores de $Y_{P/S}$ e a Q_P foram obtidos com

valores próximos aos mínimos avaliados para aos fatores K_La e concentração inicial de sacarose.

É importante mencionar que a concentração inicial de sacarose exerceu impactos positivos e negativos no o $Y_{P/S}$ e na Q_P em função da concentração empregada. Verifica-se nas Figura 2.3A e B a redução do $Y_{P/S}$ e a Q_P com o incremento na concentração inicial de sacarose até valores próximos a 15 gL^{-1}, a partir do qual observa-se aumentos nos valores destas variáveis de resposta. Este aumento nos valores destas variáveis em concentrações iniciais de sacarose superiores ao ponto central foi mais evidente em condições de baixo K_La, e inclusive pode ser ressaltado que foi ainda mais evidente para o Q_P (Figura 2.3A) que para o $Y_{P/S}$ (Figura 2.3B). Os impactos da concentração inicial de sacarose no $Y_{P/S}$ e Q_P são coerentes com os discutidos previamente para o consumo de xilose, apesar de não ter sido possível a composição de um modelo significativo para esta variável. Assim, a atuação da sacarose como co-substrato na produção de xilitol por *C. tropicalis* está intrinsecamente relacionada com o efeito do metabolismo simultâneo deste dissacarídeo e da xilose, o qual é dependente da concentração inicial suplementada ao meio de fermentação e do K_La empregado.

Por outro lado, constata-se nas Figura 2.3 A, B e C que o efeito dos fatores estudados sobre o crescimento celular foi contrário ao observado para as variáveis relativas à produção de xilitol, uma vez que um aumento proporcional nesta variável com o incremento na concentração inicial de sacarose e no K_La, porém no caso deste último observa-se uma curvatura da superfície próximo a 15 h^{-1}, indicando que aumentos adicionais de K_La acima deste valor não resultaram em melhoria do crescimento celular (Figura 2.3C). Este comportamento é diferente ao constatado por Martínez et al. (2000), em cujo trabalho foi obtido aumento do crescimento celular de *C. guilliermondii* FTI 20037 com o incremento de K_La de 10 para 30 h^{-1}, quando cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Os resultados discutidos indicam que metabolismo simultâneo de sacarose e xilose teve impactos positivos e negativos sobre a conversão desta pentose em xilitol. O impacto positivo é baseado no fornecimento de uma fonte de carbono alternativa para suprir a demanda por intermediários carbonados, regeneração de cofatores e energia, a qual é restrita quando apenas a xilose é utilizada como fonte de carbono em função do acúmulo de xilitol em condições de baixa disponibilidade de oxigênio. Este impacto positivo é evidenciado

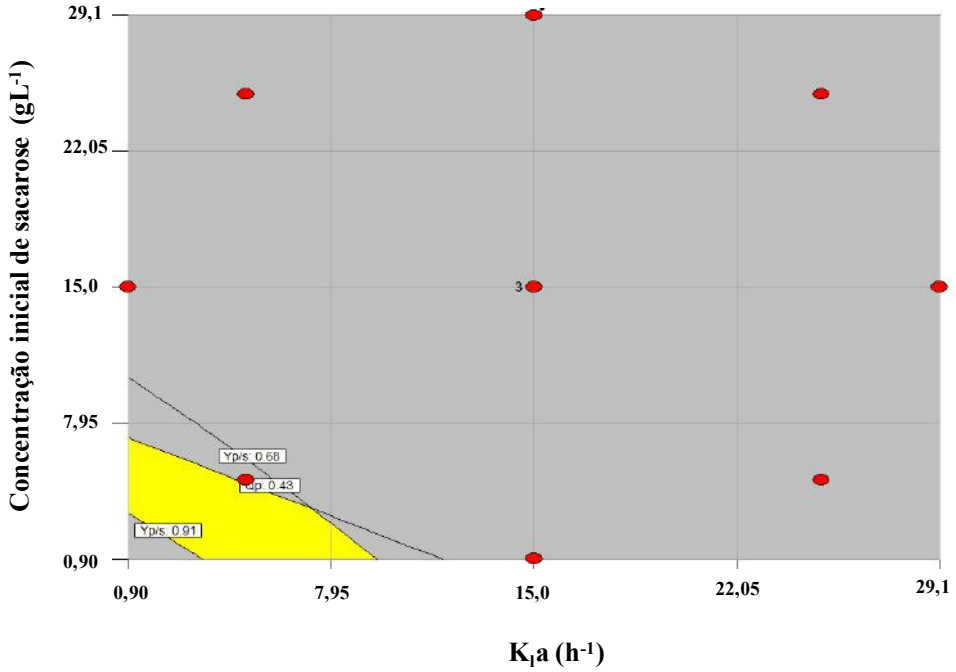
com o aumento na capacidade de consumo de xilose, formação de xilitol e crescimento celular.

Por outro lado, o impacto negativo pode ser baseado em dois efeitos: 1) A possível afetação da indução das enzimas XR e XDH pela presença de glicose a nível intracelular após transporte e hidrólise da sacarose, o que se evidencia em diminuição do consumo de xilose; 2) A redução do desequilíbrio redox $NADH/NAD^+$, responsável pelo acúmulo de xilitol, devido a regeneração do cofator NAD^+ pelo metabolismo respiratório ou em vias alternas como as de formação de etanol e glicerol, constatado pela redução do fator de conversão de xilose em xilitol. Destaca-se que o impacto negativo foi observado principalmente quando aumentada a concentração inicial de sacarose entre a mínima avaliada (0,9 gL^{-1}) e o ponto central da faixa estudada (15 gL^{-1}) e em condições de menor K_La; enquanto que o impacto positivo foi maioritário quando incrementada a concentração inicial de sacarose entre o ponto central e a máxima avaliada (29 gL^{-1}), e principalmente com maiores valores de K_La.

2.3.1.2 Maximização de $Y_{P/S}$ e Q_P pela otimização do K_La e concentração inicial de sacarose

Com base nos resultados fermentativos obtidos nas condições avaliadas no DCCR, uma otimização gráfica dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose foi proposta para maximizar $Y_{P/S}$ e Q_P. Desta forma, as áreas do gráfico, geradas pela ferramenta de otimização específica no software *Design Expert®,* foram selecionadas considerando a obtenção de valores superiores aos máximos obtidos nos experimentos do DCCR (exp. 1, 0,68gg^{-1} e 0,45$gL^{-1}h^{-1}$), conforme apresentado na Figura 2.4. Nesta figura os pontos vermelhos correspondem às condições avaliadas experimentalmente, enquanto que a região amarela corresponde à faixa de otimização.

Figura 2.4 - Gráfico para definir regiões de otimização dos fatores K_La e concentração inicial de sacarose



Fonte: Arquivo próprio

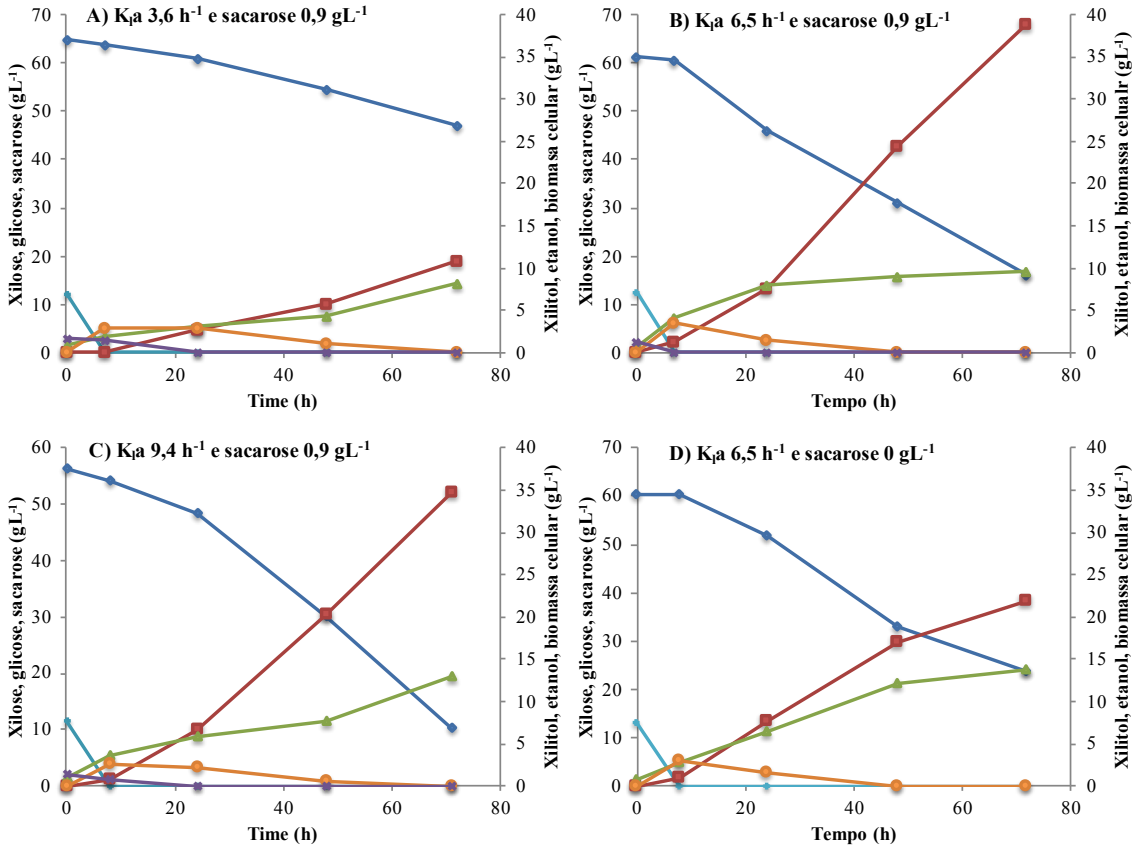
A partir de pontos na área de intersecção da região ótima para ambas as variáveis de $Y_{P/S}$ e Q_P (Figura 2.4), simulações baseadas nos modelos ajustados foram realizadas para vários valores de K_La e concentração de sacarose. Na Tabela 2.8 são apresentados os resultados preditos e experimentais para três das condições simuladas, nas quais os melhores resultados foram preditos. Destaca-se que para estas simulações a concentração inicial de sacarose foi fixada no valor mínimo avaliado no presente trabalho, enquanto que o K_La variou entre 3,6 e 9,4 h^{-1}, valores dentro da faixa de otimização (Figura 2.4). Outros parâmetros relativos ao consumo de xilose e crescimento celular foram inclusos também na Tabela 2.8, apesar que estes não foram considerados como parte da otimização, apenas com o intuito de facilitar a comparação do desempenho da levedura. Nesta tabela são mostrados também resultados de um experimento realizado sem adição de sacarose e usando o valor K_La predito dentro da região de otimização que resultou nos melhores resultados experimentais, o qual foi considerado como experimento controle (experimento 4). Na Figura 2.5 (A-D) são apresentados os perfis de consumo de xilose e sacarose, produção de xilitol e etanol, e crescimento celular, por *C. tropicalis* nas condições de fermentação estabelecidas para maximização de acordo com a Tabela 2.8.

Tabela 2.8 - Maximização do fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica de xilitol através da otimização do K_La e da concentração de sacarose.

Exp.	Fatores experimentais		Valores preditos		Valores experimentais		Outros parâmetros	
	K_La (h^{-1})	Sacarose (gL^{-1})	[1]Yp/s (gg^{-1})	[2]Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	[1]Yp/s (gg^{-1})	[2]Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	[3]r_S ($gL^{-1}h^{-1}$)	[4]X (gL^{-1})
1	3,6	0,9	0,91	0,59	0,62	0,15	0,25	7,24
2	6,5	0,9	0,80	0,53	0,86	0,54	0,67	8,97
3	9,4	0,9	0,69	0,48	0,75	0,49	0,71	12,10
4	6,5	0	-	-	0,6	0,33	0,59	12,94

[1]**Yp/s** = Fator de conversão de xilose em xilitol após 72h; [2]**Q_P** = Produtividade volumétrica de xilitol após 72h; [3]**r_s** = Velocidade volumétrica de consumo de xilose[4]**X**= Biomassa celular formada após 72h.
Fonte: Arquivo próprio.

Figura 2.5 - Consumo de xilose (◆), glicose (+) sacarose (x), crescimento celular (▲), produção de xilitol (■) e etanol (●) por *C. tropicalis* a partir do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana, sob diferentes condições de K_La e concentração inicial de sacarose: A) K_La 3,6 h^{-1} e sacarose 0,9 gL^{-1}; B) K_La 6,5 h^{-1} e sacarose 0,9 gL^{-1}; C) K_La 9,4 h^{-1} e sacarose 0,9 gL^{-1}; D) K_La 6,5 h^{-1} e sacarose 0 gL^{-1}.



Fonte: Arquivo próprio.

Verifica-se na Tabela 2.8 que os resultados experimentais nas condições 2 (K_La 6,5 h^{-1}) e 3 (K_La 9,4 h^{-1}) foram próximos aos simulados, diferente do observado para o experimento 1. Constata-se na Figura 2.5A o baixo consumo de xilose (27,3%) nas condições do experimento 1, correspondente ao menor K_La avaliado entre os experimentos

de maximização. A este respeito, é importante lembrar que a simulação dos cenários não incluiu o consumo de xilose, uma vez que não foi possível a confecção de um modelo significativo para esta variável. Destaca-se também que restrição do consumo de xilose pelo emprego de K_La menor a 5 h^{-1} foi também observado no experimento 5 do DCCR (Tabela 2.3), no qual foi atingido consumo de apenas 39,98% da xilose disponível em condições de K_La 0,9 h^{-1} mas com concentração inicial de sacarose de 15 gL^{-1}. A comparação destes dois resultados demonstra um efeito positivo da suplementação do meio de fermentação com sacarose, uma vez que maior consumo de xilose foi obtido com maior concentração inicial deste dissacarídeo apesar do emprego de um menor K_La.

Constatou-se a melhoria do $Y_{P/S}$ e Q_P nas condições 2 e 3 (Tabela 2.8) quando comparados com os maiores valores alcançados no DCCR (experimento 1, Tabela 2.3), coerente com os critérios de maximização. Os máximos valores para $Y_{P/S}$ (0,86 gg^{-1}) e Q_P (0,54 $gL^{-1}h^{-1}$) foram obtidos nas condições otimizadas de K_La 6,5 h^{-1} e sacarose 0,9 gL^{-1} (experimento 2, Tabela 2.8). Com base no $Y_{P/S}$ teórico (0,917 gg^{-1}), definido para a conversão bioquímica de xilose em xilitol por Barbosa et al. (1988), determinou-se que o máximo valor de $Y_{P/S}$ obtido no presente trabalho correspondeu a uma eficiência de bioconversão de 93,97%, equivalente à proporção de xilose consumida que foi efetivamente convertida em xilitol por *C. tropicalis*.

Os máximos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P obtidos nas condições otimizadas de K_La (6,5 h^{-1}) e concentração inicial de sacarose (0,9 gL^{-1}) representaram melhorias de 27% e 17%, respectivamente, com relação aos maiores valores obtidos entre os experimentos do DCCR (experimento 1, Tabela 2.3). Este valor de K_La (6,5 h^{-1}) foi selecionado para realizar um experimento sem suplementação de sacarose, considerado como controle (experimento 4, Tabela 2.8). Destaca-se que os máximos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P foram 30% e 39% maiores, respectivamente, que os atingidos no experimento sem suplementação de sacarose (0,60 gg^{-1} e 0,33 $gL^{-1}h^{-1}$, respectivamente). Estes resultados valorizam a atuação da sacarose como co-substrato na produção de xilitol por *C. tropicalis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana-de-açúcar.

É importante salientar que, além das melhorias mencionadas quanto aos parâmetros $Y_{P/S}$ e Q_P, podem ser verificadas também diferenças nos perfis de consumo de sacarose, xilose e crescimento celular entre as condições avaliadas na região de otimização. Quando comparadas as Figura 2.5 A, B e C, constata-se que a sacarose foi esgotada em 8h no experimento com K_La 6,5 h^{-1}, simultâneo com o consumo de glicose mas não de xilose;

enquanto que nos outros experimentos, com maior e menor K_La, o esgotamento da sacarose foi apenas observado às 24 h de cultivo, evidenciando-se consumo simultâneo com a xilose, similar aos perfis dos experimentos do DCCR. Com relação ao consumo de xilose e crescimento celular, destaca-se que houve aumentos na r_S e na biomassa celular formada diretamente relacionados com o incremento do K_La empregado (Tabela 2.8). Estes resultados podem ser atribuídos ao favorecimento do metabolismo respiratório pelo aumento na disponibilidade de oxigênio no meio de fermentação.

É possível verificar ainda na Tabela 2.8 que o experimento com K_La (6,5 h^{-1}) e suplementação de sacarose (0,9 gL^{-1}) apresentou uma r_S (0,67 $gL^{-1}h^{-1}$) 12% maior que aquela no experimento sem suplementação de sacarose (0,59 $gL^{-1}h^{-1}$), obtendo-se um consumo de xilose de 73,61% após 72 h de cultivo. Salienta-se que um incremento na r_S similar ao aqui obtido (9%) foi relatado por Hernández-Pérez et al. (2016) quando comparado o desempenho de *C. guilliermondii* FTI 20037 no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana suplementado ou não com sacarose (10 gL^{-1}) em escala de frascos agitados. Por outro lado, no experimento sem sacarose o crescimento celular (12,94 gL^{-1}) foi 31% maior que naquele com adição deste dissacarídeo (8,97 gL^{-1}). Adicionalmente, constata-se nas Figura 2.5 B e D que a produção de etanol foi similar entre estes dois experimentos, aproximadamente 3 gL^{-1}.

Com base nas diferenças nos resultados de consumo de xilose, produção de xilitol, etanol e crescimento celular entre os experimentos com e sem suplementação de sacarose, é possível sugerir ampliar a hipótese estabelecida previamente quanto à atuação da sacarose como co-substrato neste bioprocesso. Além de ter impactos positivos e negativos no consumo de xilose em função da concentração inicial de sacarose, os quais podem em consequência influenciar a produção de xilitol, este dissacarídeo pode ter também um impacto no na distribuição do fluxo de carbono proveniente da assimilação da xilose para produção de xilitol, etanol ou crescimento celular. A suplementação de sacarose ao meio de fermentação nas condições de estudo pode ter favorecido o acúmulo e excreção do xilitol, reduzido o crescimento celular, enquanto que não teve impacto na produção de etanol. Para esclarecimento do efeito da sacarose foi considerada a necessidade de exploração do desempenho de *C. tropicalis* em presença deste dissacarídeo, a partir da avaliação do impacto na condição de K_La que promoveu o maior consumo de xilose nos experimentos do DCCR, bem como mediante o estudo da suplementação alimentada deste dissacarídeo ao longo do cultivo. Esta exploração do efeito da sacarose é apresentada posteriormente.

Os resultados de maximização do $Y_{P/S}$ e Q_P pela otimização do K_La e concentração inicial de sacarose (0,86 gg^{-1} e 0,54 $gL^{-1}h^{-1}$, respectivamente) podem ser comparados com estudos similares para estas variáveis por separado. Com relação ao K_La, os resultados podem ser comparados com estudos empregando *C. guilliermondii* FTI 20037 e hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana (SILVA et al., 1997; MORITA; SILVA; FELIPE, 2000) e palha de arroz (ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999). O máximo valor de $Y_{P/S}$ aqui obtido foi 22% maior que o constatado por Silva et al. (1997) (0,67 gg^{-1}) com K_La 27 h^{-1}, mas o máximo valor de Q_P foi 38% menor ao destes autores (0,87 $gL^{-1}h^{-1}$), o qual é o maior encontrado até o momento entre os estudos com esta levedura em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, conforme apresentado previamente na Figura 4. Já quando comparado com os resultados de Morita, Silva e Felipe (2000) com K_La 10 h^{-1}, os máximos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P obtidos no presente trabalho foram 20% e 11% maiores aos destes autores (0,69 gg^{-1} e 0,48 $gL^{-1}h^{-1}$). De maneira similar, os valores $Y_{P/S}$ e Q_P aqui obtidos foram 15% e 22% maiores que os reportados por Roberto, Mancilha e Sato (1999) com K_La 12 h^{-1}. Por outro lado, é importante salientar que o máximo valor de $Y_{P/S}$ encontrado no presente estudo (0,86 gg^{-1}) é 6% maior que o reportado por Carvalho et al. (2004) (0,81 gg^{-1}) no estudo de otimização de condições de cultivo em biorreator *STR* com células de *C. guilliermondii* FTI 2003 imobilizadas em alginato de cálcio, o qual era o maior valor para este parâmetro encontrado até o momento entre os estudos com esta levedura em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (Figura 4).

Por outro lado, com relação à concentração inicial de sacarose, os máximos resultados de $Y_{P/S}$ e Q_P podem ser comparados com os obtidos por Hernández-Pérez et al. (2016) e Tamburini et al. (2010), ambos realizados em escala da frascos agitados. O valor máximo de $Y_{P/S}$ foi 26% maior que o encontrado por Hernández-Pérez et al. (2016) (0,64 gg^{-1}), enquanto que Q_P foi 28% menor ao observado por estes autores (0,75 $gL^{-1}h^{-1}$), em 48h de cultivo de *C. guilliermondii* FTI 20037 no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana (xilose 57 gL^{-1}) suplementado com sacarose (10 gL^{-1}). Por outro lado, os valores máximos de $Y_{P/S}$ e Q_P no presente estudo foram aproximadamente 71% maiores aos encontrados por Tamburini et al. (2010) (0,24 gg^{-1} e 0,16 $gL^{-1}h^{-1}$), em 72h de cultivo com *C. tropicalis* em meio definido (xilose 50 gL^{-1}) suplementado com sacarose (30 gL^{-1}).

Por fim, é importante destacar que um balanço de massa foi estimado para a etapa fermentativa do processo biotecnológico de produção de xilitol baseado nos resultados obtidos no experimento com condições otimizadas de K_La (6,5 h^{-1}) e concentração inicial de

sacarose (0,9 gL^{-1}), e relacionado com os balanços estimados para as etapas prévias de preparo do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana (Tabela 1.3). Assim, foi estimado que por cada 100 g de xilose originalmente contida como xilana na matéria-prima *in natura,* 20,67 g foram consumidas por *C. tropicalis* com obtenção de 16,02 g de xilitol ao final da fermentação. Com base nestes resultados e considerando a composição da mistura de bagaço e palha de cana *in natura* (Tabela 1.1), estima-se que a partir do processamento de 1 kg de matéria-prima seca pela rota biotecnológica descrita no presente projeto seriam obtidos 35,55 g de xilitol ao final da etapa de fermentação.

As estimativas realizadas reforçam a necessidade de otimização das condições de operação nas etapas de processamento da matéria-prima e preparo do meio de fermentação, com o objetivo de maximizar a recuperação da xilose disponível nas matéria-primas. São requeridos também estudos focados na análise técnica, econômica e de sustentabilidade da rota biotecnológica de produção de xilitol como planta independente ou integrada em uma biorrefinaria, com o intuito de posicionar o estado da tecnologia estudada na EEL/USP e identificar os principais desafios a serem avaliados, com vistas ao aumento de escala do processo e integração deste em uma biorrefinaria. Como exemplo, destaca-se que no trabalho de Mountraki et al. (2018) foi determinado que uma planta de produção biotecnológica de xilitol com capacidade de obtenção de 73 g de cristais de xilitol por cada 100 g de xilose apresentaria uma rentabilidade menor que a rota de obtenção química, porém que sua integração em uma biorrefinaria aumentaria sua viabilidade técnico e econômica, inclusive a um nível superior que a do processo químico.

2.3.2 Efeito da sacarose como co-substrato na produção de xilitol por C. tropicalis

Os resultados discutidos previamente demonstraram que o impacto positivo da sacarose como co-substrato na produção de xilitol por *C. tropicalis* depende da concentração inicial deste dissacarídeo e da suplementação de oxigênio avaliado em termos de K_La. A maximização dos parâmetros $Y_{P/S}$ e Q_P foi obtida com a mínima concentração de sacarose avaliada (0,9 g L^{-1}) e K_La 6,5 h^{-1}. Entretanto, com o intuito de explorar a profundidade os impactos positivos e negativos da suplementação de sacarose no desempenho fermentativo da levedura, foram estudadas duas estratégias: 1) Avaliação da concentração inicial de sacarose entre 0 gL^{-1} e 29,1 gL^{-1} com K_La fixo 15 h^{-1}, no qual foram observados os maiores consumos de xilose. Para tanto, foram realizadas 2 experimentos adicionais nesta condição

de K_La, um sem adição de sacarose e outro com suplementação deste dissacarídeo em concentração inicial de 5 g L^{-1}, para serem comparados com o experimento 7 (0,9 gL^{-1}), ponto central (15 gL^{-1}) e 8 (29,1 gL^{-1}) do DCCR (Tabela 2.3); 2) Estudo do efeito da adição parcelada de sacarose a cada 24h em experimentos com K_La ajustado a 6,5, o qual foi encontrado como ótimo para maximizar $Y_{P/S}$ e Q_P, e 15 h^{-1}, no qual foram obtidos os maiores consumos de xilose.

2.3.2.1 Avaliação do efeito da concentração inicial de sacarose em K_La 15 h^{-1}

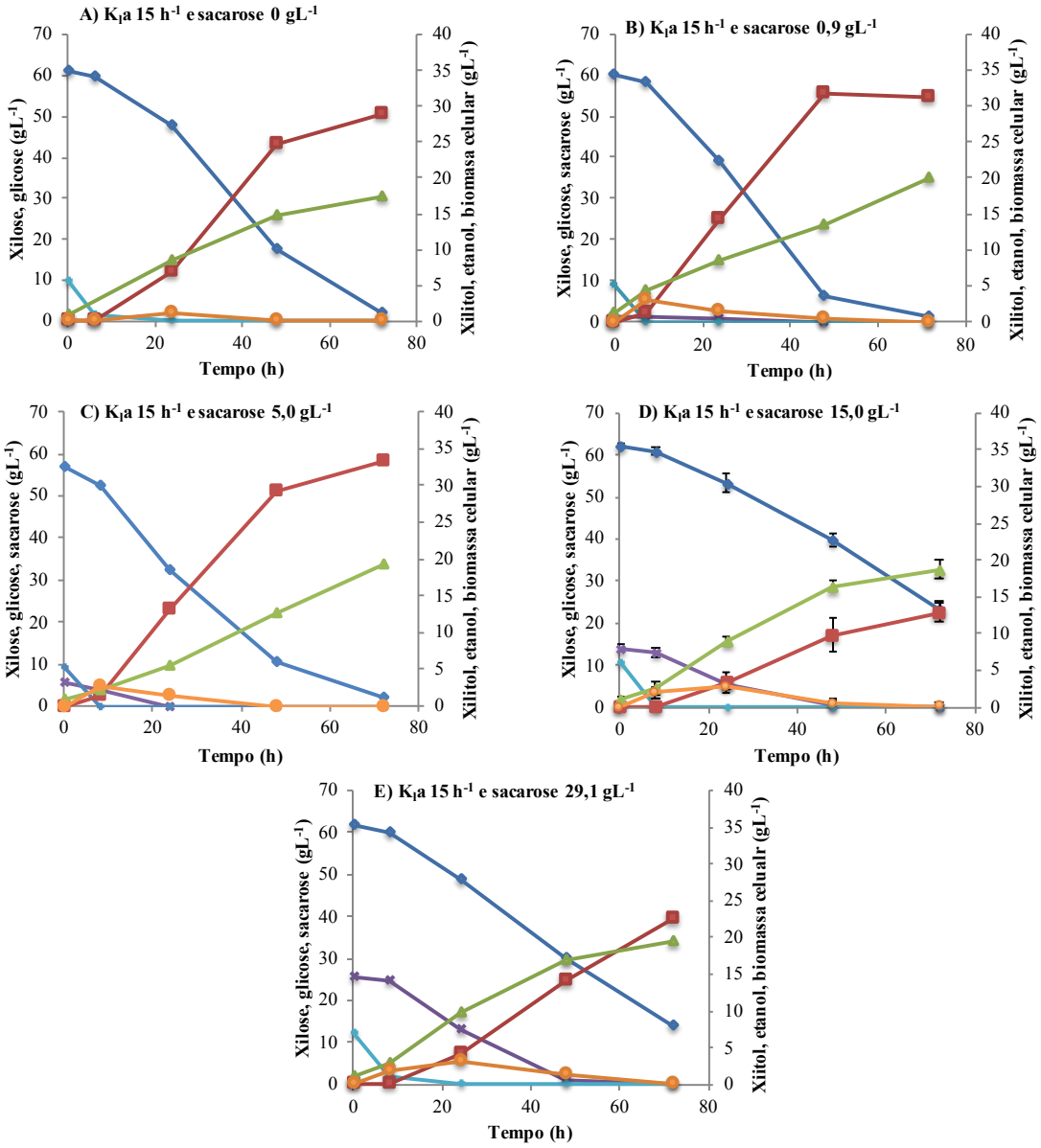
Na Figura 2.6 (A-E) são apresentados os perfis de consumo de xilose, produção de xilitol e etanol, e crescimento celular por *C. tropicalis*, utilizando K_La 15 h^{-1} e diferentes concentrações iniciais de sacarose. Os resultados nestes experimentos quanto aos principais parâmetros fermentativos são apresentados na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 - Parâmetros fermentativos principais obtidos nos experimentos com K_La 15 h^{-1} e diferentes concentrações iniciais de sacarose.

	Variáveis experimentais		**Consumo de xilose**		**Consumo de sacarose**	**Produção de xilitol**			**Crescimento celular**
Exp.	**K_La (h^{-1})**	**Sacarose (gL^{-1})**	**[1]S (%)**	**[2]r_s ($gL^{-1}h^{-1}$)**	**[3]r_{sac} ($gL^{-1}h^{-1}$)**	**[4]P (gL^{-1})**	**[5]$Y_{P/S}$ (gg^{-1})**	**[6]Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)**	**[7]X (gL^{-1})**
1	15	0	96,68	0,92	-	28,77	0,49	0,40	16,48
[a]2	15	0,9	98,23	0,93	0,03	31,19	0,53	0,43	18,65
3	15	5,0	96,33	0,81	0,23	33,34	0,61	0,48	18,28
[b]4	15	15,0	62,43 ± 2,98	0,55 ± 0,02	0,30 ± 0,03	12,91 ± 1,33	0,33 ± 0,02	0,18 ± 0,02	17,69 ± 1,18
[c]5	15	29,1	78,57	0,72	0,40	22,44	0,44	0,31	18,42

[a]2: Experimento 7 do DCCR (Tabela 2.3); **[b]4:** Experimento ponto central (9, 10 e 11) do DCCR (Tabela 2.3); **[c]5:** Experimento 8 do DCCR (Tabela 2.3).
[1]S = Xilose consumida após 72h; **[2]r_s** = Velocidade volumétrica de consumo de xilose; **[3]r_{sac}** = Velocidade volumétrica de consumo de sacarose; **[4]P** = Xilitol produzido após 72h; **[5]$Y_{P/S}$** = Fator de conversão de xilose em xilitol; **[6]Q_P** = Produtividade volumétrica de xilitol; **[7]X** = Biomassa celular formada após 72h.
Fonte: Arquivo próprio.

Figura 2.6 - Consumo de xilose (◆), glicose (+) sacarose (x), crescimento celular (▲), produção de xilitol (■) e etanol (●) por *C. tropicalis* no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana em K_La 15 h^{-1} e diferentes concentrações de sacarose: A) 0 gL^{-1}; B) 0,9 gL^{-1}; C) 5,0 gL^{-1}; D) 15,0 gL^{-1}; E) 29,1 gL^{-1}.



Fonte: Arquivo próprio.

Verifica-se na Figura 2.6 que a sacarose foi esgotada em todos os experimentos realizados com K_La 15 h^{-1}, sendo evidente consumo simultâneo deste dissacarídeo com glicose nas primeiras 8h de fermentação nos experimentos com concentração inicial de 0,9 e 5 gL^{-1}, enquanto que nos experimentos com concentração inicial 15 e 29,1 gL^{-1} o consumo foi sequencial, conforme foi mencionado previamente. A partir destes resultados, pode ser sugerido que o consumo simultâneo ou sequencial de glicose e sacarose é dependente da proporção entre os dois açúcares, sendo sequencial quando a concentração de sacarose é

maior à da glicose. Constata-se na Tabela 2.9 que a r_{Sac} aumentou proporcional com o incremento na concentração inicial de sacarose, conforme indicado previamente.

Com relação à xilose, destaca-se que em todos os experimentos com suplementação de sacarose foi observado consumo simultâneo deste dissacarídeo e xilose após esgotamento da glicose (Figura 2.6). No entanto, observou-se diminuição na r_S associado ao incremento na concentração inicial de sacarose suplementada ao meio até 15 gL^{-1}, uma vez que uma concentração inicial de 29,1 gL^{-1} houve um aumento na r_S (Tabela 2.9). Apesar deste comportamento, ressalta-se que os valores de r_{Sac} obtidos com K_La são superiores aos obtidos com valores menores de K_La, inclusive aqueles considerados dentro da região de otimização deste fator (Tabela 2.8). Por outro lado, é importante salientar também que apenas a suplementação de sacarose no nível mínimo avaliado no presente estudo (0,9 gL^{-1}) resultou em r_S similar à observada sem adição deste dissacarídeo (Tabela 2.9). Estes resultados fornecem maior suporte às hipóteses sugeridas previamente quanto aos impactos negativos da suplementação de sacarose em função da concentração adicionada, segundo a qual, apesar do consumo simultâneo da xilose e a sacarose, as hexoses liberadas pela hidrólise intracelular da sacarose poderiam afetar negativamente a indução e/ou atividade das enzimas XR e/ou XDH.

Verifica-se na Tabela 2.9 que a suplementação de sacarose em concentrações crescentes de 0,9 e 5 gL^{-1} esteve associado com incrementos progressivos na produção de xilitol por *C. tropicalis*, quando comparado com o experimento sem adição de sacarose. Estes resultados demonstram que a suplementação de sacarose ao meio de fermentação pode ter impacto positivo na produção de xilitol em função não só da concentração inicial empregada, mas também do K_La, uma vez que com um K_La de 15 h^{-1} o aumento de 0,9 gL^{-1} para 5 gL^{-1} teve um efeito positivo, enquanto que com K_La próximo ao definido como ótimo (6,5 h^{-1}), este mesmo aumento teve um efeito negativo, conforme discutido previamente. Estes aumentos na produção de xilitol não se corresponderam com incrementos na capacidade de consumo de xilose da levedura, em função dos resultados apresentados previamente. Destaca-se que os valores de $Y_{P/S}$ (0,61 gg^{-1}) e Q_P (0,48 $gL^{-1}h^{-1}$) obtidos com concentração inicial de sacarose de 5 gL^{-1} foram 20% e 17% maiores que os obtidos sem suplementação deste dissacarídeo (0,49 gg^{-1} e 0,40 $gL^{-1}h^{-1}$).

No caso dos experimentos com K_La 15 h^{-1}, o impacto positivo da suplementação de sacarose na produção de xilitol pode ser atribuído principalmente ao favorecimento do acúmulo e excreção deste produto. Previamente, quando comparados os resultados de

experimentos com e sem adição de sacarose, ambos com K_La otimizado, foi sugerido que a suplementação de sacarose poderia ter um efeito na distribuição do fluxo de carbono proveniente da assimilação de xilose, favorecendo o xilitol e reduzindo o crescimento celular. A comparação dos resultados obtidos com K_La 15 h^{-1} podem estar também associados com esta hipótese, uma vez que o favorecimento da produção de xilitol não esteve relacionado com um maior consumo de xilose. A este respeito, constata-se na Tabela 2.9 que o crescimento celular foi similar em todos os experimentos realizados com K_La 15 h^{-1}, independente do consumo de xilose ou da concentração inicial de sacarose. Adicionalmente, os perfis de produção de etanol foram também similares apesar das diferentes condições de suplementação de sacarose avaliadas, conforme pode ser observado na Figura 2.6.

Assim, pode ser sugerido que com K_La 15 h^{-1} o aumento na concentração inicial de sacarose, até 5 gL^{-1}, favoreceu a produção de xilitol a partir da diminuição do fluxo de carbono derivado da xilose requerido para manutenção e crescimento celular, o qual teria sido compensado pelo próprio consumo simultâneo da sacarose. Uma hipótese similar foi estabelecida por Tamburini et al. (2010), em cujo estudo foram avaliados diversos compostos como co-substratos na produção de xilitol por *C. tropicalis* em meio definido, sendo selecionado maltose por apresentar resultados similares aos descritos no presente trabalho. Adicionalmente, pode ser considerada a possibilidade de que o metabolismo da sacarose tenha ocorrido principalmente por via respiratória, em função de não serem observadas alterações na produção de etanol, o qual poderia contribuir na formação de xilitol pela regeneração do cofator NADPH na PPP, a partir do aumento na sua demanda para vias biossínteticas.

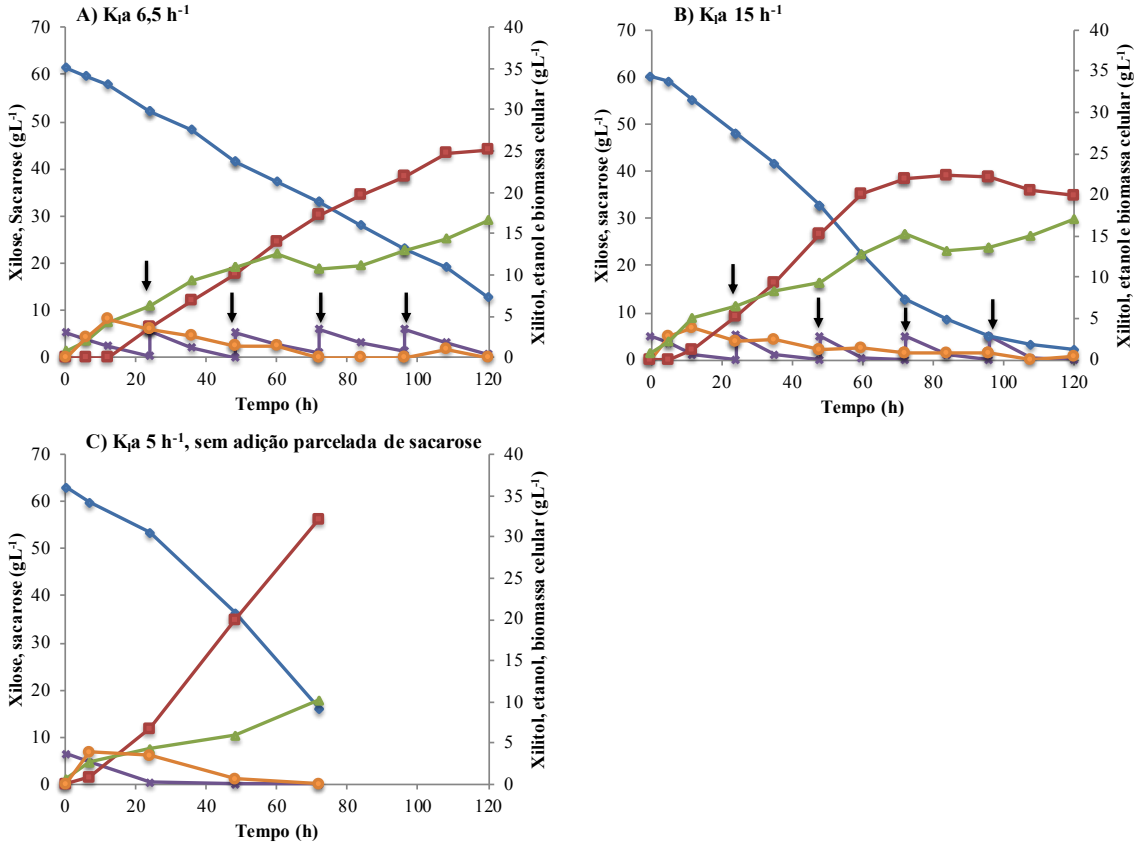
2.3.2.2 Avaliação do efeito da adição parcelada de sacarose

O estudo do efeito da adição parcelada de sacarose teve como objetivo verificar se o impacto positivo deste dissacarídeo na produção de xilitol poderia ser potencializado, mediante promoção do consumo simultâneo de xilose e sacarose ao longo do cultivo, não apenas nas primeiras horas de fermentação, e sem necessidade de adição inicial de concentrações altas (maiores a 5 gL^{-1}). Assim, foi proposta a alimentação de sacarose em 5 parcelas de 5 g L^{-1} a cada 24h desde o início da fermentação até 96h, correspondente a uma concentração total de sacarose adicionada de 25 gL^{-1} e com prolongação do cultivo até 120h. Para tanto, experimentos foram realizados com K_La ajustado em 6,5 h^{-1}, definido como ótimo

para maximizar $Y_{P/S}$ e Q_P, e em 15 h^{-1}, no qual foi observado favorecimento de consumo de xilose nos experimentos do planejamento DCCR. Os resultados obtidos nestes experimentos foram comparados com aqueles obtidos em fermentações com K_La 5 h^{-1} e 15 h^{-1}, concentração inicial de sacarose 5 gL^{-1} e sem adição parcelada desta, correspondente ao experimento 1 do DCCR (Tabela 2.3) e ao 3 dos experimentos com K_La 15 h^{-1} (Tabela 2.9, Figura 2.6C), respectivamente.

Na Figura 2.7 são apresentados os perfis de consumo de xilose e sacarose, produção de xilitol e etanol, e crescimento celular de *C. tropicalis* nas condições estudadas de alimentação parcelada de sacarose. Nesta figura foram inclusos também os perfis para os mesmos parâmetros do experimento 1 do planejamento DCCR para facilitar a comparação.

Figura 2.7 - Consumo de xilose (◆) e sacarose (x), crescimento celular (▲), produção de xilitol (■) e etanol (●) por *C. tropicalis* em cultivo no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana com adição parcelada de sacarose e diferentes valores de K_La: A) 6,5 h^{-1}; B) 15 h^{-1}; C) 5 h^{-1} e sem adição parcelada de sacarose.



Fonte: Arquivo próprio

Nos experimentos com adição parcelada de sacarose foram verificadas diferenças nas velocidades de consumo deste dissacarídeo (r_{Sac}) em função do K_La empregado. No

experimento com K_La 15 h^{-1} foi verificada uma r_{Sac} média de 0,37 $gL^{-1}h^{-1}$ nos 5 períodos de 24h entre cada parcela, a qual foi 23 % maior à observada no experimento com K_La 6,5 h^{-1} (0,21 $gL^{-1}h^{-1}$). O incremento da r_{Sac} em função do aumento do K_La foi também verificado nos experimentos do planejamento do DCCR, porém nesses experimentos a concentração inicial de sacarose teve também influência na r_{Sac}, conforme discutido previamente. É importante destacar que o consumo de sacarose foi simultâneo ao de glicose nas primeiras 12 h de fermentação (dados não apresentados), e ao de xilose ao longo do cultivo.

Similar ao constatado para a sacarose, o consumo de xilose foi também favorecido pelo aumento no valor de K_La, coerente com os resultados observados previamente nos experimentos do planejamento DCCR e de maximização da produção de xilitol. No experimento com K_La 15 h^{-1} e adição parcelada de sacarose foi atingido um consumo de xilose de 78,45% após 72 h de fermentação, correspondente a uma r_S de 0,68 $gL^{-1}h^{-1}$ entre 6h e 72h. Estes valores são aproximadamente 40% maiores que os obtidos no experimento com K_La 6,5 h^{-1} (49,26% e 0,41 $gL^{-1}h^{-1}$, respectivamente). É importante mencionar também que houve diferenças nos períodos de consumo de xilose com r_S constante, uma vez que no experimento com K_La 6,5 h^{-1} a r_S foi mantida ao longo de toda a fermentação (Figura 2.7A), enquanto que no experimento com K_La 15 h^{-1}, o consumo de xilose foi evidente com r_S constante após 6h, período durante o qual a glicose foi consumida, e até 72h, momento a partir do qual a r_S foi reduzida 54% (Figura 2.7B). Apesar desta diferença nos perfis de consumo de xilose, no experimento com K_La 15 h^{-1} esta pentose foi praticamente esgotada nas 120 h de cultivo, enquanto que a redução do valor do K_La para 6,5 h^{-1} resultou também em diminuição do consumo de xilose (79,41%).

As diferenças discutidas de consumo de xilose entre os dois experimentos com alimentação parcelada de sacarose foram correspondentes com as observadas quanto à produção de xilitol. No experimento com K_La 15 h^{-1}, verificou-se um aumento progressivo na concentração de xilitol entre 6 h e 60 h de fermentação, enquanto que no experimento com K_La 6,5 h^{-1} a produção de xilitol se estendeu entre 12 e 108h (Figura 2.7A e B). Nos períodos indicados, o $Y_{P/S}$ no experimento com K_La 15 h^{-1} (0,55 gg^{-1}) foi 14% menor que no experimento com K_La 6,5 h^{-1} (0,64 gg^{-1}), contrário ao observado para a Q_P, a qual foi 32% maior com K_La 15 h^{-1} (0,38 $gL^{-1}h^{-1}$) que a obtida com K_La 6,5 h^{-1} (0,26 $gL^{-1}h^{-1}$). Estes resultados corroboram que o aumento de K_La favorece o consumo de xilose e, consequentemente, produtividade volumétrica de xilitol, porém reduz a conversão de xilose em xilitol, conforme já tinha sido discutido previamente.

Quando comparados os resultados dos experimentos com alimentação parcelada de sacarose com aqueles obtidos nas fermentações sem adição parcelada, com concentração inicial de 5 gL^{-1} deste dissacarídeo e K_La 5 h^{-1} (experimento 1 do planejamento DCCR, Tabela 2.3) ou K_La 15 h^{-1} (experimento 3, Tabela 2.9), verifica-se que a estratégia proposta não teve um efeito positivo no comportamento fermentativo da levedura. No caso do K_La ótimo (6,5 h^{-1}), o experimento com adição parcelada de sacarose teve resultados de consumo de xilose, $Y_{P/S}$ e Q_P 38%, 12% e 44% menores, respetivamente, que àqueles obtidos sem adição parcelada de sacarose com K_La 5 h^{-1}. Já no caso dos experimentos com K_La 15 h^{-1}, o experimento com adição parcelada de sacarose teve resultados 4%, 29% e 51% menores nos parâmetros anteriormente indicados, respectivamente, em comparação com o experimento sem adição parcelada da sacarose.

O impacto negativo da adição parcelada de sacarose foi predominante no consumo de xilose quando empregado o K_La de 6,5 h^{-1}, enquanto que com K_La 15 h^{-1} o efeito foi principalmente na conversão de xilose em xilitol. No entanto, em ambos casos, os efeitos negativos se refletiram em redução da Q_P quando comparados com os experimentos com K_La similar e sem adição parcelada de sacarose. Com base nestes fatos, é possível sugerir que, quando empregadas condições de fermentação que favorecem o acúmulo de xilitol (K_La próximo a 6,5 h^{-1}), o efeito positivo da sacarose como co-substrato está relacionado principalmente com o consumo simultâneo deste dissacarídeo e da xilose nas primeiras horas de fermentação, porém, a alimentação durante o cultivo não prolonga seu efeito positivo. Neste sentido, é importante ressaltar que a r_S nas primeiras 24h de fermentação foi similar nos experimentos com ou sem adição parcelada de sacarose (0,38 $gL^{-1}h^{-1}$). Já no período entre 24h e até 72h, a r_S foi 46% maior no experimento sem adição parcelada de sacarose (0,78 $gL^{-1}h^{-1}$) do que naquele com emprego desta estratégia (0,42 $gL^{-1}h^{-1}$).

Diferenças nos perfis de crescimento celular e produção de etanol podem ser elencadas também entre os experimentos com e sem adição parcelada de sacarose em função do K_La empregado, as quais podem contribuir para explicar os efeitos desta estratégia na produção de xilitol. No caso dos experimentos com K_La próximo a 6,5 h^{-1}, a velocidade volumétrica de crescimento celular (r_X) no experimento com adição parcelada de sacarose (0,20 $gL^{-1}h^{-1}$) foi 45% maior que àquela atingida sem alimentação da sacarose (0,11 $gL^{-1}h^{-1}$). Por outro lado, nos experimentos com K_La 15 h^{-1}, o experimento sem adição parcelada de sacarose apresentou uma r_X (0,24 $gL^{-1}h^{-1}$) 25% maior que àquela atingida com alimentação da sacarose (0,18 $gL^{-1}h^{-1}$). Já no caso da produção de etanol, observou-se em ambos casos

incrementos pontuais na concentração deste subproduto após a adição de sacarose, porém no experimentos com K_La 15 h^{-1} (Figura 2.7B) as concentrações atingidas foram levemente superiores que aquelas com K_La 6,5 h^{-1} (Figura 2.7A). Esta diferença pode estar relacionada com o fato que com K_La 15 h^{-1} a sacarose foi consumida mais rapidamente, conforme discutido previamente.

Assim, com base nos resultados de crescimento celular e produção de etanol, pode ser considerdo que no experimento com K_La 6,5 h^{-1} o consumo mais lento da sacarose adicionada parceladamente favoreceu o crescimento celular, apesar de serem usadas condições de disponibilidade de oxigênio que promoveriam o metabolismo fermentativo. Por outro lado, no experimento com K_La 15 h^{-1}, o consumo mais rápido da sacarose alimentada promoveu a formação de etanol, apesar de serem empregadas condições que favoreceriam o metabolismo respiratório. Quando associados estes efeitos com o impacto negativo da adição parcelada sobre a conversão de xilose em xilitol, pode ser sugerido que o impacto negativo da promoção da formação de etanol no experimento com K_La 15 h^{-1} seria maior que o do favorecimento do crescimento celular no experimento com K_La 6,5 h^{-1}.

2.3.3 Avaliação preliminar do melaço de cana como suplemento nutricional do meio de fermentação

Um dos objetivos do presente projeto era a avaliação da suplementação do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana com o melaço de cana em substituição dos nutrientes convencionalmente empregados. O intuito desta estratégia era aproveitar não só o alto teor de sacarose do melaço, mas também o conteúdo de compostos nitrogenados, vitaminas e minerais deste subproduto. Esta estratégia poderia resultar em uma plataforma para aumentar a viabilidade técnica e econômica da rota biotecnológica da produção de xilitol, devido à potencial redução de custos na formulação do meio de fermentação, assim como por contribuir na possível integração deste bioprocesso em uma biorrefinaria de cana.

Para tanto, esperava-se que os resultados da otimização da concentração inicial de sacarose e K_La permitissem estabelecer uma linha base para avaliar a suplementação do melaço ao hidrolisado em função da concentração de sacarose definida. Entretanto, conforme discutido previamente, a concentração inicial de sacarose ótima para maximizar o $Y_{P/S}$ e a Q_P nas condições de presente estudo foi 0,9 gL^{-1}. Foi considerado, portanto, que

seria requerida uma altíssima diluição do melaço (concentração média de sacarose de 506,48 gL^{-1}, Tabela 1.4) para ajustar a concentração inicial de sacarose no meio de fermentação para a definida como ótima. Esta alta diluição do melaço implicaria também a redução da concentração de outros compostos aportados pelo melaço ao meio de fermentação, o qual poderia afetar a representatividade da avaliação deste subproduto.

Apesar disso, experimentos exploratórios a respeito do efeito da suplementação do hidrolisado hemicelulósico com melaço de cana foram feitos em paralelo com os de otimização da concentração inicial de sacarose e K_La, em projeto de Iniciação Científica da aluna Fernanda Mosimann Simões. Para estes experimentos foi definida como suplementação nutricional de referência aquela empregada convencionalmente nas pesquisas com hidrolisados hemicelulósicos para produção de xilitol na EEL/USP, a exemplo dos trabalhos de Hernández-Pérez et al. (2016) e Arruda et al. (2017), correspondente a utilização de sulfato de amônio, extrato de farelo de arroz e cloreto de cálcio.

Esses experimentos foram considerados como preliminares uma vez que foram realizados em escala de frascos agitados, tempo de fermentação de 48 h e não foi avaliado o consumo de sacarose. Foi empregado um planejamento fatorial completo 2^2 com triplicata no ponto central para o estudo da suplementação nutricional de referência e o melaço de cana, o qual foi avaliado a partir do ajuste da concentração inicial de sacarose, conforme Tabela 2.2. Os resultados quanto aos principais parâmetros fermentativos da execução do planejamento indicado são apresentados na Tabela 2.10.

Tabela 2.10 - Consumo de xilose, produção de xilitol e crescimento celular de *C. tropicalis* sob diferentes condições de adição de melaço de cana e suplementação nutricional

Exp.	Fatores experimentais		Consumo de xilose (%)	Produção de xilitol			Crescimento celular (gL^{-1})
	Melaço de cana (Sacarose gL^{-1})	Suplementação nutricional de referência		[1]P (gL^{-1})	[2]$Y_{P/S}$ (gg^{-1})	[3]Q_P ($gL^{-1}h^{-1}$)	
1	0 (-1)	Ausente (-1)	58,03	16,80	0,58	0,35	3,04
2	20 (+1)	Ausente (-1)	79,46	29,76	0,74	0,62	3,73
3	0 (-1)	Completa (+1)	58,60	18,72	0,64	0,39	2,14
4	20 (+1)	Completa (+1)	76,03	24,96	0,65	0,52	3,34
5	10 (0)	Parcial (0)	75,80	23,04	0,61	0.51	2.53
6	10 (0)	Parcial (0)	78,05	24,48	0,63	0.52	3.41
7	10 (0)	Parcial (0)	75,38	24,96	0,62	0.48	2.70

[1]**P** = Xilitol produzido após 48h; [2]$Y_{P/S}$ = Fator de conversão de xilose em xilitol; [3]Q_P = Produtividade volumétrica de xilitol.

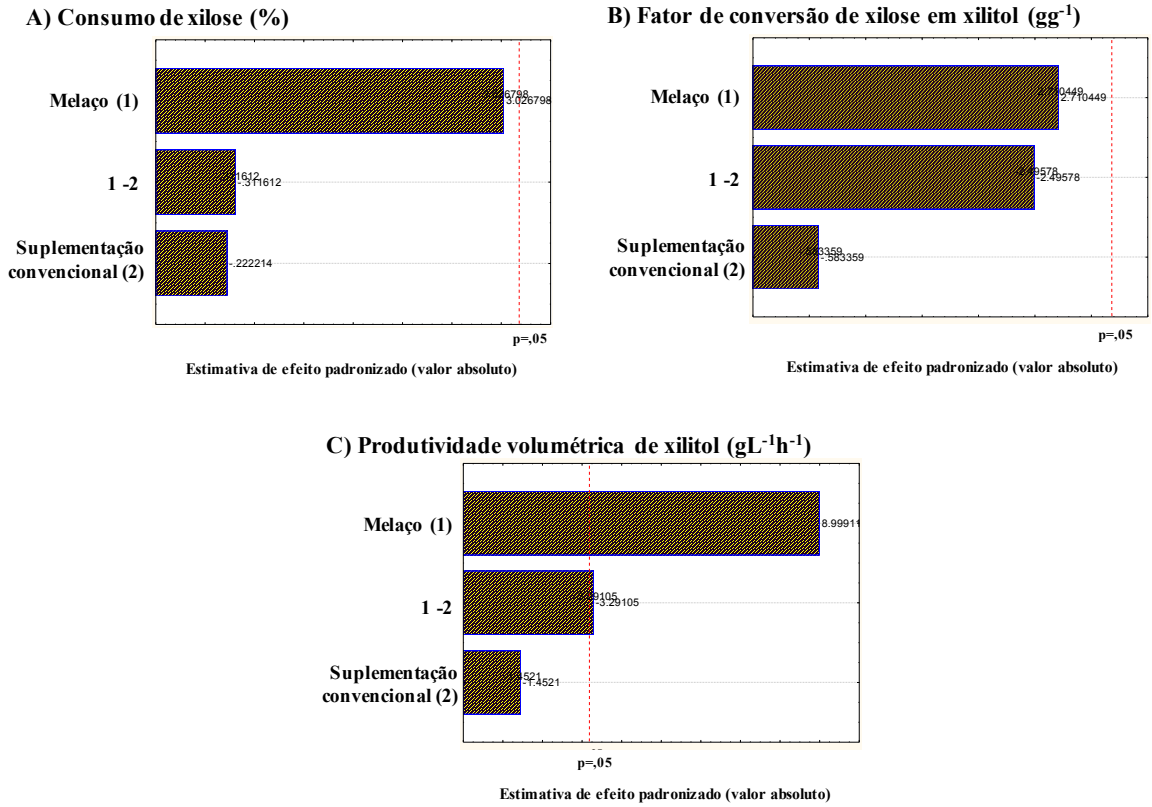
Fonte: Arquivo próprio.

Conforme pode ser observado na Tabela 2.10, o maior de consumo de consumo de xilose (79,46 %) foi obtido quando o hidrolisado hemicelulósico foi suplementado apenas com melaço de cana ajustado a uma concentração de 20 g L^{-1} de sacarose (experimento 2), o qual representou um aumento de aproximadamente 20% com relação ao experimento com a suplementação de referência completa (experimento 3). O consumo de xilose no experimento 2 foi similar ao atingido quando o hidrolisado foi suplementado com o melaço de cana (sacarose 20 g L^{-1}) e os nutrientes convencionais (experimento 4), bem como nos experimentos nos quais se empregou melaço de cana ajustado para uma concentração de sacarose de 10 g L^{-1} e apenas a adição de sulfato de amônio (experimentos 5, 6 e 7).

Verifica-se na Tabela 2.10 que os valores mais elevados de produtividade volumétrica de xilitol (Q_P, 0,62 g L^{-1} h^{-1}), fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$ 0,74 gg^{-1}) e biomassa celular formada (3,73 g L^{-1}) foram atingidos quando o hidrolisado hemicelulósico foi somente suplementado com melaço de cana (experimento 2), o qual é coerente com os resultados obtidos quanto ao consumo de xilose. Destaca-se que estes valores foram 64 %, 14% e 43% maiores, respectivamente, que os obtidos no experimento com suplementação nutricional de referência completa e sem melaço de cana (experimento 3, 0,39 g L^{-1} h^{-1}, 0,64 gg^{-1} e 2,14 g L^{-1}, respectivamente). É importante ressaltar também que a adição conjunta dos nutrientes de referência com o melaço de cana ao hidrolisado resultou em aumentos de 33% e 56% na Q_P (0,52 $gL^{-1}h^{-1}$, experimento 4) e biomassa celular formada (3,34 g L^{-1}), respectivamente, comparado com o experimento com a suplementação de referência e sem adição de melaço (experimento 3). Este comportamento não foi observado para o $Y_{P/S}$, para o qual foram obtidos valores similares nos experimentos 3, 4 e inclusivo naqueles do ponto central (experimentos 5, 6 e 7), o qual é similar ao constatado quanto ao consumo de xilose e discutido previamente.

A Figura 2.8 apresenta os gráficos de Pareto para análise da significância dos efeitos das variáveis melaço de cana e suplementação nutricional de referência nos parâmetros fermentativos avaliados. Verifica-se na Figura 2.8 A e C que nenhuma das variáveis estudadas teve efeito significativo ($p < 0,05$) sobre o consumo de xilose e o fator de conversão de xilose em xilitol. Por outro lado, quanto à produtividade volumétrica de xilitol, o melaço de cana apresentou um efeito significativo positivo linear, enquanto que a interação entre este e a suplementação nutricional de referência teve um efeito significativo negativo linear.

Figura 2.8 - Gráfico de Pareto para a significância dos efeitos das variáveis melaço de cana e suplementação nutricional convencional no: A) consumo de xilose; B) fator de conversão de xilose em xilitol; C) produtividade volumétrica de xilitol.



Fonte: Arquivo próprio.

Os resultados obtidos sugerem que a suplementação do hidrolisado hemicelulósico com o melaço de cana em substituição dos nutrientes convencionalmente empregados melhorou o consumo de xilose e a produção de xilitol por *C. tropicalis*. Esta melhoria foi observada quando empregada a maior concentração de melaço avaliada, correspondente a um teor de sacarose de aproximadamente 20 gL^{-1}. Apesar de não ter sido avaliado o consumo de sacarose nestes experimentos específicos, os resultados discutidos previamente nos itens 2.3.1 e 2.3.2 demonstraram que *C. tropicalis* consumiu simultaneamente xilose e sacarose em meio e condições de fermentação similares às aqui empregadas. Quando há consumo simultâneo de sacarose e xilose, este dissacarídeo pode atuar como co-substrato ao ser usado como fonte de carbono e energia para manutenção celular, regeneração de cofatores e crescimento celular. Adicionalmente, a complexa composição de melaço de cana, a qual envolve composto nitrogenados, vitaminas e minerais, favoreceu também o crescimento celular mesmo na ausência das fontes nutricionais consideradas como referência (sulfato de amônio, extrato de farelo de arroz e cloreto de cálcio). Apesar que favorecimento do crescimento celular pode ter um efeito positivo na produtividade volumétrica de xilitol, este

fato pode ser indicativo de uma redução do desequilíbrio redox que causa o acúmulo do xilitol, o qual pode ser evidenciado na diminuição do fator de conversão de xilose em xilitol, conforme evidenciado nos experimentos com emprego conjunto da suplementação nutricional convencional e o melaço de cana.

Os resultados obtidos no presente trabalho são similares com os encontrados em pesquisa recente com a mesma matéria-prima (mistura de bagaço e palha de cana), mesma levedura (previamente classificada como *C. guilliermondii* FTI 20037) e utilização de xarope de cana, o qual é um coproduto do setor sucroalcooleiro com composição semelhante à do melaço (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2019b). Neste trabalho foram obtidos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,60 ± 0,01 gg^{-1} e 0,55 ± 0,02 $gL^{-1}h^{-1}$ quando o xarope de cana (sacarose 11,16 gL^{-1}) foi adicionado ao meio suplementado convencionalmente com sulfato de amônio, solução de extrato de farelo de arroz, e cloreto de cálcio. No entanto, demonstrou-se que os nutrientes convencionais tinham efeito não significativo na produção de xilitol quando o hidrolisado hemicelulósico era suplementado com o xarope de cana, promovendo a substituição destes nutrientes, o que contribui para a redução dos custos deste bioprocesso e para sua integração em uma biorrefinaria de cana (HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2019b).

2.4 Conclusão

A atuação de sacarose como co-substrato no processo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. tropicalis* foi estudada em escala de biorreator *STR* de bancada, a partir da avaliação conjunta da concentração suplementada deste dissacarídeo ao hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana e do K_La, o qual foi utilizado como parâmetro da disponibilidade de oxigênio no meio de fermentação. A análise de significância dos efeitos destes fatores demostrou que o K_La tinha um efeito significativo linear negativo sobre as variáveis $Y_{P/S}$ e Q_P, coerente com o relatado na literatura referente à importância da limitação da disponibilidade de oxigênio para favorecer o acúmulo do xilitol pela redução do metabolismo respiratório da levedura.

Já a concentração inicial de sacarose mostrou ter efeitos significativos quadrático positivo no consumo de xilose, $Y_{P/S}$ e Q_P, e ainda interação com o K_La. Estes efeitos indicaram que o aumento da concentração inicial de sacarose até 15 gL^{-1} teve impacto negativo sobre estas variáveis, principalmente em condições de baixo K_La (menores a 15 h^{-1}). Enquanto que o incremento progressivo a partir de 15 gL^{-1} na concentração inicial de

sacarose teve um impacto positivo, particularmente quando empregados valores altos de K_La (maiores ou iguais a 15 h^{-1}). A partir de modelos quadráticos significativos compostos para $Y_{P/S}$ e Q_P foram simuladas condições para maximização destas variáveis. Os máximos valores experimentais de $Y_{P/S}$ (0,86 gg^{-1}, equivalente a uma eficiência de bioconversão de 93,97%) e Q_P (0,54 $gL^{-1}h^{-1}$) foram obtidos com concentração inicial de sacarose de 0,9 gL^{-1} e K_La 6,5 h^{-1}. Estes valores foram 30% e 39% maiores, respectivamente, que os atingidos com mesmo K_La e sem suplementação de sacarose (0,60 gg^{-1} e 0,33 $gL^{-1}h^{-1}$, respectivamente). A partir de balanços de massa das etapas estudadas do processo de produção biotecnológica de xilitol, estimou-se que o processamento de 1 kg de mistura de bagaço e palha de cana nas condições empregadas resultaria na obtenção de 33,55 g de xilitol na etapa de fermentação.

Considerou-se que, em função da concentração inicial de sacarose ótima (0,9 gL^{-1}), seria requerida uma alta diluição do melaço de cana para ser estudado nas condições otimizadas no biorreator, o que afetaria a representatividade da utilização deste subproduto. Entretanto, verificou-se em estudo preliminar que a suplementação do hidrolisado hemicelulósico apenas com melaço de cana (concentração de sacarose ajustada a 20 gL^{-1}) em substituição dos nutrientes convencionais com o melaço de cana resultou em melhoria do consumo de xilose, $Y_{P/S}$ e Q_P.

Os resultados do presente estudo contribuem com embasamento científico para uma potencial integração da tecnologia de produção biotecnológica de xilitol em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar, a partir do aproveitamento de três subprodutos desta agroindústria (bagaço, palha e melaço) na formulação do meio de fermentação. Esta integração favoreceria a viabilidade técnica e econômica deste bioprocesso, assim como poderia contribuir na rentabilidade deste setor a partir da diversificação de seu portfolio de produtos com a inclusão de um de alto valor agregado, como é o xilitol.

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Candida tropicalis* PARA ENGENHARIA DA VIA METABÓLICA DE PRODUÇÃO DE XILITOL

3.1 Introdução

A etapa fermentativa da rota biotecnológica de produção de xilitol vem sendo amplamente estudada pelo grupo GMBIO da EEL/USP, tendo como modelo a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037. Nos estudos realizados já foram contempladas alternativas de composição do meio de fermentação, configurações do processo e condições de operação, conforme apresentado previamente nos itens 2.4.3 e 2.5 da seção de revisão de literatura. Como resultado das estratégias implementadas, diversos valores de fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica de xilitol (Q_P) têm sido registrados, conforme apresentado previamente na Figura 4, na qual é possível evidenciar que os maiores valores de cada parâmetro foram obtidos com implementação de estratégias diferentes. Assim, o favorecimento concomitante destes dois parametros continua sendo um importante desafio do processo de produção biotecnológica de xilitol.

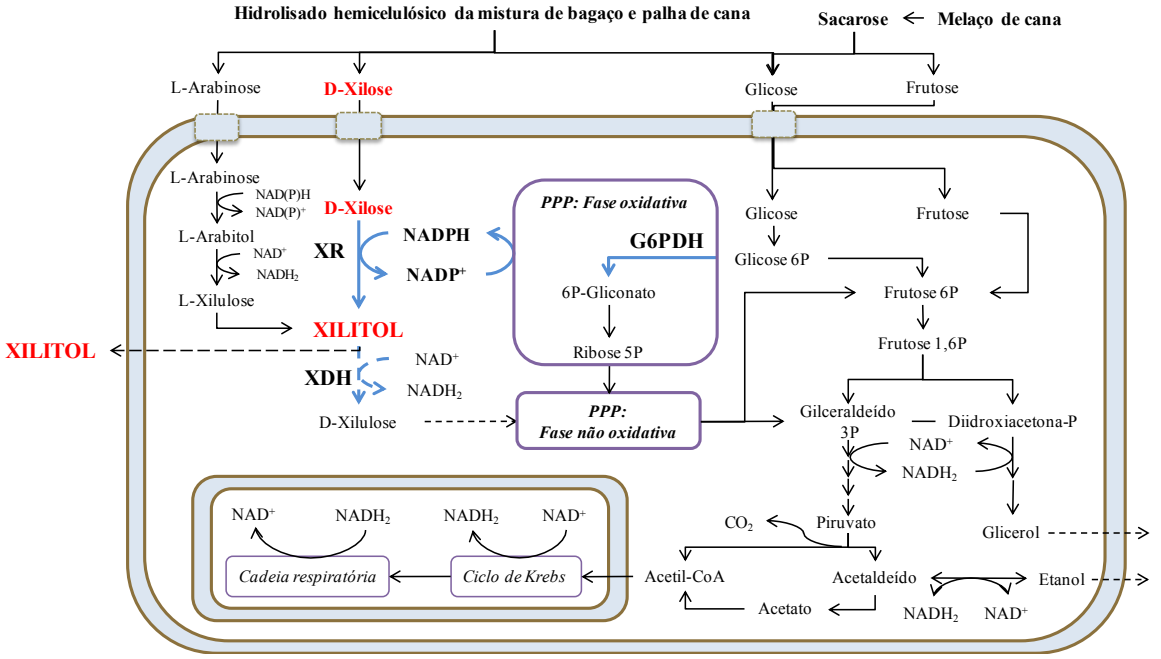
Considerando a vasta pesquisa quanto à obtenção de xilitol pela rota biotecnológica, considera-se pertinente ainda a investigação quanto à engenharia da via metabólica com vista ao melhoramento do desempenho celular. A transformação genética de *C. guilliermondii* FTI 20037 ainda não tinha sido explorada no GMBIO da EEL/USP, apesar de alguns estudos já terem sido feitos quanto à caracterização molecular das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) (LIMA, 2006; LIMA et al., 2006). É importante mencionar que em uma pesquisa recente, realizada paralelamente com o presente projeto, foi constatado que a linhagem até então classificada como *C. guilliermondii* FTI 20037 corrsponde verdadeiramente à especia *C. tropicalis* (QUEIROZ, 2019).

Consirando que as enzimas XR e XDH participam nas etapas chave da bioconversão de xilose em xilitol (GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007), esta seriam os principais alvos de manipulação genética para melhoria deste bioprocesso em leveduras. Primeiramente, a expressão da enzima XR pode ser aumentada com a finalidade de favorecer a redução da xilose em xilitol, com consequente melhoria da Q_P (ZHANG, C. et al., 2015; JEON et al., 2012). Esta reação pode ser também favorecida indiretamente pelo aumento na disponibilidade do cofator NAPDH, do qual a XR de *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* é

dependente, a partir do aumento na expressão das enzimas responsáveis pela regeneração deste cofator, principalmente a glicose 6P desidrogeanse (GAPDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) (KWON et al., 2006; AHMAD et al., 2012). Por outro lado, a atividade da XDH pode ser reduzida parcial ou totalmente mediante modificações genéticas na sua expressão e/ou funcionalidade, com o objetivo de diminuir a oxidação de xilitol a xilulose e assim favorecer o acúmulo deste poliol (KIM et al., 2001; KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006; KO et al., 2011; PAL et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Esta estratégia permitiria a melhoria do $Y_{P/S}$ sem a necessidade do ajuste fino da disponibilidade de oxigênio, porém, a xilose não poderia ser utilizada pelo micro-organismo como única fonte de carbono e energia, sendo necessária a suplementação de um co-substrato ao meio de fermentação.

Assim, no presente projeto foi proposta a transformação sequencial de *C. tropicalis* mediante: 1) super expressão da XR com emprego do promotor constitutivo forte pGAPDH; 2) super expressão da enzima G6PDH sob controle do pGAPDH; 3) deleção da XDH. As modificações genéticas podem resultar em alterações nos fluxos metabólicos das vias envolvidas na produção de xilitol por *C. tropicalis*, conforme destacado na Figura 3.1, na qual também se ressalta a utilização da sacarose como co-substrato.

Figura 3.1 - Modificações genéticas propostas* em *C. tropicalis* para melhoria da bioconversão de xilose em xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana suplementado com sacarose.



*Super expressão das enzimas XR e G6PDH marcadas com seta azul completa. Atenuação da enzima XDH e marcada com seta azul tracejada.
Fonte: Baseado em Flores et al. (2000) e Granström, Izumori e Leisola (2007).

Prévio às modificações genéticas para a engenharia da via metabólica de *C. tropicalis,* requere-se o desenvolvimento de uma marca de seleção para ser usada nas atividades subsequentes de transformação da levedura. No presente projeto foi selecionado como alvo o gene *ura3*, que codifica a proteína orotidina 5'-fosfato descarboxilase, envolvida na via de síntese das pirimidinas em *C. tropicalis*. A deleção deste gene gera auxotrofia para uridina e resistência aumentada ao ácido 5-fluroorótico (5-FOA), características que podem ser utilizadass como marcas de seleção nas etapas de transformação, assim como permitem a sua reciclagem e reutilização sequencial (WILSON et al., 2000; KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006; JEON et al., 2012).

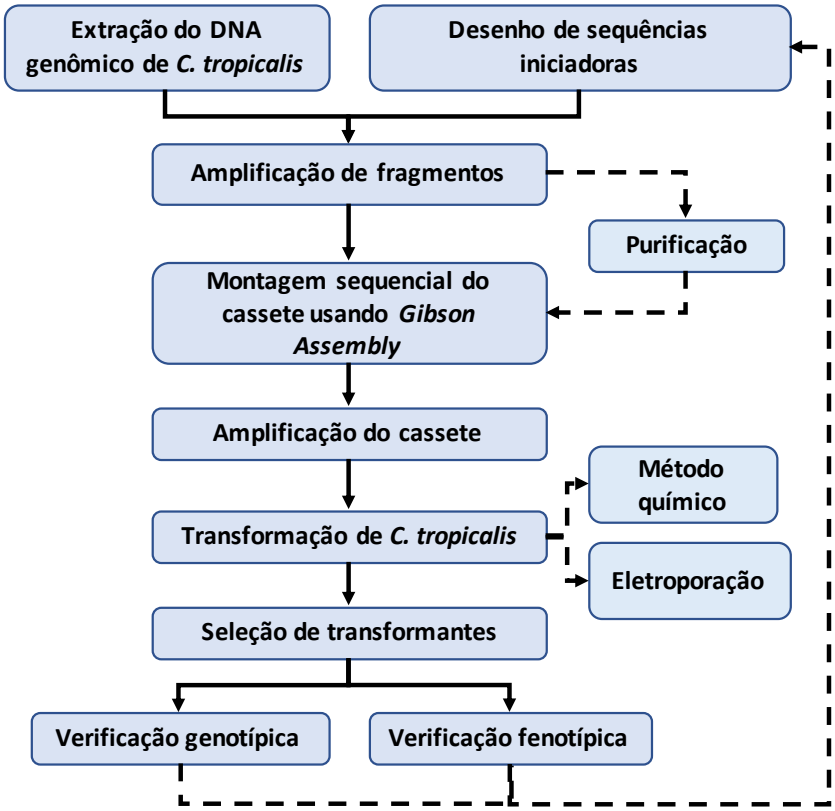
No presente capítulo são descritas e discutidas estratégias implementadas para o desenvolvimento de uma marca de seleção em *C. tropicalis* baseada na auxotrofia a uridina, e posterior emprego da cepa resultante para transformações sequenciais para engenharia da via metabólica envolvida na produção de xilitol por esta levedura.

3.2 Material e métodos

3.2.1. Construção de uma cepa de C. tropicalis com auxotrofia para uridina, susceptível de transformação

Para a realização das transformações genéticas propostas no presente projeto foi necessário o desenvolvimento de cepas de *C. tropicalis* deficientes na produção de uridina. Para tanto, foi necessária a deleção do gene *ura3* mediante recombinação homóloga com cassetes de deleção constituídos, pelo menos, pelas regiões *upstream* e *downstream* do gene. Nesta etapa, vários cassetes foram empregados com o intuito de deletar o gene *ura3*, alguns dos quais incluíram genes de interesse para substituição gênica no *locus* deste gene. Na Figura 3.2 são apresentadas as atividades seguidas na presente etapa do presente trabalho para construção da cepa de *C. tropicalis* auxotrófica para uridina, e os métodos correspondentes a cada uma serão descritos a seguir. Destaca-se que previamente à realização destas atividades, foi necessário a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o 5-FOA, o qual atua como um anti-metabólito para as cepas que contém o gene *ura3* funcional, nas quais pode ser tóxico.

Figura 3.2 - Esquema das atividades para construção de uma cepa de *C. tropicalis* com auxotrofia para uridina



Fonte: Arquivo próprio.

3.2.1.1 Meios de cultura e reagentes

a. Ágar Extrato de Malte

O meio ágar Extrato de Malte (Difco™), composto (gL^{-1}) de maltose (12,75), dextrina (2,75), glicerol (2,35), peptona (0,78) e ágar (15), foi preparado mediante suspensão de 33,6 g do meio em 1 L de água, conforme instruções do fabricante, seguido por esterilização a 121 ºC, 1 atm e 15 min.

b. Meio YPD

O meio ágar YPD, composto (gL^{-1}) de glicose (20), extrato de levedura (10), peptona bacteriológica (20) e ágar bacteriológico (20), foi preparado por suspensão de quantidades correspondentes dos componentes em volume de água destilado requerido. O caldo YPD foi preparado da mesma forma, porém sem adição de ágar bacteriológico. Os meios foram esterilizados a 121 ºC, 1 atm e 15 min.

c. Meio YNB (*Yeast Nitrogen Base with aminoacids*)

O meio ágar YNB, composto por glicose (20 gL^{-1}), solução estoque YNB[3] (0,67% m/v) e ágar bacteriológico (20 gL^{-1}), foi preparado mediante esterilização separada de uma solução de glicose e ágar bacteriológico a 121 ºC, 1 atm e 15 min, e da solução estoque do YNB (6,7% m/v), por filtração em membrana de 0,22 µm. As soluções foram misturadas quando a solução de glicose e ágar atingiu uma temperatura aproximada de 45 ºC após esterilização. O caldo YNB foi preparado da mesma forma, porém sem adição de ágar bacteriológico.

d. Meio YNBs (*Yeast Nitrogen Base without aminoacids*)

O ágar e caldo YNBs foram preparados da mesma forma que acima indicado para o meio YNB, com a diferença que foi empregado uma solução estoque de YNB cuja composição não inclui aminoácidos.

e. Meio Mínimo (MM)

O meio mínimo, composto (gL^{-1}) de glicose (20); sulfato de amônio (2), cloreto de cálcio (0,1) e ágar bacteriológico (20), foi esterilizada sem a presença de glicose a 121 ºC, 1 atm e 15 min. A solução estoque de glicose (200 gL^{-1}) foi preparada, autoclavada separadamente a 110 ºC, 0,5 atm e 15 min, e adicionada assepticamente ao meio estéril em volume adequado para atingir a concentração desejada.

f. Ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA)

Para a utilização do 5-FOA nos meios de cultura, foi preparada uma solução de 100 gL^{-1} deste em Dimetil-sulfoxido (DMSO), a qual foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm e adicionada em volume adequado para obtenção das concentrações desejadas nos meios de cultura. A adição do 5-FOA aos meios ocorreu após estes foram esterilizados e resfriados até aproximadamente 55 ºC.

---

[3] **Composição YNB (gL^{-1}):** sulfato de amônio (5), fosfato monobásico de potássio (1), sulfato de magnésio (0,5), cloreto de sódio (0,1), cloreto de cálcio (0,1); Aminoácidos (mg L^{-1}): L-histidina (10), DL-metionina (20), DL-triptofano (20); Vitaminas (µg L^{-1}): biotina (2), pantotenato de cálcio (400), ácido fólico (2), inositol (2000), ácido nicotínico (400), ácido *p*-aminobenzoico (200), piridoxina (400), riboflavina (200) e tiamina (400); Elementos traços (µgL^{-1}): ácido bórico (500), sulfato cúprico (40), iodeto de potássio (100), cloreto férrico (200), sulfato de manganês (400), molibdato de sódio (200), sulfato de zinco (400). O YNBs apresenta a mesma composição, no entanto, sem a adição de aminoácidos.

3.2.1.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para o 5-FOA

Para determinação da CIM para o 5-FOA para *C. tropicalis*, cultivo da levedura em caldo YPD a 30 ºC, 200 rpm, por 24 h foi realizado a partir de células pré-cultivadas em meio ágar Extrato de Malte por 48 h a 30 ºC. Após o crescimento em meio líquido, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3}) para plaqueamento em ágar YPD contendo concentrações crescentes de 5-FOA (gL^{-1}): 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0, e em meio ausente deste (controle). As placas foram incubados durante 144 h a 30 ºC, sendo realizado contagem em placa nos tempos 24, 48 e 144 h. O mesmo protocolo foi empregado para determinação da CIM do 5-FOA no ágar YNB e ágar YNBs.

3.2.1.3 Desenho das sequências iniciadoras

As sequências iniciadoras empregadas no presente estudo foram desenhadas utilizando como base o genoma da linhagem de *C. tropicalis* MYA-3404, o qual foi anotado completamente por Butler et al. (2009) e está disponível no portal do *NCBI* (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2019). Na Tabela 3.1 são apresentadas as sequências iniciadoras que foram utilizadas no presente trabalho, tanto na construção de cassetes de deleção do gene *ura3*, bem como na verificação genotípica das transformações realizadas. Foram empregadas sequências de 20-40 nucleotídeos, as quais foram analisadas pela ferramenta *OligoAnalyzer* do site do *Integrated DNA Technologies – IDT* (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, 2019), quanto a temperatura de *melting*, conteúdo de guanina e citosina (%GC) e estruturas secundarias (*hairpin*, homo- e heterodimeros). Foi também utilizada a ferramenta *Primer-Blast* do NCBI para verificar o anelamento das sequências iniciadoras selecionadas nas regiões de interesse. As sequências iniciadoras foram sintetizadas pela empresa Exxtend Soluções em Oligos Ltd (Paulínia, SP, Brasil). É importante destacar que caudas foram adicionadas na extremidade 5' de algumas das sequências iniciadoras para permitir a junção de fragmentos adjacentes pela técnica *Gibson Assembly*, conforme indicado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Sequências iniciadoras utilizadas no presente trabalho.

Região		Sequência (5' – 3')
Upstream URA3	*F*	TATCAAAACATTCTATTTCATTAACATCTGAATTGAATTT
	R	**AAAAAAAAAA**TGTGTATATGTGTGTGTGTGTTTATG
Downstream URA3	*F*	**TTTTTTTTTT**AAAAAACCGGTCAACTTGAATAGTTGATTA
	R	AAATTCAGCCACTGGGATTATATTATATACTACTTATTTAACA
Gene *ura3*[a]	*F*	**TTTTTTTTTT**GTATTACAAAATATGAAATTTTTGGATGAAGT
	R	**AAAAAAAAAA**TATTCTGGGTTTGTTAGAAATGCATTAA
Upstream-1 URA3	*F*	TTGTTCAGATTGATTAAGAAGAGTAATTGT
	R	AGTCAACAAGATCTCTAAAGTATTCATTTT
Downstream-1 URA3	*F*	**ATGAAAAACTTTCTAGTTTA**ATCAGGTATAAATTTCCATC
	R	ATAATTTTGCTAGATACATTGAAAAGATTTGGGAC
Upstream-2 URA3	*F*	TATCAAAACATTCTATTTCATTAACATCTGAATTGAATTT
	R	TGTGTATATGTGTGTGTGTGTTTATGGATA
Downstream-2 URA3	*F*	**GGATACTTCTCTTTCAAAATTTCA**TTGATTATTACTGTTAATAAA
	R	AAATTCAGCCACTGGGATTATATTATATACTACTTATTTAACA
pGAPDH	*F*	**TTTTTTTTTT**GGTTACTTTGCATTTGGTTCA
	R	**AAAAAAAAAA**TGTTAAAATTTAATTTGTAAGTGATTTGATTTAATT
pGAPDH 1-2	*F*	**GCAAACTGTGATGGA**AATTTTTTTTTTCTTTTTG
	R	TGTTAAAATTTAATTTGTAAGTGATTTGATTTAATTAATTGAGTT
xyl1[b]	*F*	**TTTTTTTTTT**ATGTTTAAATTTTTCACTTCTCCAACAACT
	R	**AAAAAAAAAA**TGAAATTTTGAAAGAGAAGTATCCAGAAAG
xyl1[b]-2	*F*	**TTACAAATTAAATTTTAACA**ATGTTTAAATTTTTCACTTC
	R	TGAAATTTTGAAAGAGAAGTATCCAGAAAG
zwf[b]-1	*F*	**ACAAATTAAATTTTAACA**ATGTCTTATGATTCCTT
	R	TAAACTAGAAAGTTTTTCATTATTACCCATTTG
hig-1	*F*	**CTTTAGAGATCTTGTTGACT**ATGAAAAAGCCTGAACTCAC
	R	TCCATCACAGTTTGCCAGTGATACACATG
hig-2	*F*	**CACACACACATATACACA**ATGAAAAAGCCTGAACTC
	R	TCCATCACAGTTTGCCAGTGATACACATG

F: Forward; R: Reverse; **a:** abrange região promotora, codificante e terminadora; **b:** abrange região codificante e terminadora.
Fonte: Arquivo próprio.

3.2.1.4 Extração de DNA genômico (gDNA) de *C. tropicalis*

A extração do gDNA de *C. tropicalis* foi realizada com emprego do kit comercial Wizard Genomic DNA Purification® (Promega). Para tanto, foi utilizado um cultivo da levedura em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de caldo YPD, incubados a 30 ºC, 200 rpm por 24 h. Após este tempo, o cultivo foi transferido a tubos Falcon® de 50 mL, centrifugado a 3.000 rpm por 15 min, o sobrenadante obtido foi descartado e as células submetidas a maceração com N_2 líquido. O produto macerado foi transferido a um tubo de micro-centrífuga de 1,5 mL, no qual foi adicionado 600 µL de solução de *Nucleo Lysis* e incubado a 65 ºC por 15 min. Posteriormente, foi adicionado 100 µL de solução de precipitação de proteínas, incubado por 5 min em gelo e centrifugado a 13.000 *g* por 15 min.

O sobrenadante resultante foi transferido a um novo tubo de 1,5 mL contendo 300 µL de isopropanol à temperatura ambiente, foi misturado por inversão e centrifugado a 13.000 *g* por 15 min. Após o descarte do sobrenadante, ao precipitado foi adicionado 300 µL de etanol 70% mantido a -20 ºC e centrifugado a 13.000 *g* por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco ao ar durante 1 h. A seguir foi adicionado 50 µL de solução de reidratação de DNA e 1,5 µL de solução RNAse, esta mistura foi incubada a 37 ºC e posteriormente armazenada a 4 ºC.

A qualidade do DNA extraído foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), a 70 V por 30 min. O marcador de massa molar (250–10.000pb) GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) foi utilizado como referência. Foi utilizada a placa NanoQuant®, analisada no espectrofotômetro de microplaca *Infinite M200Pro*® (Tecan) para quantificação da concentração do DNA extraído.

3.2.1.5 Amplificação das regiões de interesse mediante Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificação dos fragmentos de DNA correspondentes às regiões de interesse foi utilizada a técnica de PCR. Na Tabela 3.2 são apresentados os parâmetros para preparo das reações de PCR e as condições de operação usadas na maioria dos casos. Em alguns casos modificações foram realizadas nas reações de PCR, quanto ao volume do DNA molde (ou *template*), e/ou nas condições de operação, quanto à temperatura de anelamento e/ou o tempo de extensão, em função das características das sequências iniciadoras empregadas e dos fragmentos a serem amplificados, e baseado nas recomendações do fabricante da *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific). As amplificações foram confirmadas mediante eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), a 70 V por 40-60 min. Os marcadores de massa molar GeneRuler 1 kb DNA Ladder (250–10.000 pb) ou 1 kb Plus DNA Ladder (75-20.000 pb) (Thermo Scientific) foram utilizados como referência.

Tabela 3.2 - Parâmetros para preparo das reações de PCR e condições de operação.

Reações de PCR			Condições de operação			
Componente		**(µL)**	**Fase**	**Temperatura (ºC)**	**Tempo (s)**	
DNA molde		0,5	**Desnaturação inicial**	98	30	1X
Sequência iniciadora *forward*	10 pmol μL^{-1}	2	**Desnaturação**	98	10	28X
Sequência iniciadora *reverse*	10 pmol μL^{-1}	2	**Anelamento**	62	30	28X
Tampão CG 5X		10	**Extensão**	72	60	28X
dNTPs 10X	2,5 mM	2	**Extensão final**	72	300	1X
DMSO (100%)		2		16	Indeterminado	
$MgCl_2$	50 mM	0,5				
Phusion DNA polymerase		0,5				
Água ultrapura		30,5				
	Volume total	50				

Fonte: Arquivo próprio

3.2.1.6 Purificação de produtos de PCR e de bandas em gel de agarose

O Kit comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) foi empregado para purificação de produtos de PCR e de bandas em gel de agarose contendo fragmentos de DNA de interesse. No caso do produto de PCR, ao volume deste, aproximadamente 50 µL, foi adicionado 150 µL da *Membrane Binding Solution* e o volume total foi transferido para uma coluna de purificação disponível no kit. Após 1 min de incubação à temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada a 16.000 *g* por 1 min e descartado o filtrado. A seguir, 750 µL de *Membrane Wash Solution* foi adicionada à coluna, a qual foi imediatamente centrifugada a 16.000 *g* por 1 min e descartado o filtrado. A coluna foi novamente submetida a centrifugação a 16.000 *g* por 2 min e descartado o filtrado. Posteriormente, a coluna foi transferida a um tubo novo de 1,5 mL e adicionado nela 30-50 µL de água ultrapura para eluição do DNA. Após incubação por 2 min à temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada a 16.000 *g* por 2 min. Finalmente, a coluna foi descartada e o DNA purificado armazenado a -20 ºC.

No caso de purificação de bandas em gel de agarose, depois do corte da mesma a porção correspondente do gel foi colocada em um tubo de 1,5 mL, adicionado 10 µL da *Membrane Binding Solution* para cada 10 mg do fragmento do gel e misturado vigorosamente em vortex. A seguir, a mistura foi incubada a 60 ºC até a dissolução completa do gel. A mistura foi transferida a uma coluna, incubada à temperatura ambiente por 1 min, centrifugada a 16000 *g* por 1 min e descartado o sobrenadante. A partir da etapa de lavagem

com a *Membrane Wash Solution* o protocolo foi o mesmo descrito para purificação de produtos de PCR.

Devido a problemas obter resultados positivos em reações de PCR quando empregados os produtos purificados de bandas de gel como *template*, foi realizada modificação do protocolo estabelecido pelo fabricante, conforme descrito a seguir: 1) A incubação da coluna após adição da *Membrane Binding Solution* foi aumentada de 1 para 3 min; 2) A etapa de lavagem com a *Membrane Wash Solution* foi repetida duas vezes, e na centrifugação seguinte o tempo foi aumentado de 2 para 4 min; 3) Prévio à adição da água ultrapura para eluição do DNA, esta foi aquecida a 60 ºC por 5 min; 4) A incubação da coluna após da adição da água para eluição foi realizada a 60 ºC por 1 min e depois à temperatura ambiente por 4 min. Adicionalmente, é importante mencionar que as condições de eletroforese foram modificadas quando o objetivo foi o corte e purificação de bandas. Neste caso foi empregado gel de agarose de 0,6 % (m/v), no qual foi aplicada a mistura de 10 µL de DNA *Loading* e 15 µL da amostra, e a eletroforese ocorreu a 70 V por 90-120 min, até ter separação apropriada da banda de interesse.

3.2.1.7 Construção sequencial de cassetes de deleção mediante *Gibson Assembly*

A técnica de *Gibson Assembly* foi empregada para construção de cassetes de deleção a partir da junção sequencial de fragmentos adjacentes (GIBSON, 2009). Para tanto foram seguidas as recomendações do fabricante quanto ao preparo e operação das reações (New England BioLabs), exceto o fato que o volume total da reação foi reduzido de 20 µL para 10 µL, conforme padronizado no Laboratório de Biologia Sintética e Molecular da EEL/USP, coordenado pelo prof. Fernando Segato. A reação de *Gibson* foi constituída por 5 µL do *Gibson Assembly Master Mix*, o qual é composto segundo o fabricante pelas enzimas T5 exonuclease, *Phusion*® DNA polimerase e *Taq* DNA ligase, e 5 µL da mistura dos fragmentos a serem montados. Esta mistura foi feita seguindo a recomendação do fabricante para cálculo das quantidades a serem utilizadas de cada fragmento, baseado na indicação de usar entre 0,02 e 0,5 pmol de DNA para reações com 2-3 fragmentos e entre 0,2 e 1,0 pmol de DNA para 4-6 fragmentos. O cálculo de massa em pmol de cada fragmento foi feito conforme a equação 3.1:

$$pmol = \frac{(ng\ x\ 1000)}{pb\ x\ 650\ Da} \qquad (3.1)$$

Onde *ng* corresponde à massa do fragmento em ng determinada mediante quantificação da concentração pela absorbância a 260 nm usando o equipamento NanoDrop One C (Thermo Scientific), e *pb* corresponde ao tamanho do fragmento.

A reação de *Gibson* ocorreu a 50 ºC por 60 minutos, e em seguida o produto desta foi empregado diretamente como *template* para amplificação do fragmento montado por PCR, na qual foram usadas as sequências iniciadoras correspondentes e nas condições previamente mencionadas. O sucesso da montagem e amplificação do fragmento de interesse foi verificado mediante eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), a 70 V por 40-60 min.

3.2.1.8 Transformação de *C. tropicalis*

Durante a execução dos experimentos para desenvolvimento de cepas de *C. tropicalis* auxotróficas para uridina, foram avaliados dois métodos para transformação da levedura, um químico baseado no empregado de PEG e LiAc, e o outro por eletroporação.

a. Transformação por método químico

O método químico de transformação foi baseado no protocolo estabelecido por Tripp et al. (2013), denominado *DMSO-based protocol*, conforme descrito a seguir. Previamente foi preparada uma solução de transformação composta por 800 µL de Polietilenoglicol-4000 (PEG-4000) (50%), 100 µL de LiAc (1 M), 20 µL de EDTA (50 mM), 10 µL de Tris-HCl (1 M, pH 7,5) e 70 µL de água ultrapura. Foi realizado um cultivo de *C. tropicalis* em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de caldo YPD durante 16 h, a 30 ºC e 150 rpm. Uma alíquota de 1,5 mL deste cultivo foi centrifugada a 16.000 *g* por 1 min e o sobrenadante descartado. Ao *pellet* foi adicionado 5 µL do cassete de deleção (100-700 ng DNA) e 500 µL da solução de transformação, misturado gentilmente e depois adicionado 56 µL de DMSO 100%, homogeneizado e incubado a 30 ºC por 15 min. A seguir, a mistura foi incubada a 42 ºC por 15 min, posteriormente centrifugada a 16.000 *g* por 15 s e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspendido em 200-500 µL de água ultrapura e empregado para plaqueamento no ágar YPD suplementado com uracila (5 mM), uridina (10 mM), sorbitol (1 M) e 5-FOA (1 gL^{-1}) para seleção dos transformantes. As placas foram incubadas a 30 ºC por até 120 h.

b. Eletroporação

Foi empregada a metodologia de transformação de levedura mediante eletroporação descrita por Valadares (2017) para *Pichia pastoris*, porém usando as condições de eletroporação estabelecidas no equipamento *Gene Pulser Xcell Electroporation system* (Bio-Rad) para a levedura *C. albicans.*

- Preparação de células competentes

A partir da levedura *C. tropicalis* mantida em Ágar Extrato de Malte a 4 ºC foi realizado um pre-inóculo em frascos Erlenemeyer de 250 mL com 50 mL de caldo YPD, durante 16h, a 30 ºC e 150 rpm com de meio. A partir de 1 mL deste pré-inoculo, foi realizado um inóculo no mesmo meio e mesmas condições de cultivo, porém por 4-6h até atingir densidade ótica entre 1,3 e 1,5 a 600 nm. Os frascos Erlenmeyer contendo os cultivos foram mantidos em banho de gelo por 10 min, seguido pela transferência do cultivo a tubos Falcon® de 50 mL, centrifugação a 1.500 *g* por 5 min a 4 ºC e descarte do sobrenadante. A biomassa celular foi ressuspendida em 5 mL de caldo YPD e 1 mL de tampão HEPES 1M pH 7,0, seguido pela adição de 125 µL de DTT 1M e incubação estática a 30 ºC por 15 min. Após este tempo, água ultrapura gelada foi adicionada até um volume de aproximadamente 25 mL e a mistura foi centrifugada a 1500 *g* por 5 min a 4 ºC e o sobrenadante foi descartado. A biomassa celular foi novamente ressuspendida em 12,5 mL de água ultrapura gelada, centrifugada a 1.500 *g* por 5 min a 4 ºC e o sobrenadante foi descartado. A seguir, a biomassa celular foi ressuspendida em 1 mL de sorbitol 1M gelado, centrifugada 1.500 *g* por 5 min a 4 ºC e descartado o sobrenadante. Finalmente, a biomassa celular foi ressuspendida em 50 µL de sorbitol 1 M gelado, e 40 µL desta suspensão foram transferidos para tubos de 1,5 mL para ser imediatamente utilizados na eletroporação.

- Transformação por eletroporação

A suspensão celular (40 µL) foi gentilmente misturada com 10 µL do DNA correspondente ao cassete de deleção (aproximadamente 800 ng DNA), incubada em gelo por 5 min e transferida para cubeta de eletroporação estéril. A seguir a suspensão celular foi submetida a um pulso elétrico de 1,5 kV, 25 µF e 200 Ω, seguindo o protocolo utilizado para transformação de *C. albicans*, conforme indicado pelo manual do eletroporador *Gene Pulser Xcell Electroporation system* (Bio-Rad), o qual é baseado no trabalho de Backer et al. (1999). Imediatamente após a eletroporação, 1 mL da solução de sorbitol 1M gelada foi adicionada

à suspensão celular, a qual foi posteriormente transferida para tubos Falcon® de 15 mL e incubadas estaticamente a 30 ºC por 2 h. Alíquotas de 200 µL foram transferidas para meio de cultivo de seleção de transformantes. Conforme será explicado posteriormente, como meio base para a seleção dos transformantes foram empregados os Ágar YPD, YNB ou YNB sem aminoácidos (YNBs), todos os quais foram suplementados com uracila (5 mM), uridina (10 mM) e 5-FOA (1 gL^{-1}). As placas foram incubadas a 30 ºC por aproximadamente 96 h até crescimento de colônias isoladas.

3.2.1.9 Verificação genotípica e fenotípica das cepas transformantes

Inicialmente foram consideradas como cepas transformantes aquelas capazes de crescer no meio de seleção na presença de 5-FOA (1,0 gL^{-1}) em concentração maior ao CIM determinado para a cepa selvagem de *C. tropicalis* (0,8 gL^{-1}). Foram selecionadas aleatoriamente colônias para realização de cultivos para conservação a longo prazo e verificação da transformação. Para tanto, as colônias foram transferidas para tubos Falcon® de 50 mL contendo 10 mL de caldo YPD (YNB ou YNBs) suplementado com uracila (5 mM), uridina (10 mM) e 5-FOA (1 gL^{-1}), e cultivadas a 30 ºC, 150 rpm por 48h. Estes cultivos foram utilizados para conservação a longo prazo a -80 ºC mediante mistura de 0,7 mL do cultivo com 0,3 mL de glicerol 70 %. Estes cultivos foram empregados também como inóculo para novos cultivos em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de caldo YPD (YNB ou YNBs) suplementado com uracila (5 mM), uridina (10 mM) e 5-FOA (1 gL^{-1}), os quais foram incubados a 30 ºC, 150 rpm por 48h. A massa celular resultantes deste cultivo foi empregada para verificação genotípica e fenotípica da transformação.

Para a verificação genotípica, o gDNA das cepas transformantes foi extraído seguindo a metodologia apresentada no item 1.2, este foi empregado como *template* para amplificação por PCR da região contemplada entre o *upstream* e *downstream* do gene *ura3*, bem como do gene *ura3*, com o intuito de verificar a deleção do mesmo. A amplificação de outras regiões também foi testada para verificação genotípica da transformação, conforme será explicado posteriormente.

Posteriormente, o sucesso das transformações foi também avaliado mediante o crescimento das cepas transformantes em meios de cultivos suplementados ou não com uracila (5 mM), uridina (10 mM) e várias concentrações de 5-FOA (1 e 1,5 gL^{-1}), com o

intuito de verificar a auxotrofia à uracila e a capacidade de crescimento da levedura na presença de 5-FOA, características esperadas quando o gene *ura3* não está funcional.

3.2.2. Super expressão da enzima xilose redutase (XR)

Como parte das estratégias avaliadas para deleção do gene *ura3*, foi proposta a substituição gênica de um de seus alelos com um cassete constituído pelo gene *xyl1*, que codifica a enzima XR, sob controle do promotor da gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (pGAPDH). Para tanto, o pGAPDH foi amplificado por PCR a partir do gDNA da *C. tropicalis* selvagem e usando sequências iniciadoras desenhadas a partir do gene *gapdh* de *C. tropicalis* MYA-3404, conforme indicado previamente e apresentado na Tabela 3.1 (item 3.2.1.3). É importante destacar que inicialmente foi considerado como pGAPDH uma região constituída por 1100 nucleotídeos antecedentes ao códon iniciador ATG do gene *gapdh*, baseado no trabalho de Zhang, C. et al. (2015), no qual se indicou que o pGAPDH de uma cepa de *Candida glyceronigenes* correspondia a 1068 pb. Entretanto, posteriormente constatou-se que o pGADPH de *C. tropicalis* apresentava uma região regulatória de 1455 pb (5' *upstream*) (JEON et al., 2012), pelo qual as sequências iniciadoras foram redesenhadas, denominadas pGAPDH 1-2 *F* e *R,* conforme já apresentado na Tabela 3.1.

A região codificante do gene *xyl1* foi amplificada juntamente com 500 nucleotídeos após a trinca de parada do gene, de modo a obter a região terminadora do gene. As sequências iniciadoras foram desenhadas com base no gene *xyl1* de *C. tropicalis* MYA-3404, conforme apresentado na Tabela 3.1. Os fragmentos amplificados do pGAPDH e *xyl1* foram montados em *frame* com as regiões *upstream* e *downstream* do gene *ura3*, usando a técnica de *Gibson Assembly*, para constituir o cassete de deleção do *ura3* denominado pXR. Ainda outro cassete de substituição gênica do *ura3* foi proposto e denominado pXYL1, conforme será explicado posteriormente, no qual o pGAPDH e o gene *xyl1* foram montados em *frame* entre um fragmento parcial de 500 nucleotídeos do gene de resistência a higromicina, denominado *hig*, amplificado a partir do vetor pFC332 (NØDVIG et al., 2015), e a região *downstream*-1 do gene *ura3.*

3.2.3. Super expressão da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

Similar ao indicado no item 3.2.2 com a XR, uma das estratégias avaliadas para deleção do gene *ura3* envolve a substituição gênica de um de seus alelos com um cassete constituído pelo gene *zwf*, que codifica a enzima G6PDH em *C. tropicalis*, sob controle do pGAPDH. As sequências iniciadoras foram construídas com base no gene *zwf* de *C. tropicalis* MYA-3404, incluindo uma sequência de 500 nucleotídeos após a trinca de parada do gene para amplificação da região terminadora. O gDNA da cepa selvagem de *C. tropicalis* foi utilizado como *template* para a amplificação dos fragmentos de interesse, os quais foram a seguir montados no cassete denominado pZWF, em *frame* entre o fragmento *hig* e a região *downstream*-2 do gene *ura3*.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do 5-FOA

Na Tabela 3.3 são apresentados os resultados obtidos na determinação da CIM do 5-FOA, correspondentes à contagem de unidades formadoras de colônia (UFC mL^{-1}) resultantes do cultivo de *C. tropicalis* em ágar YPD contendo concentrações crescentes de 5-FOA, após diferentes tempos de incubação.

Tabela 3.3 - Avaliação do crescimento de *C. tropicalis* em ágar YPD adicionado com concentrações crescentes de 5-FOA durante cultivo por 144h.

Concentração 5-FOA (gL^{-1})	**Concentração celular (UFC mL^{-1})**		
	24 h	**48 h**	**144 h**
0	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$
0,2	< 10	40×10^1	44×10^3
0,4	< 10	< 10	22×10^1
0,6	< 10	< 10	30×10^1
0,8	< 10	< 10	< 10
1,0	< 10	< 10	< 10

Fonte: Arquivo próprio

Verifica-se na Tabela 3.3 que o efeito inibitório do 5-FOA no crescimento da levedura foi dependente do tempo de exposição, uma vez que o aumento do tempo de cultivo até 144 h permitiu o crescimento da levedura em concentrações até 0,6 gL^{-1}. Por outro lado, em concentrações iguais ou acima de 0,8 gL^{-1} houve efeito inibitório independente do tempo de cultivo. Portanto, estes resultados permitiram a adoção 0,8 gL^{-1} como CIM do 5-FOA

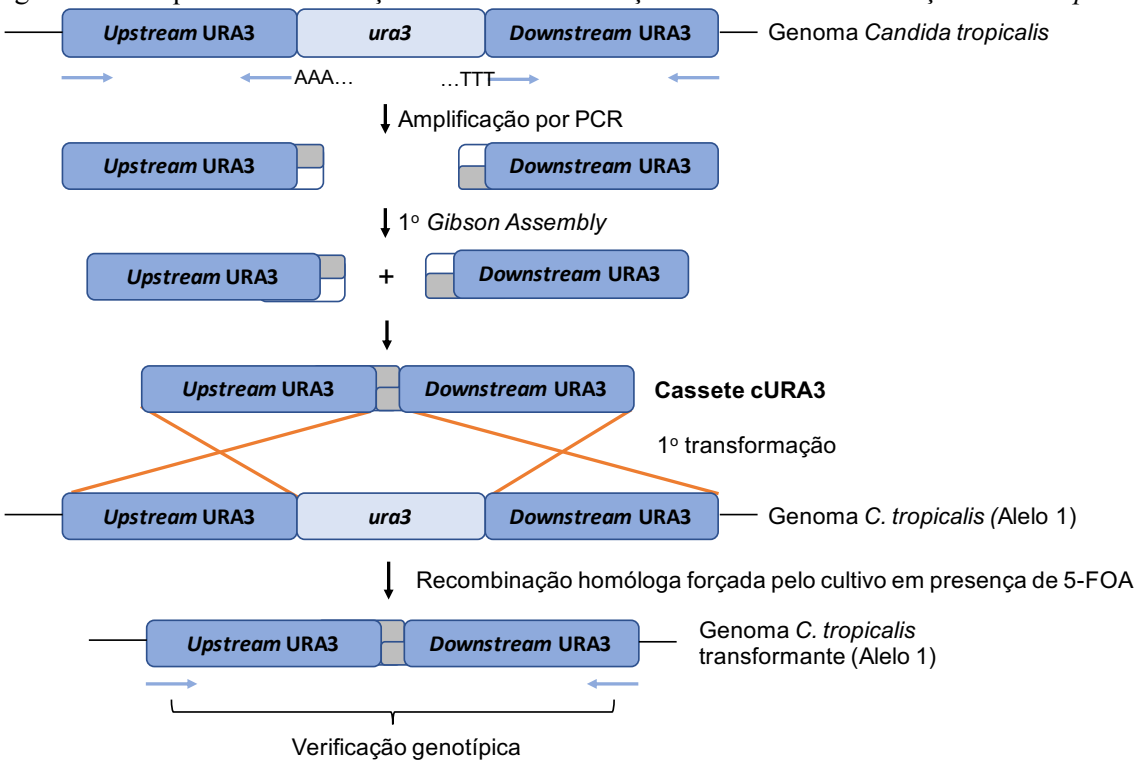
para *C. tropicalis* cultivada em ágar YPD. Destaca-se que esta mesma concentração de 5-FOA foi empregada por Jeon et al. (2012) e Ahmad et al. (2012) nos meios de cultura para seleção de cepas transformantes de *C. tropicalis*. No caso de *C. guilliermondii,* Boretsky et al. (2007) demonstraram um comportamento semelhante quando cultivada na presença de 5-FOA, uma vez que cepas selvagens desta levedura foram capazes de tolerar até 0,4 gL^{-1} deste composto, sendo definida uma concentração de 1 gL^{-1} para a utilização na seleção de cepas auxotróficas para uridina.

3.3.2 Deleção do gene *ura3*

A recombinação homóloga com cassetes construídos *in vitro* foi selecionada como estratégia para deleção do gene *ura3* e, consequentemente, desenvolvimento de cepas de *C. tropicalis* com auxotrofia para uridina. É importante mencionar que estudos com *C. tropicalis* com propósitos similares ao do presente trabalho empregaram a mutagênese aleatória, tanto química quanto física por exposição a luz UV, para interromper ou minimizar a expressão funcional do gene *ura3* (HASS et al., 1990; KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006). No presente trabalho, optou-se por não empregar a mutagênese aleatória com o intuito de evitar que alterações não identificadas no genoma da levedura pudessem eventualmente representar influência negativa no crescimento e/ou desempenho da cepa transformada (FONZI; IRWIN, 1993).

Assim, a técnica de recombinação homóloga foi inicialmente explorada para deleção do gene *ura3* com um cassete composto por regiões flanqueadoras 5' (*upstream*) e 3' (*downstream*) do gene de 1 kb cada uma. O cassete de deleção, denominado cURA3, foi montado *in vitro* mediante a técnica de *Gibson Assembly*, conforme esquema da Figura 3.3, e amplificado por PCR. A técnica de *Gibson Assembly* é baseada na presença de sequências de homologia entre os fragmentos adjacentes, as quais foram criadas a partir da inclusão de cauda poliA (10 nucleotídeos) na sequencia iniciadora *upstream reverse* e cauda poliT (10 nucleotídeos) na sequência iniciadora *downstream forward,* conforme Tabela 3.1. A utilização de caudas poliA e poliT foi fundamentada na possibilidade de utilizar os fragmentos amplificados na construção de diversos cassetes conforme fosse requerido.

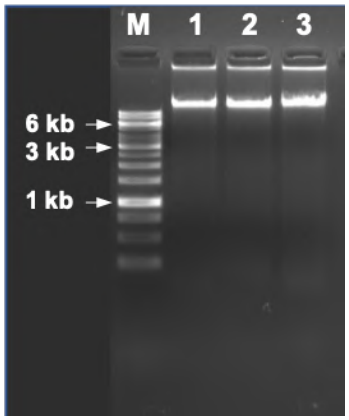
Figura 3.3 - Esquema da construção do cassete de deleção cURA3 e transformação de *C. tropicalis*



Upstream* URA3:** região *upstream* do gene *ura3* entre 1 e 1000 nucleotídeos antes da trinca de início do gene (1 kb); ***Downstream* URA3:** região *downstream* do gene *ura3* entre 1 e 1000 nucleotídeos após a trinca de parada do gene (1 kb). ***ura3: região codificante do gene *ura3*.
Fonte: Arquivo próprio

Para construção do cassete de deleção cURA3, foi necessário a extração de gDNA de *C. tropicalis*, amplificação dos fragmentos por PCR e montagem dos mesmos. Primeiramente, quanto à extração do gDNA o de *C. tropicalis*, é na Figura 3.4 apresentada a eletroforese em gel de agarose realizada para avaliação da qualidade do gDNA extraído. A visualização de bandas únicas de alta massa molar permitiu considerar que o método de extração foi adequado para a obtenção de gDNA íntegro e sem evidências de contaminação por RNA. A partir deste resultado foi inferido que o gDNA extraído apresenta qualidade suficiente para ser utilizado em subsequentes reações de amplificações das regiões de interesse. Além disto, como resultado da extração foi obtido em média 430 ngμL^{-1} de DNA. Foi feita diluição 1:2 do gDNA para realização das atividades subsequentes.

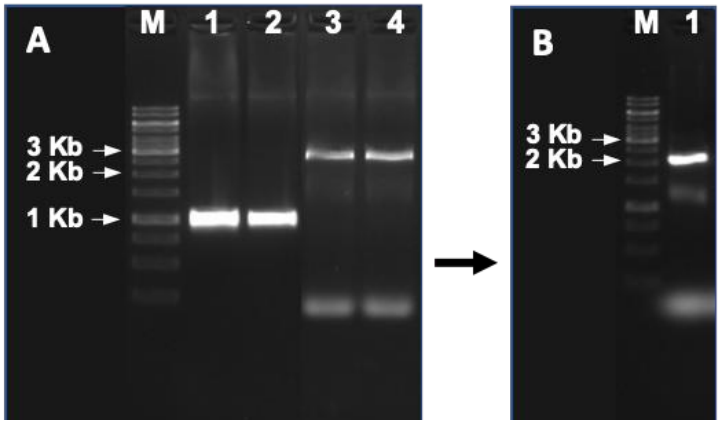
Figura 3.4 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) para análise da qualidade do DNA genômico extraído de *C. tropicalis*.



M: Marcador de peso molecular (250pb–10000pb) GeneRuler 1 kb DNA Ladder; **Linhas 1-3**: gDNA.
Fonte: Arquivo próprio

Na Figura 3.5A são apresentados os produtos de amplificação por PCR correspondentes às regiões flanqueadoras *upstream* e *downstream* do gene *ura3* de *C. tropicalis* (1 kb cada região) (linhas 1 e 2, respectivamente), e à região total contendo o gene (2,8 kb) (linhas 3 e 4), correspondente às duas regiões flanqueadoras de 1 kb e a região codificante do gene *ura3* de 0,8 kb. Na Figura 3.5B é apresentado o produto de PCR do cassete construído por montagem das regiões flanqueadoras do gene *ura3*, correspondente a uma banda de 2 kb.

Figura 3.5 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) mostrando os produtos de PCR correspondentes à amplificação das regiões flanqueadoras do gene *ura3* de *C. tropicalis* e do cassete cURA3.

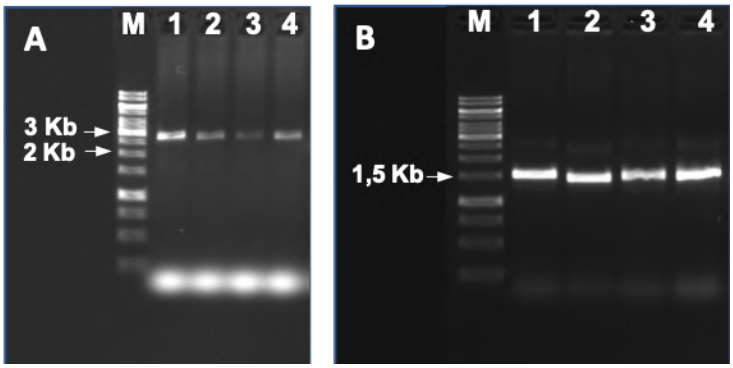


M: Marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder 1 kb.
A) Linha 1: *upstream* do gene *ura3* (1 kb); **Linha 2:** *downstream* do gene *ura3* (1 kb); **Linhas 3-4:** Região entre *upstream* e *downstream* do gene *ura3* (2,8 kb).
B) Linha 1: Cassete cURA3, correspondente à montagem das regiões *upstream* e *downstream* do gene *ura3* (2 kb).
Fonte: Arquivo próprio

O cassete cURA3 foi utilizado na avaliação de dois possíveis métodos de transformação da levedura. Inicialmente foi utilizado o método químico baseado no protocolo de Tripp et al. (2013), denominado *DMSO-based protocol*, e similar ao empregado por Ko, Kim, J. e Kim, J.H. (2006) para transformação de *C. tropicalis*. Apesar que este método já foi indicado como um dos mais simples e eficientes, no presente trabalho este não se mostrou eficaz, uma vez que não houve crescimento de colônias após 120 h de cultivo no meio ágar YPD suplementado com uracila (5 mM), uridina (10 mM), sorbitol (1 M) e 5-FOA (1,0 gL^{-1}). Em sequência, a metodologia de eletroporação foi avaliada para transformação de *C. tropicalis*, a qual resultou no crescimento de colônias isoladas após de 72 h de cultivo no mesmo meio. O crescimento de colônias no meio de seleção contendo 5-FOA em concentração superior ao CIM (0,8 gL^{-1}) sugeriu a possível deleção do gene *ura3*, uma vez que a proteína orotidina 5'-fosfato descarboxilase codificada por este gene, converte o 5-FOA a fluorodeoxiuridina, composto tóxico para a célula, impedindo seu crescimento.

Para verificação genotípica da transformação, 10 das colônias crescidas após a eletroporação foram selecionadas e cultivadas em caldo YPD suplementado com uracila (5 mM), uridina (10 mM) e 5-FOA (1,0 gL^{-1}). Apenas 3 (denominadas cepas 1, 7 e 10) das 10 colônias selecionadas apresentaram crescimento satisfatório neste meio, sendo possível prosseguir a verificação genotípica. Esta atividade foi realizada mediante extração do gDNA e amplificação da região compreendida pelas regiões flanqueadoras do gene *ura3*. Na Figura 3.6A é possível verificar a obtenção de bandas de aproximadamente 2,8 kb nas cepas transformantes e na cepa selvagem, tamanho correspondente a 1 kb de cada região flanqueadora e 0,8 kb da região codificante do gene. Com o intuito de confirmar a presença do *ura3*, foram utilizadas sequências iniciadoras especialmente desenhadas para amplificar a região compreendida entre o promotor e o terminador do gene (aproximadamente 1,5 kb), cujos produtos de PCR são apresentados na Figura 3.6B. A obtenção de produtos de PCR correspondentes ao tamanho aproximado da região confirma a presença do gene *ura3* nas colônias transformantes selecionadas.

Figura 3.6 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do PCR para verificação da presença do gene *ura3* em em cepas transformantes de *C. tropicalis*.



M: Marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder 1 kb.
A) Região entre *upstream* e *downstream* do gene *ura3* (2,8 kb): Linha 1: *C. tropicalis* selvagem; **Linha 2:** Cepa transformante 1; **Linha 3:** Cepa transformante 7; **Linha 4:** Cepa transformante 10.
B) Gene *ura3* (1,5 kb): Linha 1: *C. tropicalis* selvagem; **Linha 2:** Cepa transformante 1; **Linha 3:** Cepa transformante 7; **Linha 4:** Cepa transformante 10.
Fonte: Arquivo próprio

A presença do gene *ura3* no genoma dos transformantes selecionados e a capacidade de crescimento destas no meio de cultura suplementado com 5-FOA pode ser justificada pelo fato de *C. tropicalis* ser uma levedura diploide, o que implica a presença de dois alelos do gene (HASS et al., 1990; FONZI; IRWIN, 1993; WILSON et al., 2000). A etapa de transformação realizada possivelmente pode ter causado a deleção de apenas um dos alelos, o que resultaria na diminuição no número de RNA mensageiros do gene de forma a permitir o crescimento na presença de 5-FOA, porém a presença de um dos alelos no genoma continua sendo detectada pela sua amplificação pelas sequências iniciadoras correspondentes. Uma ferramenta para comprovar esta hipótese poderia ser a comparação da expressão do gene *ura3* das cepas transformantes e a selvagem através da avaliação do cDNA por PCR de tempo real (RT-PCR).

Considerando os resultados obtidos a partir da verificação genotípica, experimentos foram realizados para verificação fenotípica mais completa das cepas transformantes em comparação com a cepa selvagem, quanto à capacidade destas para crescer na ausência de uracila e uridina e na presença de 5-FOA, inclusive em concentração superior à testada anteriormente. Neste teste foram empregados meios de cultura com glicose como fonte de carbono, mas sendo um deles complexo, como o YPD, um definido baseado na utilização de *Yeast Nitrogen Base* com aminoácidos, e um meio mínimo sem fontes orgânicas de nitrogênio. Na Tabela 3.4 são apresentados os resultados obtidos nos experimentos de avaliação fenotípica das cepas transformantes e comparação com a selvagem.

Tabela 3.4 - Verificação fenotípica das cepas transformantes para deleção do gene *ura3* e comparação com a cepa selvagem de *C. tropicalis*

Meio	Suplementação			Cepa / Tempo (h)											
	Uracila (mM)	Uridina (mM)	5-FOA (gL^{-1})	Cepa 1			Cepa 7			Cepa 10			Cepa selvagem		
				24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
YPD	0	0	0	++	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
	0	0	1	++	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	-	-	-
	5	10	1	++	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	-	-	-
	5	10	1,5	+	+++	+++	-	++	+++	-	++	++	-	-	-
YNB	0	0	0	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	10	1	-	+	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	5	10	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MM	0	0	0	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	++	++
	0	0	1	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	5	10	1	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
	5	10	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Arquivo próprio

Primeiramente, constata-se na Tabela 3.4 que algumas das cepas transformantes apresentaram capacidade de crescer na ausência de uracila e uridina, sendo que a intensidade de crescimento dependeu da composição do meio empregado, da concentração de 5-FOA e o tempo de cultivo. Ao mesmo tempo, verifica-se nesta tabela que a capacidade de crescimento das cepas transformantes na presença de 5-FOA variou em função da concentração deste, da composição do meio e do tempo de cultivo. Diferentemente dos transformantes, a cepa selvagem foi incapaz de crescer nos meios suplementados com 5-FOA em concentrações acima da CIM determinado previamente (0,8 gL^{-1}), independente da composição do meio.

Observa-se ainda na Tabela 3.4 que o cultivo das cepas transformantes no meio YPD, o qual apresenta fontes nutricionais orgânicas complexas (extrato de levedura e peptona), resultou em crescimento na ausência de uracila e uridina e em presença de 5-FOA. No entanto, o aumento da concentração de 5-FOA de 1,0 gL^{-1} para 1,5 gL^{-1} causou um crescimento mais lento. Já no meio YNB, o qual é composto por concentrações definidas de aminoácidos, vitaminas, sais minerais e sulfato de amônio como fonte inorgânica de nitrogênio, houve crescimento em ausência de uracila e uridina apenas quando o 5-FOA não foi adicionado ao meio. Na presença de 5-FOA, a capacidade de crescimento das cepas transformantes foi menor no meio YNB em comparação ao meio YPD, sendo evidente apenas após 48 h no caso da cepa 1 e de 72 h nas cepas 7 e 10 (Tabela 3.4). Nenhuma das

cepas foi capaz de crescer no meio YNB suplementado com 1,5 gL^{-1} de 5-FOA. Por fim, no meio mínimo (MM), o qual foi composto apenas por sulfato de amônio como fonte inorgânica de nitrogênio e por cloreto de cálcio, a capacidade de crescimento foi consideravelmente reduzida, inclusive da cepa selvagem em ausência de 5-FOA. No entanto, as cepas transformantes foram capazes de crescer na ausência de uracila e uridina mesmo na presença de 5-FOA (1 gL^{-1}), resultado que é diferente do obtido no meio YNB e similar ao meio YPD. O aumento na concentração de 5-FOA a 1,5 gL^{-1} no meio MM inibiu completamente o crescimento das cepas transformantes, similar ao encontrado no meio YNB e diferente do meio YPD.

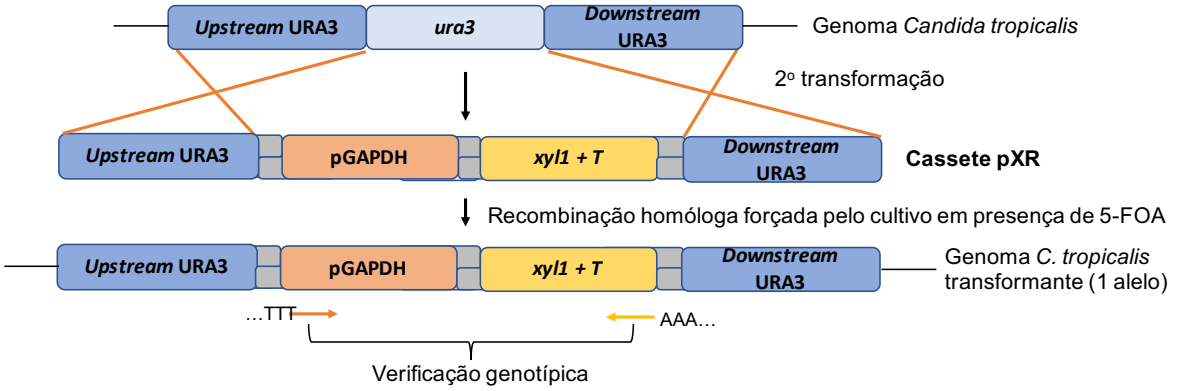
Assim, com base nos resultados obtidos de verificação fenotípica das cepas transformantes, pode ser inferido que a transformação com o cassete de deleção do gene *ura3* causou uma modificação genotípica da levedura. Possivelmente a deleção pode ter ocorrido em um dos alelos do gene, a qual causou uma alteração fenotípica que promoveu a capacidade de crescimento da levedura na presença de 5-FOA em concentrações superiores ao CIM. Entretanto, tal alteração fenotípica não resultou na auxotrofia para uridina e uracila, uma vez que as cepas transformantes foram capazes de crescer na ausência destes compostos. Além disso, os resultados indicam que o meio YPD propiciou o crescimento da levedura em presença de 5-FOA e ausência de uracila e uridina, sendo, portanto, inapropriado para a seleção dos transformantes. Portanto, nas atividades posteriores foi feita a substituição do meio YPD pelo YNB. Para tanto, determinou-se a CIM de 5-FOA para *C. tropicalis* em meio YNB, a qual foi definido em 0,8 gL^{-1}, correspondente à concentração encontrada previamente quando para cultivos em meio YPD.

É importante mencionar ainda que já foi reportado o isolamento em meio YNB de cepas selvagens de *M. guilliermondii* resistentes a 5-FOA (1 gL^{-1}) que não apresentaram auxotrofia à uracila (BORETSKY et al., 2007). Estes autores relacionaram este fato com a existência de um sistema ativado de biossíntese de pirimidinas. Foi já também relatado que células de *C. tropicalis* que resistem níveis tóxicos de 5-FOA pode ser por defeitos no sistema de transporte deste composto ou outros mecanismos que reduzem sua efetividade (HENKEL RESEARCH CORPORATION, 1993).

3.3.3 Deleção do segundo alelo do gene ura3 e super expressão da XR

Com base nos resultados prévios, os transformantes obtidos (cepas 1, 7 e 10) foram considerados inapropriados para serem utilizados nas etapas subsequentes de modificação genética propostas no presente trabalho, uma vez que a marca auxotrófica para uracila e uridina não foi obtida com sucesso. Assim, considerou-se a possibilidade de submeter as cepas obtidas a uma segunda etapa de transformação, com o intuito de deletar o segundo alelo do gene *ura3*. Para tanto, foi definida a utilização de um cassete diferente ao cURA3 empregado na primeira transformação, o qual foi denominado pXR e composto pelo pGAPDH e a região codificante e terminadora do gene *xyl1*, que codifica a enzima XR, flanqueados pelas regiões *upstream* e *downstream* do gene *ura3*, conforme esquema da Figura 3.7. Desta forma, esperava-se que o segundo alelo do gene *ura3* fosse substituído com o gene *xyl1* sob controle do pGAPDH, considerando que a super expressão da XR é uma das estratégias de engenharia da via metabólica propostas no presente projeto para melhoria da conversão de xilose em xilitol por *C. tropicalis*.

Figura 3.7 - Esquema da transformação de *C. tropicalis* para deleção do gene *ura3* e super expressão da XR com o cassete pXR.

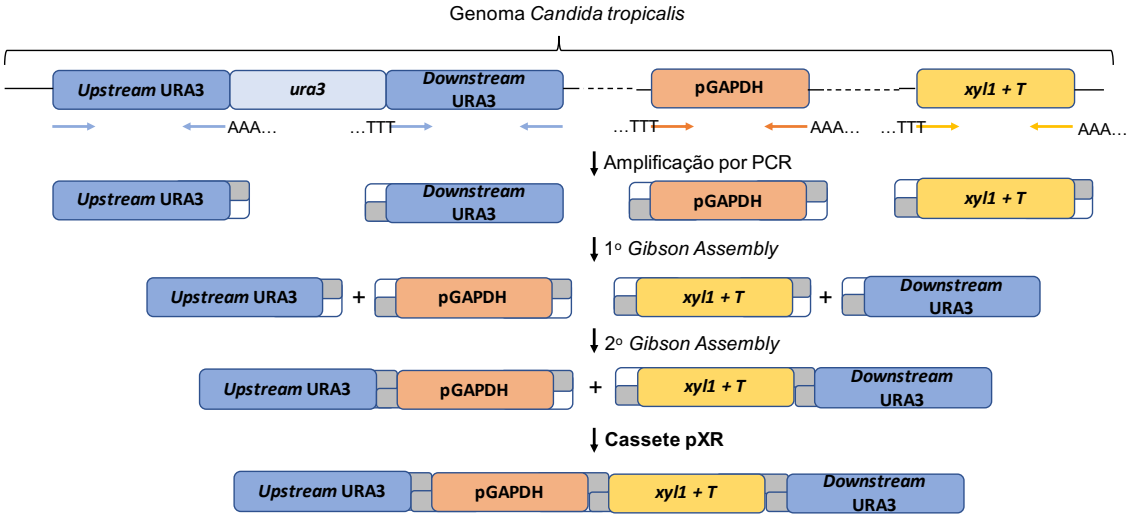


Upstream* URA3:** região *upstream* do gene *ura3* entre 1 e 1000 nucleotídeos antes da trinca de início do gene (1 kb); **pGAPDH:** promotor do gene *gapdh* (1,1 kb)**; *xyl1* + *T*:** região codificante e terminadora do gene *xyl1* (1,58 kb); ***Downstream* URA3:** região *downstream* do gene *ura3* entre 1 e 1000 nucleotídeos após a trinca de parada do gene (1 kb). ***ura3: região codificante do gene *ura3.*
Fonte: Arquivo próprio

O cassete pXR foi construído por montagem sequencial dos fragmentos amplificados por PCR mediante a técnica *Gibson Assembly*, conforme apresentado no esquema da Figura 3.8. Assim como indicado na construção do cassete cURA3 (Figura 3.3), foram aproveitadas regiões de homologia poliA e poliT inseridas nas regiões 3' e 5', respectivamente, de fragmentos adjacentes, para realização da montagem. É importante destacar que a

construção do cassete pXR representou um desafio maior que o do cURA3, uma vez que neste caso foram utilizados um maior número de fragmentos na montagem (4) e resultou em um cassete de maior tamanho (4,7 kb). A este respeito, é importante mencionar que a eficiência da técnica de *Gibson Assembly* diminui em função do número de fragmentos a serem montados e o tamanho da construção (NEW ENGLAND BIOLABS, 2018), apesar que já foi demonstrada sua utilidade para a montagem de cassetes com tamanhos de até aproximadamente 583 kb (GIBSON et al., 2009).

Figura 3.8 - Esquema da construção do cassete pXR por montagem sequencial dos fragmentos.

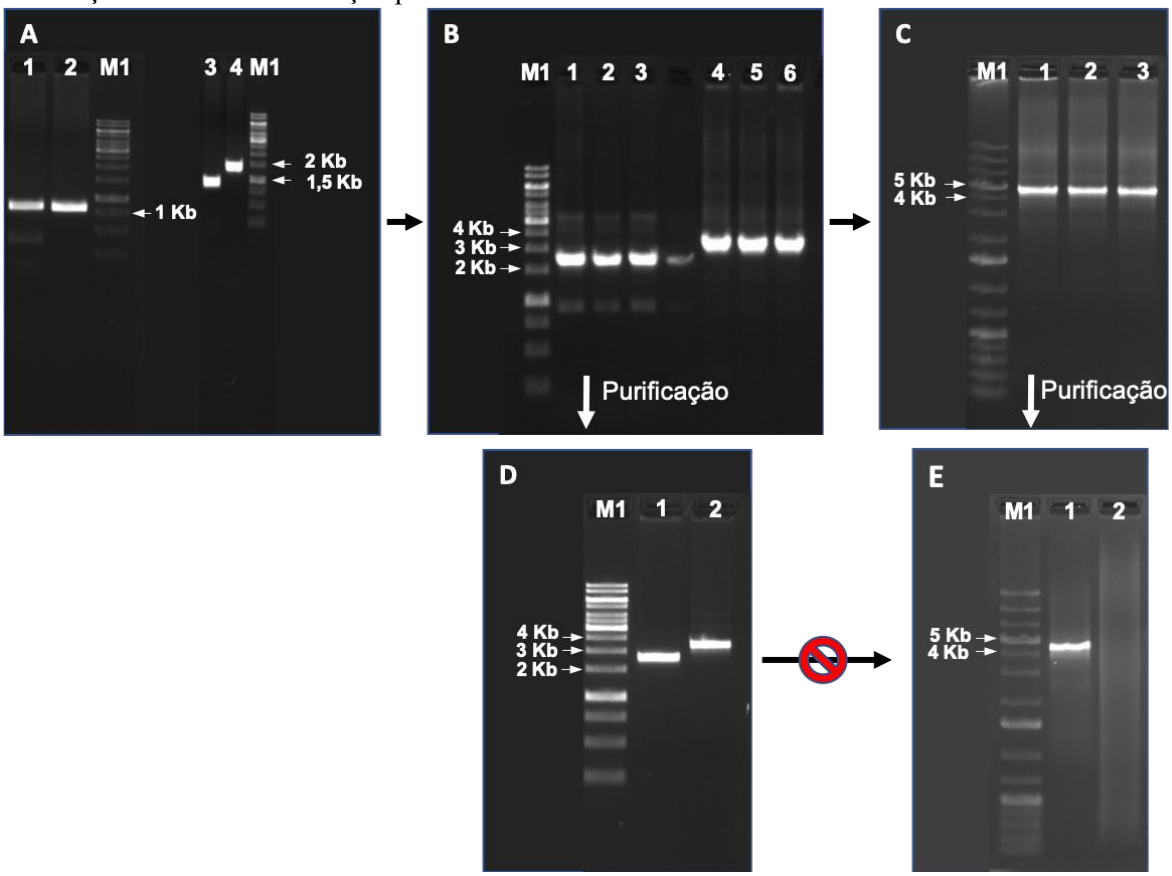


***Upstream* URA3:** região *upstream* do gene *ura3* entre 1 e 1000 nucleotídeos antes da trinca de início do gene (1 kb); **pGAPDH:** promotor do gene *gapdh* (1,1 kb)**; *xyl1* + *T*:** região codificante e terminadora do gene *xyl1* (1,58 kb); ***Downstream* URA3:** região *downstream* do gene *ura3* entre 1 e 1000 nucleotídeos após a trinca de parada do gene (1 kb).
Fonte: Arquivo próprio

Na Figura 3.9 são apresentados os resultados da construção sequencial do cassete pXR, correspondente à amplificação e montagem sequencial dos fragmentos. Conforme indicado no item 3.2.1.7, após a reação de *Gibson*, o produto desta foi utilizado como *template* para reação de PCR com o intuito de amplificar o fragmento montado usando as sequências iniciadoras correspondentes. Como pode ser observado na Figura 3.9B, linhas 1-3 e 4-6, o PCR resultou na amplificação não só do fragmento de interesse, mas também de fragmentos interferentes não identificados de diversos tamanhos. Estes fragmentos interferentes poderiam corresponder a reações de montagem e/ou de amplificação não específicas, derivadas da presença de contaminantes como sequências iniciadoras ou inclusive fragmentos não montados. Adicionalmente, foi considerado que o emprego de

caudas poliA e poliT como regiões de homologia entre fragmentos adjacentes para a reação de *Gibson* poderia favorecer a amplificação dos produtos inespecíficos na reação de PCR.

Figura 3.9 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos fragmentos e montagens sequenciais para construção do cassete de deleção pXR.



M1: Marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder 1 Kb plus
A) Linha 1: *upstream* do gene *ura3*; **Linha 2:** *downstream* do gene *ura3*; **Linha 3:** pGAPDH; **Linha 4:** gene *xyl1*.
B) Linhas 1-3: Montagem do *upstream* do gene *ura3* e pGAPDH; **Linhas 4-6:** Montagem do gene *xyl1* e *downstream* do gene *ura3*.
C) Linhas 1-3: Cassete pXR completo.
D) Linha 1: Purificação da montagem do *upstream* do gene *ura3* e pGAPDH; **Linha 2:** Purificação da montagem do gene *xyl1* e *downstream* do gene *ura3*.
E) Linha 1: Purificação do cassete pXR completo; **Linha 2:** Tentativa de amplificação do cassete pXR após purificação.
Fonte: Arquivo próprio

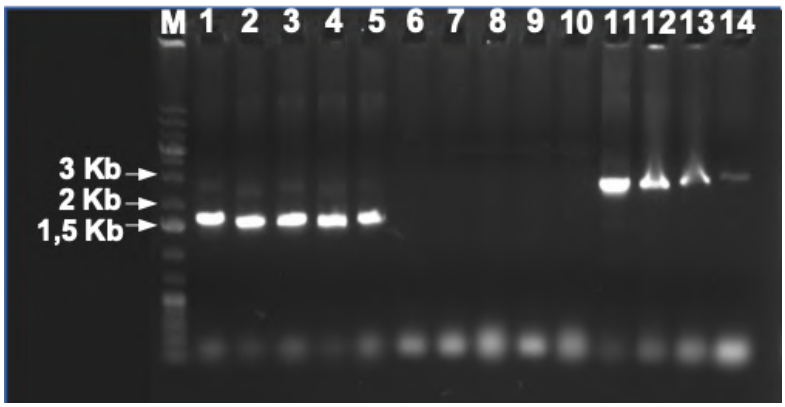
Com o intuito de eliminar os produtos interferentes amplificados, foi empregado o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System® para purificar o fragmento de interesse a partir da banda correspondente no gel de eletroforese, conforme apresentado no item 3.2.1.6. Entretanto, a purificação foi considerada não satisfatória, uma vez que o emprego dos fragmentos purificados (Figura 3.9D, linhas 1 e 2, e E linha 1) como *template* para

amplificação por PCR ou para reação de *Gibson* não permitiu resultados positivos nestes procedimentos, conforme apresentado na Figura 3.9E linha 2.

Ainda com o objetivo de reduzir a amplificação de fragmentos interferentes, foi avaliada também a modificação de condições de PCR para amplificação do produto da reação de *Gibson*, quanto à concentração do *template* e a temperatura e tempo de extensão. A aplicação destas alterações não modificou o perfil de amplificação, mantendo a presença de fragmentos inespecíficos. Foram também feitos controle das reações de PCR a partir da utilização do *Master Mix* sem *template*, sendo verificada a ausência de bandas após PCR e eletroforese, demonstrando que os fragmentos não específicos não correspondiam a contaminação das reações de PCR. Assim, o cassete pXR completo foi construído a partir de fragmentos montados com presença de bandas interferentes (Figura 3.9B). O produto de PCR do cassete pXR completo apresentou também fragmentos interferentes, além daquele correspondente ao tamanho de interesse (4,7 kb), conforme apresentado na Figura 3.9C.

A cepa 1, previamente transformada, foi selecionada como hospedeira para a transformação por eletroporação com emprego do cassete pXR. Conforme mencionado previamente (final do item 3.3.2), o meio YPD foi substituído pelo meio YNB, o qual foi suplementado com uracila (5 mM), uridina (10 mM), sorbitol (1 M) e 5-FOA (1 gL^{-1}), para seleção das colônias transformantes. As placas inoculadas com o produto da transformação da levedura apresentaram crescimento massivo após 48 h, no entanto, foi possível a seleção de 4 colônias isoladas. A partir destas colônias foi realizada a verificação genotípica da transformação, cujos resultados são apresentados na Figura 3.10.

Figura 3.10 - Verificação genotípica da transformação da cepa 1 de *C. tropicalis* para deleção do segundo alelo do gene *ura3* e inserção da construção pGAPDH-*xyl1*.



M1: Marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder 1 Kb plus
Linha 1: Gene *ura3* em *C. tropicalis* selvagem; **Linhas 2-5:** Gene *ura3* nas cepas transformantes; **Linha 6:** Construção pGAPDH-*xyl1* em *C. tropicalis* selvagem; **Linhas 7-10:** Construção pGAPDH-*xyl1* nas cepas transformantes; **Linha 11:** Região entre *upstream* e *downstream* do gene *ura3* em *C. tropicalis selvagem*; **Linhas 12-14:** Região entre *upstream* e *downstream* do gene *ura3* nas cepas transformantes.
Fonte: Arquivo próprio

A verificação genotípica correspondeu à amplificação da região codificante e terminador do gene *ura3*, da construção constituída pelo pGAPDH e a região codificante e terminador do *xyl1*, e da região completa compreendida pelas regiões *upstream* e *downstream* do gene *ura3* (Figura 3.10). Os resultados obtidos demonstraram a presença do gene *ura3* nas cepas transformantes, tanto pela amplificação específica do gene com tamanho próximo a 1,5 kb (linhas 2-5 da Figura 3.10), bem como pela amplificação de fragmentos de 2,8 kb na região compreendida pelas regiões *upstream* e *downstream* (linhas 12-14 da Figura 3.10). Adicionalmente, não houve amplificação da construção do pGAPDH e o *xyl1* (linhas 7-10 da Figura 3.10) nas cepas transformantes. Assim, apesar do crescimento das colônias na presença de 5-FOA, a transformação foi considerada insatisfatória.

Diversas alternativas podem ser consideradas para explicar os resultados obtidos nas estratégias empregadas para transformação de *C. tropicalis*. Primeiramente, é possível que a transformação da cepa 1 tenha sido ineficiente no que se refere à inserção do cassete de deleção pXR na célula e/ou sua integração no *locus* do gene *ura3*. Uma das possibilidades a este respeito é a utilização do cassete pXR não purificado. Pode ser também considerado que a eficiência da transformação também está relacionada com o sítio de integração do cassete no genoma da levedura, uma vez que esta pode acontecer de forma homóloga, isto é, no *locus* de interesse determinado pelas regiões de homologia incluídas no cassete, ou de forma não-homóloga ou ilegítima (*Non-homologous End Joining* – NHEJ), na qual a integração ocorre de maneira aleatória (KLINNER; SCHAFER, 2004; JANG et al., 2018). No caso de

C. tropicalis, Mancera et al. (2019) reportaram que a integração homóloga do cassete no *locus alvo* foi eficiente quando usadas regiões de homologia de tamanho de aproximadamente 900 pb, enquanto que a NHEJ era dominante quando estas regiões eram curtas (65 pb). Previamente, Klinner e Schafer (2004) relataram que a eficiência de integração homóloga em *C. tropicalis* aumentava proporcionalmente com o incremento do tamanho das regiões de homologia. Assim, é possível considerar que a probabilidade de ocorrer integração homóloga do cassete testado no presente trabalho seria maior do que a de não homóloga, uma vez que foram usadas regiões de 1000 pb.

Uma segunda alternativa para a não verificação da deleção do gene *ura3* pode ser considerada assumindo que a integração homóloga do cassete pXR ocorreu efetivamente, porém este poderia ter sido integrado tanto no *locus* do segundo alelo ainda não modificado bem como no primeiro já modificado na primeira transformação. Caso isto tivesse ocorrido, esperava-se que a construção pGAPDH-*xyl1* pudesse ser amplificada a partir do gDNA das transformantes, o qual não foi possível, conforme mencionado anteriormente. Assim, é possível considerar que a existência naturalmente no genoma de *C. tropicalis* de sítios não próximos de anelamento para as sequências iniciadoras empregadas nesse teste (pGAPDH *forward* e *xyl1 reverse*) poderia resultar em resultados falsos negativos durante a amplificação da construção de interesse. A este respeito, é importante destacar que Fonzi e Irwin (1993) relataram que, para a detecção por PCR de fragmentos recombinantes derivados de eventos de integração homóloga de baixa frequência, sequências iniciadoras específicas para uma região encontrada apenas no vetor e outra para o *locus* alvo da integração poderiam ser empregadas, de forma que a amplificação fosse positiva só se houvesse integração efetiva do DNA transformante, o que faz com que as regiões a serem amplificadas fiquem próximas.

Caso a integração do cassete pXR tivesse sido positiva, pode ser considerado também que o meio empregado para seleção poderia não ter exercido pressão suficiente para promover o crescimento apenas das células cujos dois alelos fossem modificados. Isto poderia ser devido a uma concentração de 5-FOA não apropriada considerando que a cepa hospedeira previamente transformada já era capaz de crescer na presença de 1 gL^{-1} deste composto no meio YNB, produto da primeira transformação realizada com o cassete cURA3, conforme apresentado na Tabela 3.4. Foi considerado também que a composição nutricional do meio YNB não estaria favorecendo o processo de seleção das cepas transformantes com auxotrofia à uracila. A este respeito, na literatura relacionada com o

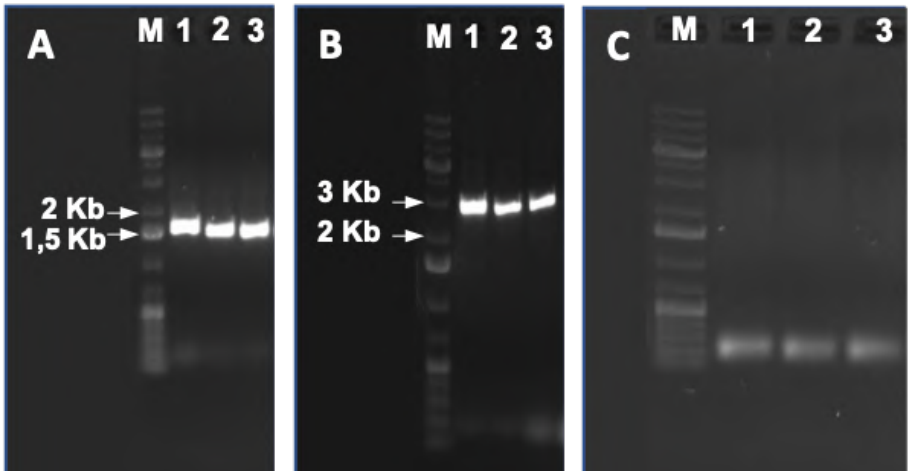
presente trabalho é convencionalmente empregado o YNB (*Yeast Nitrogen Base)*, porém, sem adição de aminoácidos, correspondente apenas a vitaminas, sais minerais e sulfato de amônio (KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006; JEON et al., 2012; AHMAD et al., 2012). Assim, optou-se pela utilização do meio YNB sem aminoácidos (YNBs) na etapa de cultivo para seleção de transformantes. Foi realizada a determinação do CIM de 5-FOA para a cepa selvagem de *C. tropicalis*, encontrando-se inibição do crescimento com uma concentração de 0,6 gL^{-1}, a qual é menor à determinada para os meios YPD e YNB (0,8 gL^{-1}).

Com base nos resultados obtidos e considerações apresentadas, uma estratégia adicional foi sugerida para a transformação da cepa 1 de *C. tropicalis* com aproveitamento do cassete pXR já construído. Neste caso foi considerada a eliminação dos fragmentos interferentes não específicos do produto de PCR mediante purificação da banda no gel de eletroforese correspondente ao produto de interesse. A este respeito, é importante indicar que a utilização do fragmento purificado correspondente ao tamanho esperado para o cassete pXR como *template* para PCR não resultou em amplificação positiva, no entanto, decidiu-se testar sua utilidade na transformação da cepa 1. Paralelamente, o cassete pXR não purificado foi novamente empregado para transformação da levedura. Além disso, a cepa selvagem de *C. tropicalis* foi utilizada como hospedeira da transformação com o cassete pXR não purificado com o intuito de comparar o resultado com o da cepa 1.

Apresentou-se crescimento massivo nas placas de transformação da cepa 1, independente do emprego do cassete pXR purificado ou não, não sendo possível a seleção de colônias isoladas. Portanto, cultivos de isolamento por esgotamento foram realizados no mesmo meio. Entretanto, neste caso o crescimento foi reduzido, sendo possível apenas a seleção de uma colônia isolada da cepa 1 transformada com o cassete pXR purificado para verificação genotípica. Já no caso da transformação da cepa selvagem de *C. tropicalis* com o cassete pXR não purificado, o crescimento foi verificado apenas após 144 h de cultivo, sendo selecionada 1 colônia isolada para a verificação genotípica, a qual foi denominada cepa A1.

Na Figura 3.11A são apresentados os resultados da verificação genotípica das cepas transformantes 1 e A1 (derivada da cepa selvagem), a qual foi realizada da mesma forma que na transformação anterior, ou seja, mediante amplificação da região codificante e terminador do gene *ura3* (Figura 3.11A), da região completa compreendida pelas regiões *upstream* e *downstream* do gene *ura3* (Figura 3.11B), e da construção constituída pelo pGAPDH e a região codificante e terminador do *xyl1* (Figura 3.11C).

Figura 3.11 - Verificação genotípica da segunda transformação da cepa 1 de *C. tropicalis* e da cepa selvagem (A1) para deleção do gene *ura3* e inserção da construção pGAPDH-*xyl1*.



M: Marcador de peso molecular GeneRuler DNA Ladder 1 Kb plus
A) Linha 1: *Gene ura3* em *C. tropicalis* selvagem; **Linha 2:** Gene *ura3* na cepa transformante 1; **Linha 3:** Gene *ura3* na cepa transformante A1.
B) Linha 1: Região entre *upstream* e *downstream* do gene *ura3* em *C. tropicalis selvagem*; **Linha 2:** Região entre *upstream* e *downstream* do gene *ura3* na cepa transformante 1; **Linha 3:** Região entre *upstream* e *downstream* do gene *ura3* na cepa transformante A1.
Fonte: Arquivo próprio

Similar ao constatado nas transformações prévias, os resultados na Figura 9 indicam a presença do gene *ura3* no genoma das cepas transformados (Figura 3.11A e B), bem como a ausência da construção pGAPDH-*xyl1* (Figura 3.11C). Assim, as estratégias implementadas para construção de uma cepa de *C. tropicalis* auxotrófica a uracila mediante deleção do gene *ura3* não foram satisfatórias. Entretanto, considera-se a possibilidade de que um dos alelos do gene tenha sido deletado, afetando a expressão do mesmo de forma a causar a modificação fenotípica que permitiu o crescimento na presença de 5-FOA em concentrações superiores ao CIM.

Baseado nos resultados obtidos nas transformações realizadas, nas considerações feitas previamente, e na revisão aprofundada da literatura relacionada, na Tabela 3.5 são elencadas as possíveis causas para os resultados não satisfatórios de transformação e as ações para contornar esses problemas. Com base nas ações indicadas nesta tabela, implementou-se a estratégia de deleção sequencial dos alelos do gene *ura3* e super expressão das enzimas G6PDH e da XR.

Tabela 3.5 - Possíveis causas para resultados não satisfatórios de transformação de *C. tropicalis* para deleção do gene *ura3* e ações adotadas para contorna-las.

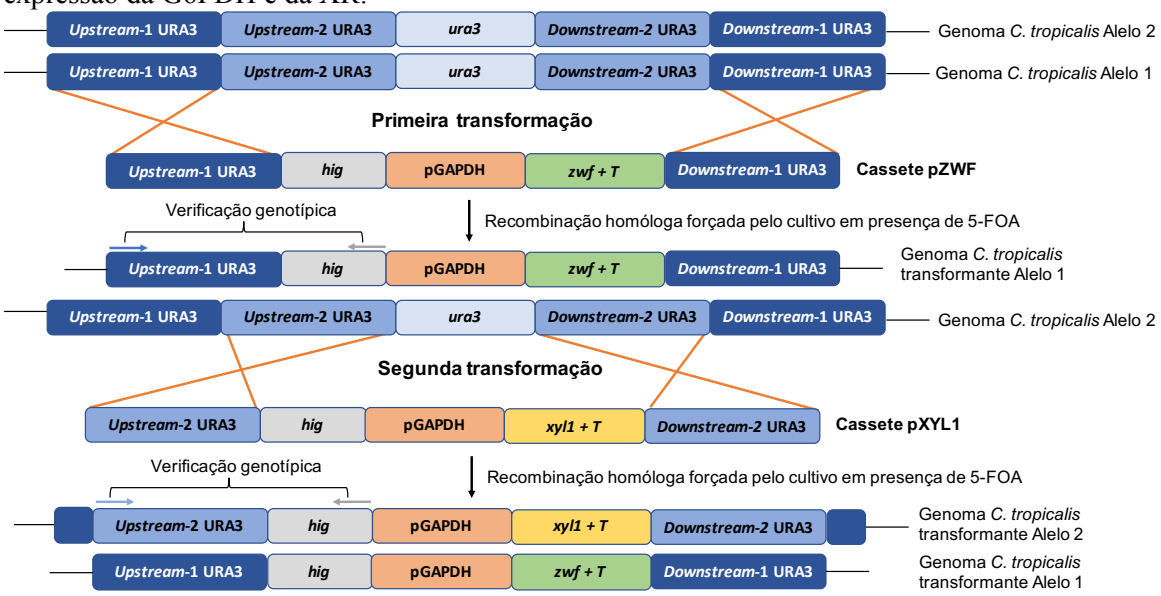
Causa	**Ação**
Uso de cassetes de deleção não satisfatoriamente purificados, isto é, com presença de fragmentos não específicos. Esta ocorrência pode estar relacionada com a utilização de regiões de homologia não específicas baseadas em caudas poliA e poliT.	Adopção de regiões de homologia específicas de 15-20 nucleotídeos entre fragmentos adjacentes para construção do cassete. Para tanto, sequências de 15-20 nucleotídeos iguais à região 3' de um fragmento foram incluídos na sequência iniciadora *forward* do fragmento adjacente, conforme esquema apresentado na Figura 3.13. Adicionalmente, aprimorou-se o protocolo de purificação de bandas de interesse no gel de eletroforese, com base na literatura, resultando na definição do protocolo modificado apresentado no item 3.2.1.6.
Emprego de quantidades insuficientes de DNA transformante, uma vez que nas transformações realizadas foi possível utilizar em média 0,8 µg, sendo que em protocolos de eletroporação é sugerido convencionalmente o emprego de no mínimo 1 µg (KLINNER; SCHAFER, 2004; MANCERA et al., 2019).	Realização de maior número de reações de amplificação do cassete completo e purificado, de forma a acumular quantidade de DNA transformante de no mínimo 1 µg no preparo da eletroporação, baseado no trabalho de Mancera et al. (2019) com *C. tropicalis* e a revisão de Klinner e Schafer (2004).
Eficiência não satisfatória de eletroporação, o que poderia estar relacionado com o emprego de condições pré-estabelecidas no equipamento para *Candida albicans* e não para *C. tropicalis*;	Adoção das condições de eletroporação otimizadas para *C. tropicalis* por Rohrer e Picattagio (1992).
Número insuficiente de colônias isoladas selecionadas para verificação genotípica e fenotípica, considerando uma possível baixa eficiência de transformação. Isto no caso dos experimentos no qual houve crescimento massivo após a transformação.	Adoção do protocolo de verificação genotípica de cepas transformantes mediante PCR de colônia, de forma a facilitar a avaliação de um maior número de colônias. Isto com o intuito de eliminar a necessidade de cultivo líquido das colônias isoladas para extração de gDNA, o qual é usado posteriormente como *template* nas reações de PCR, procedimento laborioso para fazer com um número elevado de colônias.
Assumindo que houve integração eficaz do cassete de deleção empregado, esta pode ter acontecido no mesmo *locus* já previamente modificado, ou, caso a integração se apresentasse também no *locus* ainda não modificado, não foi possível a seleção de cepas com deleção dos dois alelos do gene *ura3*.	Emprego de dois cassetes diferentes para deleção dos dois alelos do gene *ura3*, conforme esquema apresentado Figura 3.12. O desenho diferenciado dos cassetes permite o direcionamento destes para regiões diferentes de recombinação homóloga, de forma a evitar a re-transformação do mesmo alelo com o segundo cassete. Esta estratégia foi baseada nos trabalhos de Ko, Kim, J. e Kim, J.H. (2006) e Jeon et al. (2012).
Resultados falsos negativos quanto à verificação genotípica por PCR da inserção da construção pGAPDH-*xyl1*. Mesmo se houve integração homóloga positiva desta construção no *locus* desejado, a amplificação desta poderia ser mascarada pela possibilidade que as sequências iniciadoras empregadas anelassem nos *locus* do pGADPH e do *xyl1* naturalmente existentes no genoma da levedura.	Inserção de uma sequência de DNA exógeno no cassete de deleção, conforme apresentado no esquema da Figura 3.13. Esta sequência exógena permite a verificação genotípica da integração do cassete no *locus* desejado sem a possibilidade de resultados falsos negativos, uma vez que esta sequência seria amplificada só no caso da integração positiva do cassete (KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006; JEON et al., 2012).
Meio de cultura não exerceu pressão de seleção apropriada para favorecer o crescimento apenas das células com deleção dos dois alelos do gene *ura3*.	Avaliação de concentrações de 5-FOA até 4 vezes maiores ao CIM determinado para o YNBs, correspondente a 1,2, 1,8 e 2,4 gL^{-1}.

Fonte: Arquivo próprio

3.3.4. Deleção sequencial dos alelos do gene ura3 e super expressão da G6PDH e XR

Foram desenhados dois cassetes diferenciados para deleção sequencial dos dois alelos do gene *ura3* mediante substituição com os genes *zwf*, que codifica para a enzima G6PDH, e *xyl1,* que codifica para a XR, respectivamente, e ambos sob controle do pGAPDH, conforme apresentado na Figura 3.12. A principal diferença dos dois cassetes correspondeu ao sítio de integração no *locus* do gene *ura3*, desenhado com o intuito que na segunda transformação o alvo do cassete a ser empregado só fosse o alelo do gene *ura3* não modificado durante a primeira transformação. Para tanto, a região no genoma entre as duas sequências de homologia (*Upstream*-1 e *Downstream*-1 URA3) do primeiro cassete, denominado pZWF, incluía não só o gene *ura3*, mas também as duas sequências de homologia (*Upstream*-2 e *Downstream*-2 URA3) do segundo cassete, denominado pXYL1 (Figura 3.12). A substituição desta região pela construção no cassete pZWF implicaria a eliminação das sequências de homologia do cassete pXYL1, o qual, portanto, poderia se integrar apenas no alelo que permanecesse inalterado após a primeira transformação. Uma estratégia similar foi empregada por Ko, Kim, J. e Kim, J.H. (2006) para a transformação sequencial dos dois alelos do gene *xyl2* (que codifica a XDH) de *C. tropicalis* usando o método de *ura3-blasting*, conforme apresentado na Figura 7A.

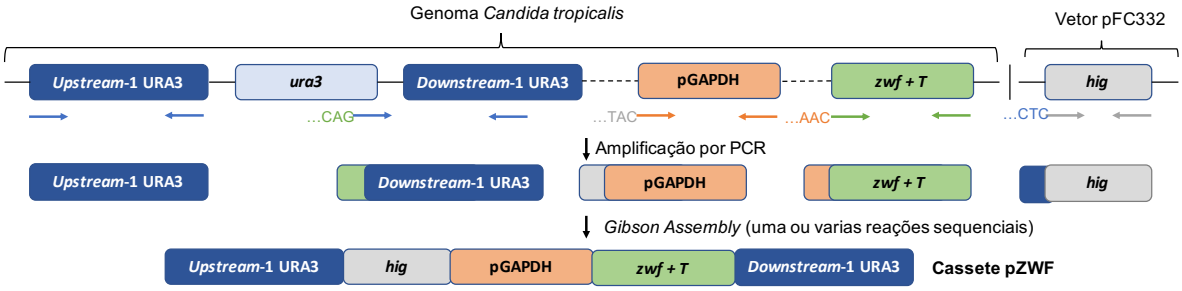
Figura 3.12 - Esquema da estratégia para deleção sequencial dos alelos do gene *ura3* e super expressão da G6PDH e da XR.



Upstream*-1 URA3:** região *upstream* do gene *ura3* entre 1000 e 2000 nucleotídeos antes da trinca de início do gene (1 kb); ***Upstream*-2 URA3:** região *upstream* do gene *ura3* entre 1 e 1000 nucleotídeos antes da trinca de início do gene (1 kb); ***hig: Fragmento parcial do gene *higromicina* (0,5 kb); **pGAPDH:** promotor do gene *gapdh* (1,5 kb)**;** ***zwf* + *T*:** região codificante e terminadora do gene *zwf* (2 kb); ***xyl1* + *T*:** região codificante e terminadora do gene *xyl1* (1,58 kb); ***Downstream*-1 URA3:** região *downstream* do gene *ura3* entre 1000 e 2000 nucleotídeos após a trinca de parada do gene (1 kb); ***Downstream*-2 URA3:** região *downstream* do gene *ura3* entre 1 e 1000 nucleotídeos após a trinca de parada do gene (1 kb).
Fonte: Arquivo próprio

Nesta etapa inicialmente foi realizada a montagem do cassete pZWF para de deleção do primeiro alelo do gene *ura3* e super expressão da G6PDH. A construção do cassete consistiu na amplificação dos fragmentos a partir do gDNA de *C. tropicalis* e a posterior montagem dos mesmos pela técnica de *Gibson Assembly*, conforme esquematizado na Figura 3.13. É importante destacar que no desenho dos dois cassetes a serem usados sequencialmente, o pZWF e pXYL1, foi incluído um fragmento parcial de 0,5 kb do gene de resistência a higromicina (*hig*), o qual pode ser amplificado a partir do vetor pFC332 (NØDVIG et al., 2015). Conforme mencionado na Tabela 3.5, este fragmento corresponde a uma sequência exógena não existente naturalmente no genoma de *C. tropicalis*, pelo qual pode ser utilizada para a verificação genotípica da integração do cassete no sítio desejado no genoma após a transformação.

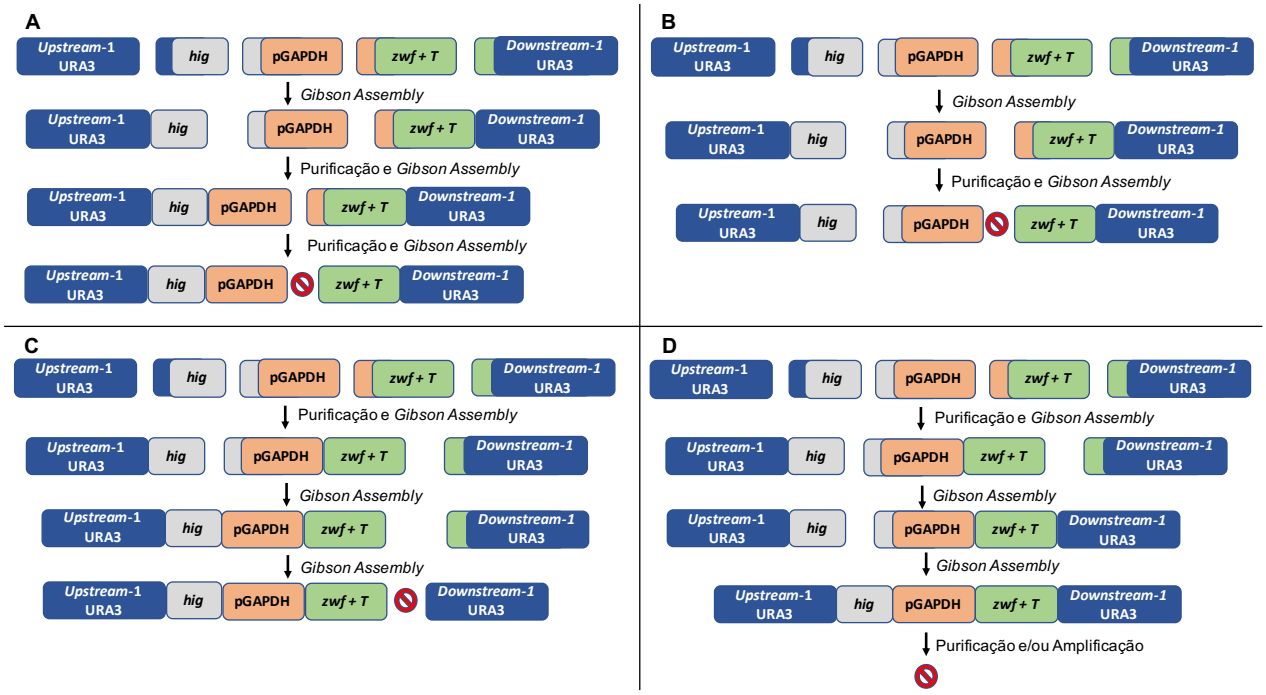
Figura 3.13 - Esquema da construção do cassete pZWF por montagem sequencial dos fragmentos.



Upstream*-1 URA3:** região *upstream* do gene *ura3* entre 1000 e 2000 nucleotídeos antes da trinca de início do gene (1 kb); ***hig: Fragmento parcial do gene *higromicina* (0,5 kb); **pGAPDH:** promotor do gene *gapdh* (1,5 kb)**; *zwf* + *T*:** região codificante e terminadora do gene *zwf* (2 kb); ***Downstream*-1 URA3:** região *downstream* do gene *ura3* entre 1000 e 2000 nucleotídeos após a trinca de parada do gene (1 kb).
Fonte: Arquivo próprio

A construção completa do cassete pZWF por montagem de todos os fragmentos constituintes em uma única reação de *Gibson Assembly* não foi possível. Este resultado pode ser devido ao fato que as regiões específicas de homologia entre os fragmentos adjacentes eram de apenas 15-20 nucleotídeos, sendo que o fabricante recomenda entre 30-40 nucleotídeos quando a reação de *Gibson* é feita com mais de 3 fragmentos (NEW ENGLAND BIOLABS INC., 2018). Assim, foi realizado a montagem sequencial dos fragmentos a partir de reações compostas por dois destes, sendo avaliados diferentes caminhos, no que se refere à ordem de montagem dos fragmentos e à purificação dos mesmos, conforme apresentado na Figura 3.14. A ordem em que os fragmentos são montados demostrou afetar a eficiência da reação de *Gibson*, assim como a qualidade dos produtos obtidos, devido à presença de fragmentos interferentes, principalmente quando pelo menos um dos fragmentos a ser montado tinha tamanho igual ou maior a 3 kb.

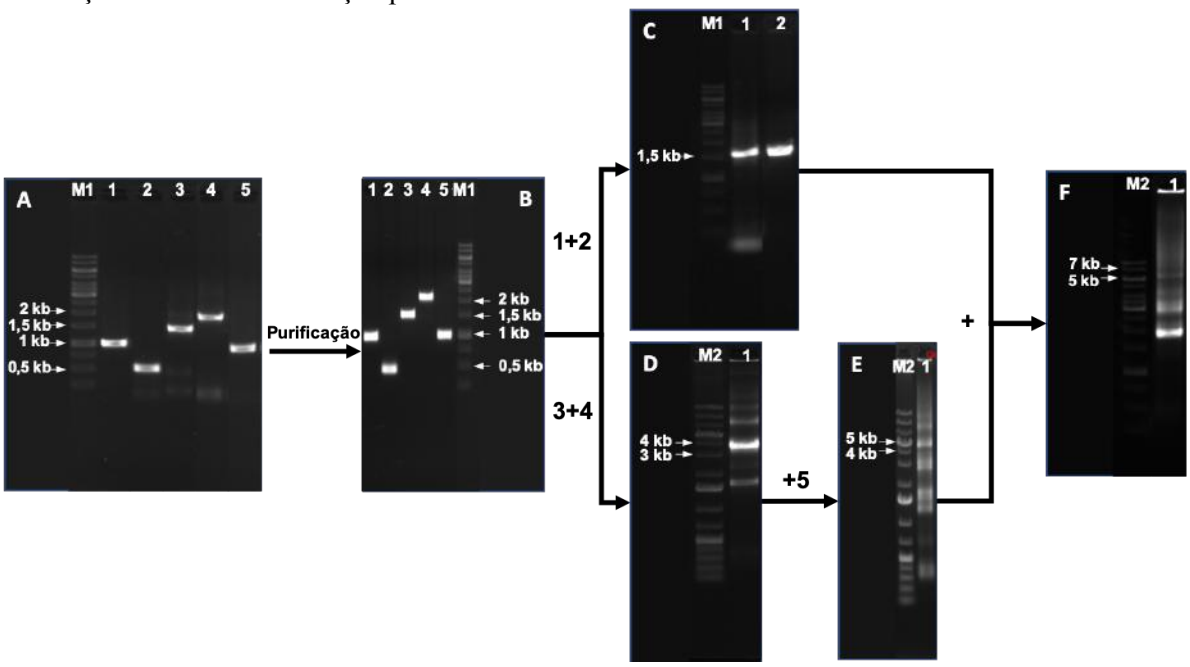
Figura 3.14 - Caminhos avaliados para a construção do cassete pZWF.



Upstream*-1 URA3:** região *upstream* do gene *ura3* entre 1000 e 2000 nucleotídeos antes da trinca de início do gene (1 kb); ***hig: Fragmento parcial do gene *higromicina* (0,5 kb); **pGAPDH:** promotor do gene *gapdh* (1,5 kb)**; *zwf* + *T*:** região codificante e terminadora do gene *zwf* (2 kb); ***Downstream*-1 URA3:** região *downstream* do gene *ura3* entre 1000 e 2000 nucleotídeos após a trinca de parada do gene (1 kb).
Fonte: Arquivo próprio

O caminho apresentado no esquema da Figura 3.14D permitiu a montagem de todos os fragmentos do cassete pZWF, conforme verificado na Figura 3.15, porém, a banda correspondente ao tamanho esperado para este cassete (aproximadamente 6 kb) foi tênue em comparação com outras bandas no gel, correspondentes a amplificações não específicas (Figura 3.15F). Não foi possível a purificação da banda de interesse, provavelmente pela baixa concentração deste fragmento no produto de PCR. A re-amplificação por PCR do fragmento de interesse usando como *template* os produtos da reação de *Gibson* ou da PCR inicial também não teve resultados positivos. Assim, o cassete pZWF construído foi considerado insatisfatório, pelo qual não foi possível realizar a transformação da levedura seguindo a estratégia apresentada na Figura 3.12.

Figura 3.15 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos fragmentos e montagens sequenciais para construção do cassete de deleção pZWF.



M1: Marcador de massa molar GeneRuler DNA Ladder 1 kb
M2: Marcador de massa molar GeneRuler DNA Ladder 1 kb plus.
A) Amplificação dos fragmentos iniciais: Linha 1: *upstream* do gene *ura3* (1 kb); **Linha 2:** fragmento parcial do gene *higromicina* (*hig)* (0,5 kb); **Linha 3:** pGAPDH (1,5 kb); **Linha 4:** região codificante e terminadora do gene *zwf* (2 kb); **Linha 5:** *downstream* do gene *ura3* (1 kb).
B) Purificação dos fragmentos amplificados: Linha 1: *upstream* do gene *ura3* (1 kb); **Linha 2:** fragmento parcial do gene *higromicina* (*hig)* (0,5 kb); **Linha 3:** pGAPDH (1,5 kb); **Linha 4:** região codificante e terminadora do gene *zwf* (2 kb); **Linha 5:** *downstream* do gene *ura3* (1 kb).
C) Produto amplificado da montagem dos fragmentos *upstream* do gene *ura3* e parcial do gene *higromicina* (*hig),* denominado Gibson1 (1,5 kb): **Linha 1:** Amplificação do fragmento montado; **Linha 2:** Purificação do fragmento amplificado.
D) Linha 1: Produto amplificado da montagem dos fragmentos pGAPDH e região codificante e terminadora do gene *zwf*, denominado Gibson2 (3,5 kb).
E) Linha 1: Produto amplificado da montagem dos fragmentos Gibson2 e *downstream* do gene *ura3* (4,5 kb), denominado Gibson3.
F) Linha 1: Produto amplificado da montagem dos fragmentos Gibson1 e Gibson3, correspondente ao cassete pZWF (6 kb).
Fonte: Arquivo próprio

Contudo, os caminhos avaliados para construção do cassete pZWF permitiram identificar que a purificação dos fragmentos iniciais favoreceu a eficácia das primeiras reações de *Gibson* e a qualidade dos produtos obtidos, conforme apresentado na Figura 3.15A, B e C. No entanto, a purificação de fragmentos de tamanhos maiores ou iguais a 3 kb derivados de reações de *Gibson* não resultou satisfatória, sendo necessária a continuação das reações de *Gibson* com os produtos não purificados, como exemplificado na Figura 3.15D, E e F. Constata-se também nesta figura que a utilização de regiões de homologia específicas de 15-20 nucleotídeos entre os fragmentos adjacentes montados não evitou amplificações não específicas, sendo obtidos perfis de amplificações similares aos já

conseguidos quando usadas regiões de homologia inespecíficas de poliA e poliT (Figura 3.9). As amplificações não específicas se apresentaram principalmente quando os fragmentos a serem montados superavam o tamanho de 1,5 kb, a exemplo do pGAPDH (1,5 kb) e o *zwf* (2 kb), como pode ser verificado na Figura 3.15D, E e F.

Considerou-se que a razão dos resultados insatisfatórios na construção do cassete pZWF poderia ser que as regiões específicas de homologia entre fragmentos adjacentes foram curtas em função do tamanho e número de fragmentos montados. Assim, foi proposto para os trabalhos posteriores de continuação do presente projeto, o desenho de sequências iniciadoras com regiões especificas de homologia de no mínimo 30 nucleotídeos. Adicionalmente, sugere-se a utilização do software NEBuilder® *Assembly Tool*, próprio do fabricante do *Gibson Assembly Master Mix* (NEW ENGLAND BIOLABS, 2019), para o desenho das sequências iniciadoras para amplificação dos fragmentos.

3.4 Conclusão

Diversas estratégias foram implementadas para o desenvolvimento de uma cepa de *C. tropicalis* auxotrófica para uridina, para ser empregada como marca de seleção. Inicialmente, a transformação da levedura por eletroporação com o cassete cURA3, constituído apenas pelas regiões franqueadoras deste gene, resultou no crescimento de colônias no meio de seleção com presença de 5-FOA, o qual sugeriu a deleção do gene *ura3*. No entanto, a verificação genotípica das cepas transformantes demonstrou a presença deste gene, enquanto que uma verificação fenotípica mais detalhada mostrou que as cepas transformantes não apresentavam auxotrofia a uridina, porém capacidade de crescer na presença de 5-FOA. Este resultado foi associado com a possível deleção de um dos alelos do *ura3*, considerando que *C. tropicalis* é diploide. Portanto, tentou-se a deleção do segundo alelo em uma das cepas transformantes, simultaneamente com a super expressão do gene *xyl1*, que codifica para XR, sob controle do promotor constitutivo forte pGAPDH, para substituição gênica do *ura3*, porém novamente sem resultados positivos.

Várias considerações foram elencadas quanto as possíveis razões para o insucesso das transformações, dentre as que se destacam a necessidade de cassetes de deleção diferenciados para cada alelo do gene, presença de produtos interferentes nos cassetes construídos *in vitro* pela técnica de *Gibson Assembly*, baixa eficiência da eletroporação, e pressão de seleção não adequada dos meios empregados. A partir destas considerações, uma

estratégia de deleção sequencial dos dois alelos do gene *ura3*, simultaneamente com a super expressão dos genes *xyl1* e *zwf*, que codifica para a G6PDH, sob controle do pGAPDH, a partir de cassetes diferenciados quanto ao sítio de integração no *locus* do *ura3*. Entretanto, neste caso, a técnica de *Gibson Assembly* se mostrou ineficaz para a construção do cassete, o qual foi relacionado com o tamanho não apropriado das regiões de homologia entre os fragmentos a serem montados sequencialmente em função do número e tamanhos dos mesmos.

Assim, considerando que as estratégias implementadas na presente pesquisa para o desenvolvimento de uma marca de seleção baseada na auxotrofia a uridina e para super expressão dos genes que codificam para as enzimas XR e XDH não tiveram êxito, não foi possível a engenharia da via metabólica envolvida na produção de xilitol por *C. tropicalis*.

4 CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho foi estudada a produção biotecnológica de xilitol a partir da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar. Esta biomassa lignocelulósica apresentou um conteúdo de hemicelulose (29,53%) similar a outros materiais já empregados como matérias-primas neste bioprocesso, bem como uma elevada proporção de xilose (33,87%) com relação a seus carboidratos constituintes. A implementação das etapas de hidrólise ácida diluída, concentração à vácuo e destoxificação do hidrolisado hemicelulósico resultou na obtenção de um hidrolisado considerado adequado para a etapa fermentativa do processo. No entanto, ao final destas etapas constatou-se a recuperação como xilose no hidrolisado hemicelulósico de 26,67% do conteúdo original de xilana na biomassa *in natura,* o que permite destacar a necessidade de estudos de otimização da hidrólise ácida diluída para maximizar a recuperação da xilose e minimizar a formação de compostos potencialmente tóxicos, de forma a reduzir ou eliminar as etapas de concentração e destoxificação do hidrolisado.

Com o intuito de melhoria da etapa de fermentação do processo de produção de xilitol, foram propostas duas estratégias inovadoras focadas no estudo das condições de operação do processo e da capacidade fermentativa de *C. tropicalis*. Quanto à primeira estratégia, demonstrou-se que a sacarose teve efeito benéfico como co-substrato na produção de xilitol em função da concentração suplementada e do K_La. A utilização de condições dentro da faixa de otimização destes dois fatores (K_La 6,5 h^{-1} e concentração inicial de sacarose 0,9 gL^{-1}) resultou na maximização do fator de conversão de xilose em xilitol (0,86 gg^{-1}, equivalente a uma eficiência de bioconversão de 93,97%) e produtividade volumétrica de xilitol (0,54 $gL^{-1}h^{-1}$). Apesar de considerar-se que os resultados não deram suporte para avaliação do melaço de cana nas condições otimizadas em escala de biorreator de bancada, uma exploração preliminar do efeito da suplementação deste em substituição de nutrientes convencionalmente empregados neste bioprocesso demonstrou melhoria do consumo de xilose e produção de xilitol por *C. tropicalis* em escala de frascos agitados.

Por outro lado, com relação à estratégia de engenharia da via metabólica envolvida na produção de xilitol, a partir da modificação da expressão de enzimas chave relacionadas com a redução de xilose em xilitol e de acúmulo deste produto, as diversas estratégias implementadas para o desenvolvimento de uma marca de seleção baseada na auxotrofia para uridina em *C. tropicalis*, susceptível de ser sequencialmente transformada, bem como para a super expressão dos genes que codificam para as enzimas xilose redutase e glucose 6P

desidrogenase, não tiveram êxito. Foram identificadas razões para o insucesso relacionadas com a eficiência das técnicas de construção *in vitro* dos cassetes, de transformação da levedura e seleção dos transformantes.

Os resultados obtidos no presente projeto, particularmente nas duas primeiras etapas, relativos ao estudo do efeito da sacarose em escala de biorreator de bancada e do melaço em escala de frascos agitados, demonstram que os três subprodutos do setor sucroalcooleiro (bagaço, palha e melaço) podem ser valorizados a partir de seu aproveitamento na formulação do meio de fermentação para obtenção de xilitol. Estes resultados contribuem no embasamento científico de uma potencial integração deste bioprocesso em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar, a qual favoreceria sua viabilidade técnica e econômica, enquanto que contribuiria para a rentabilidade deste setor a partir da diversificação de seu portfólio de produtos.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos e visando dar continuidade aos estudos de produção biotecnológica de xilitol a partir da mistura de bagaço e palha de cana e sua integração em uma biorrefinaria de cana, sugere-se:

a) otimizar as condições de operação da hidrólise ácida diluída da mistura de bagaço e palha de cana, para maximizar a recuperação de xilose e minimizar a formação de compostos potencialmente tóxicos para o micro-organismo;

b) avaliar a produção de xilitol por *C. tropicalis* em hidrolisado hemicelulósico suplementado apenas com melaço de cana, ajustado a diferentes concentrações iniciais de sacarose definidas em função dos resultados do presente estudo, em escala de biorreator e com emprego de diferentes configurações de processo (batelada alimentada e contínuo);

c) utilizar ferramentas de metabolômica para estudo do efeito do consumo simultâneo de xilose e sacarose na distribuição dos fluxos de carbono em *C. tropicalis*;

d) estudar o sistema de transporte e hidrólise da sacarose em *C. tropicalis* com aproveitamento de técnicas de biologia molecular, como RT-PCR, e bioinformática;

e) avaliar a possibilidade de produção concomitante de xilitol e etanol por *C. tropicalis* em misturas de hidrolisado hemicelulósico e melaço de cana;

f) avaliar a aplicação da tecnologia CRISPR-Cas9 para edição genômica de *C. tropicalis*, visando a engenharia da via metabólica envolvida na conversão de xilose em xilitol;

g) realizar análise técnica, econômica e de sustentabilitada da rota biotecnológica de produção de xilitol a partir de simulações de configurações como planta independente ou integrado em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, A.; WOHLGEMUTH, R.; TWARDOWSKI, T. Preface to the special issue bioeconomy. **New Biotechnology,** v. 40, p. 1-4, 2018.

AHMAD, I. et al. Enhancement of xylitol production in *Candida tropicalis* by co-expression of two genes involved in pentose phosphate pathway. **Bioprocess and Biosystems Engineering,** v. 35, p. 199-204, 2012.

AHMAD, M. F.; HAYDAR, S.; QURAISHI, T. A. Enhancement of biosoprtion of zinc ions from aqueous solution by immobilized *Candida utilis* and *Candida tropicalis* cells. **International Biodeterioration and Biodegradation,** v. 83, p. 119-128, 2013

ALBUQUERQUE, T. L. et al. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. **Process Biochemistry,** v. 49, p. 1179-1789, 2014.

ALIAKBARIAN, B. et al. An assessment on xylitol recovery methods. In: SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. (Ed). **D-Xylitol. Fermentative production, application and commercialization.** Berlin: Springer-Verlag, 2012. cap. 10, p. 229-244.

ALMEIDA, J. B. S. et al. Use of response surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the bioconversion of xylose into eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, p. 945–948, 2003.

ALMEIDA, J. R. M. et al. NADH- vs. NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 939-945, 2008.

ALMEIDA, J. R. M. et al. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.82, p.625–638, 2009.

ALVES, L. A. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p.89-98, 1998.

ARCAÑO, Y. D. et al. Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route. **Catalysis Today.** In press. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.07.060. Acesso em: 18 set. 2018.

ARRUDA, P. V.; FELIPE, M.G.A. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 274–278, 2009.

ARRUDA, P. V. et al. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xilose em xilitol. **Nucleus,** v. 5, n. 1, p. 166-182, 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. 165p. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. 2011.

ARRUDA, P. V. et al. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, v. 22, p. 815–822, 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.

BACKER, M. D. et al. Transformation of *Candida albicans* by electroporation. **Yeast,** v. 15, p. 1609-1018, 1999.

BAEZA, J.; FREER, J. Chemical characterization of wood and its components. Chapter 7. In: HON, D.N.S.; SHIRAISHI, N. (Eds.) **Wood and Cellulosic Chemistry**. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2001. p. 367.

BANDYOPADHAY, B.; HUMPHREY, A.E.; TAGUCHI, H. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 9, p. 533–544, 1967.

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.

BLANDIN, G. et al. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 16. *Candida tropicalis*. **FEBS Letters,** v. 487, p. 91-94, 2000.

BORETSKY, Y. R. et al. Development of a transformation system for gene knock-out in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii*. **Journal of Microbiological Methods,** v. 70, p. 13-19, 2007.

BOZELL, J. Feedstocks for the future: biorefinery production of chemicals from renewable carbon. **Clean**, v. 36, n. 8, p. 641–647, 2008.

BRANCO, R. F.; SANTOS, C. S.; SILVA, S. S. A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. **Biomass and Bioenergy,** v. 35, p. 3241-3246, 2011.

BRUINENBERG, P.; VAN DIKJEN, J.; SCHEFFERS, A. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 953-964, 1983.

BUDZIANOWSKI, M.; POSTAWA, K. Total chain integration of sustainable biorefinery systems. **Applied Energy,** v. 184, p. 1432-1446, 2016.

BUDZIANOWSKI, M. High-value low-volume bioproducts coupled to bioenergies with potential to enhance business development of sustainable biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 70, p. 793-804, 2017.

BURGERS, P. M.; PERCIVAL, K. J. Transformation of yeast spheroplast without cell fusion. **Analytical biochemistry,** v. 163, p. 391-397, 1987.

BUTLER, G. et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, p. 657-662, 2009.

CAI, J. et al. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v. 76, p. 309–322, 2017.

CANETTIERI, E. V.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A. Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 94, p. 159-168, 2001.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA, J. B. S. Influence of medium composítion on xylitol bioproduction from wheat straw hemicellulosic hydrolysate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology,** v. 21, p. 1087–1093, 2005.

CANILHA, L. **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo**. 2006. 153p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. 2006.

CANILHA, L. et al. Clarification of a wheat straw-derived medium with ion-exchange resins for xylitol crystallization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** v. 83, p. 715-721, 2008.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of Hemicellulose from Sugarcane Biomass into Sustainable Products. In: CHANDEL. A. (Ed). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques, Applications and Commercialization.** Intech Open Access. 2013, cap. 2, p. 15–45.

CARVALHO, R.; MARTON, J. M.; FELIPE, M. G A. Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de- açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. **Revista Analytica**, n. 18, p. 48-55, 2005.

CARVALHO, J. L. N. et al. Agronomic and environmental implications of sugarcane straw removal: a major review. **Global Change Biology**, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1111/gcbb.12410. Acesso em: 18 ago. 2018.

CARVALHO, W. A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2135–2141, 2004.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Operational stability of the semi-contínuous xylitol production from sugarcane bagasse in stirred reactor by Ca-alginate entrapped cells. **Journal of Biotechnology**, v. 136, p. S378, 2008.

CASTIONI, G. A. et al. Soil physical quality response to sugarcane straw removal in Brazil: A multi-approach assessment. **Soil and Tillage Research,** v. 184, p. 301-309, 2018.

CAZETTA, M. L. et al. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 747-751, 2005.

CAZETTA, M. L. et al. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis:* Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Bioresource Technology,** v. 98, p. 2824-2828, 2007.

CHAI, L. Y. A.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology,** v. 36, p. 282-298, 2010.

CHANDEL, A. et al. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11–20, 2012.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and management,** v. 51, p. 1412-1421, 2010.

COK, B. et al. Succinic acid production derived from carbohydrates: An energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining,** v.8, p. 16-29, 2014.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v.101, p.1858–1865, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar.** Safra 2019/20. Primeiro Levantamento. Brasília, 2016. 68p.

COSTA, I. A. L. et al. Avaliação da remoção de ácido acético e perda de xilose durante o emprego de diferentes adsorventes na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar visando seu uso em bioprocessos. In: **SEQVAP – SEMANA DE ENGENHARIA QUÍMICA DO VALE DO PARAÍBA. 14.** Lorena/SP. 2014.

COSTA, W.L.S., BOCCHI, M.L.G. Aplicações do bagaço da cana-de-açúcar utilizadas na atualidade. **Ciência & Tecnologia**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2012.

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

CONVERTI, A. et al. Mixed inhibitions by methanol, furfural and acetic acid in xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1861–1865, 2000.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v.101, p.1858–1865, 2010.

HENKEL RESEARCH CORPORATION. Cregg, J. M. et al. ***Candida tropicalis* transformation system.** US 5,204,252, 27 jul. 1989, 20 abr. 1993.

DAI, J.Y. et al. Enhanced production of 2,3-butanediol from sugarcane molasses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, p. 3014-3024, 2015.

DALANHOL, K. C. F. **Avaliação do desempenho das leveduras *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã.** 2014. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2014.

DÁVILA, J. A.; ROSENBERG, M.; CARDONA, C. A. A biorefinery for efficient processing and utilization of spent pulp of Colombian Andes Berry (Rubus glaucus Benth.): Experimental, techno-economic and environmental assessment. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 227-236, 2017.

DEFOSSE, T. A. et al. A new series of vectors for constitutive, inducible or repressible gene expression in *Candida guilliermondii.* **Journal of Biotechnology,** v. 180, p. 37-42, 2014.

DIAS, M. O. S. et al. Evaluation of process configurations for second generation integrated with first generation bioethanol production from sugarcane. **Fuel Processing Technology,** v. 109, p. 84–89, 2013.

DMYTRUK, O. V. et al. Metabolic engineering of the initial stages of xylose catabolism in yeast for the purpose of constructing efficient producers of ethanol from lignocellulosics. **Cytology and Genetics,** v. 42, n. 2, p. 127-138, 2008.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Phenolic composítion and antioxidant activity of culms and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) products. **Food Chemistry,** v. 125, p. 660-664, 2011.

FARWICK, A. et al. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. **PNAS,** v. 111, p. 5159-5164, 2014.

FEHÉR, C.; MARTA, Z.; RÉCSEY, K. Process considerations of a biorefinery producing value-added products from corn fiber. **Periodica polytechnica Chemical Engineering**, v. 56, n. 1, p. 9–19, 2012.

FELIPE, M. G. A. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic materials**.** In: SAHA, B.; HAYASHI, K. (Eds.). **Lignocellulose Biodegradation**. American Chemical Society. 2004. p. 300–315.

FELIPE, M. G. A. et al. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii.* **Journal of Basic Microbiology,** v. 35, 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 & Biotechnology,** v. 18, p. 251–254, 1997a.

FELIPE, M. G. A. et al. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, n. 1, p. 11–14, 1997b.

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. An approach to the utilisation of CO_2 as impregnating agent in steam pretreatment of sugarcane bagasse and leaves for ethanol production. **Biotechnology for Biofuels,** v. 3, n. 7, p. 1-8, 2010.

FITZGERALD, D. J.; STRATFORD, M.; NARBAD, A. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. **International Journal of Food Microbiology,** v. 86, p. 113-122, 2003.

FLORES, C. et al. Carbohydrate and energy-yielding in non-conventional yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 507–529, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT.** Disponível em: http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em: 17 jan. 2017.

FONZI, W. A.; IRWIN, M. Y. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. **Genetics,** v. 134, p. 717-728, 1993.

FOUREAU, E. et al. Optimization of the URA-blaster disruption system in *Candida guilliermondi*i: Efficient gene targeting using the URA3 marker. **Journal of Microbiological Methods,** v. 91, p. 117-120, 2012.

FOUREAU, E. et al. Efficient gene targeting in a *Candida guilliermondii* non-homologous end-joining pathway-deficient strain. **Biotechnology Letters**, v. 35, p. 1035-1043, 2013.

FRACTOVIA MARKET AND TRENDING NEWS. Booming food & beverages industry to drive xylitol market growth over 2016-2023: Global revenue to hit USD 1.1 billion by 2023. 2016. Disponível em: https://www.fractovia.org/news/industry-research-report/xylitol-market. Acesso em :16 fev. 2018.

FRANCESCHIN, G. et al. Conversion of rye straw into fuel and xylitol: a technical and economical assessment based on experimental data**. Chemical Engineering Research and Design,** v. 89, p. 631–640, 2011.

GARCÍA-MARTIN, J. F.; SÁNCHEZ, S.; CUEVAS, M. Evaluation of the effect of the dilute acid hydrolysis on sugars release from olive prunings. **Renewable Energy,** v. 51. p. 382–387, 2013.

GARCÍA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 153-176, 2009.

GIBSON, D. G. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. **Nucleic Acids Research,** v. 37, p. 6984-6990, 2009.

GIBSON, D. G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods.** v. 6, p. 343-347. 2009.

GLOBAL MARKET INSIGHTS INC. Xylitol market size by application. 2016. Disponível em: https://www.gminsights.com/industry-analysis/xylitol-market. Acesso em: 16 fev. 2018.

GOLEMBIEWSKI, B.; SICK, N.; BRÖRING, S. The emerging research landscape on bioeconomy: What has been done so far and what is essential from a technology and innovation management perspective? **Innovative Food Science and Emerging Technologies,** v. 29, p. 308-317, 2016.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500–1503, 2009.

GRAND VIEW RESEARCH INC. Xylitol building block market size, application analysis, regional outlook, competitive strategies and forecasts, 2014 to 2020. 2014. Disponível em: https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/xylitol-building-block-market. Acesso em: 18 fev. 2018.

GRAND VIEW RESEARCH INC. xylitol market size worth $1.37 billion by 2025 | Growth Rate: 6.6%. 2017. Disponível em: https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-xylitol-market. Acesso em: 16 fev. 2018.

GRANSTRÖM, T.; LEISOLA, M. Controlled transient changes reveal differences in metabolite production in two *Candida* yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 511–516, 2002.

GRANSTRÖM, J.; IZUMORI, K.; LEISOLA, M. A rare sugar xylitol. Part I: The biochemistry and biosynthesis of xylitol**. Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 74, p. 277–281, 2007.

GUPTA, A.; RAO, G. A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 84, p. 351-358, 2003.

HAMMER, K.; MIJAKOVIC, I.; JENSEN, P. R. Synthetic promoter libraries – tuning of gene expression. **TRENS in Biotechnology,** v. 24, n. 2, p. 53-55, 2006.

HASS, L. O. C. et al. Development of an integrative DNA transformation system for the yeast *Candida tropicalis*. **Journal of Bacteriology,** v. 172, p. 4571-4577, 1990.

HARA, A. et al. A mutated hydromycin resistance gene is functional in the *n*-alkane-assimilating yeast *Candida tropicalis*. **Archives of Microbiology,** v. 173, p. 187-192, 2000.

HARA, A. et al. Novel and convenient methods for *Candida tropicalis* gene disruption using a mutated hygromycin B resistance gene. **Archives of Microbiology,** v. 176, p. 364-369, 2001.

HAMEDI, H. et al. Generation of an uracil auxotroph strain of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* as a host for the recombinant protein production. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology,** v. 5, p. 29-34, 2013.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F. **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. 129p. Disssertação (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, p. 489–496, 2016.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F. et al. Biochemical conversion of sugarcane straw hemicellulosic hydrolyzate supplemented with co-substrates for xylitol production. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 1085-1088, 2016.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F. et al. Xylitol bioproduction: state-of-the-art, industrial paradigm shift, and opportunities for integrated biorefineries. **Critical Reviews in Biotechnology,** 2019a. Disponível em: https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1640658. Acesso em: 18 jul. 2019.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F. et al. Sugarcane syrup improves xylitol bioproduction from sugarcane bagasse and straw hemicellulosic hydrolysate. **Waste and Biomass Valorization**, 2019b. https://doi.org/10.1007/s12649-019-00742-6. Acesso em: 10 jul. 2019. In press.

HESS. J. R. et al. Bioeconomy Strategies. In: LAMERS, P. et al. (Ed). **Developing the Global Bio economy.** Academic Press, 2016. cap 1, p. 1-9.

HOFTSETZ, K., SILVA, M. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy,** v. 46, p. 564–573, 2012.

HOU, J. et al. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the efficient co-utilization of glucose and xylose. **FEMS Yeast Research,** v. 17, p. 1-11, 2017.

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.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES. **OligoAnalizer**. 2019. Disponível em: https://www.idtdna.com/calc/analyzer. Acesso em: 18 ago. 2017.

JANG, I. S. et al. Improving the efficiency of homologous recombination by chemical and biological approaches in *Yarrowia lipolytica*. **PLOS One,** v. 13, p. 1-10, 2018.

JEON, Y. T.; SHIN, H. S.; ROGERS, P. L. Xylitol production from a mutant strain of *Candida tropicalis.* **Letters in Applied Microbiology.** v. 53, p. 106-113. 2011.

JEON, W.Y. et al. Xylitol production is increased by expression of codon-optimized *Neurospora crassa* xylose reductase gene in *Candida tropicalis*. **Bioprocess and Biosystems Engineering,** v. 35, p. 191-198, 2012.

JEON, W. Y. et al. Effect of heterologous xylose transporter expression in *Candida tropicalis* on xylitol production rate. **Bioprocess and Biosystems Engineering,** v. 36, n. 6, p. 809–817, 2013.

JONSSÖN, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 16, 2013.

KASTNER, J.; EITEMAN, M.; LEE, S. Glucose repression of xylitol production in *Candida tropicalis* mixed-sugar fermentations. **Biotechnology Letters,** v. 23, p. 1663–1667, 2001.

KAWAI, S.; HASHIMOTO, W.; MURATA, K. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. **Bioengineered Bugs,** v. 1, p. 395-403, 2010.

KEASLING, J. D. Manufacturing molecules through metabolic engineering. **Science,** v. 330, p. 1355-1358, 2010.

KELLY, C. et al. Effect of furfural, vanillin and syringaldehyde on *Candida guilliermondii* growth and xylitol biosynthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, p. 97–108, 2008.

KIM, J.; RYU, Y.; SEO, J. Analysis and optimization of a two-substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** v. 22, p.181–186, 1999.

KIM, M.S. et al. High-yield production of xylitol from xylose by a xylitol dehydrogenase defective mutant of *Pichia stipitis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology,** v. 11, p. 564-569, 2001.

KIM, Y.M. et al. Engineering the pentose phosphate pathway to improve hydrogen yield in recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 108, p. 2941-2946, 2011.

KLINNER, U.; SCHAFER, B. Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews,** v. 28, p. 201-223, 2004.

KO, B. S.; JUNG, H. C.; KIM, J. H. Molecular cloning and characterization of NAD^+- dependent xylitol dehydrogenase from *Candida tropicalis* ATCC 20913. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 1708-1714, 2006.

KO, B.S.; KIM, J.; KIM, J.H. Production of Xylitol from D-Xylose by a Xylitol Dehydrogenase Gene-Disrupted Mutant of *Candida tropicalis.* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4207–4213, 2006.

KO, B.S. et al. Enhancement of xylitol production by attenuation of intracellular xylitol dehydrogenase activity in *Candida tropicalis*. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1209-1213, 2011.

KRISHNAN, C. et al. Alkali-Based AFEX Pretreatment for the Conversion of Sugarcane Bagasse and Cane Leaf residues to Ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 441–450, 2010.

KROH, L. W. Caramelisation in food and beverages. **Food Chemistry,** v. 51, p. 373-379, 1994.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research,** v. 48, p. 3713-3729, 2009.

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4. p. 1-19, 2017.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W. *Candida tropicalis*. In: KURTZMAN, C.; FELL, J. W. (eds). **The Yeast – A Taxonomic Study. 4th Ed.** Amsterdam: Elsevier Science, 2000. p. 563-564.

KWON, D.H. et al. Elevation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity increases xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 86-89, 2006.

LAGO, A. et al. Sugarcane as a carbon source: The Brazilian Case. **Biomass and Bioenergy,** v. 46. p. 5–12, 2012.

LEAL, M. et al. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: A literature review. **Biomass and Bioenergy,** v. 53, p. 11–19, 2013.

LEE, J. K.; KOO, B. S.; KIM, S. Y. Cloning and characterization of the *xyl1* gene, encoding and NADH-preferring xylose reductase from *Candida parapsilosis* and its functional expression in *Candida tropicalis*. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 69, p. 6179-6188, 2003.

LI, Z. et al. Direct and efficient xylitol production from xylan by *Saccharomyces cerevisiae* through transcriptional level and fermentation processing optimizations. **Bioresource Technology,** v. 149, p. 413-419, 2013.

LI, H.; SCHMITZ, O.; ALPER, H. S. Enabling glucose/xylose co-transport in yeast through the directed evolution of a sugar transporter. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 10215-10223, 2016.

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

LIMA, L. H. A. et al. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 734-738, 2004.

LIMA, L.H.A. **Estudos moleculares dos genes XYL1 e XYL2 de *Candida tropicalis* visando a produção de xilitol.** 2006, 177p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade de Brasília, Brasília. 2006.

LIMA, L.H.A. et al. Xylitol dehydrogenase from *Candida tropicalis*: molecular cloning of the gene and structural analysis of the protein. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 73, p. 631–639, 2006.

LIU, Y. P. et al. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. **Bioresource Technology,** v. 99, p. 1736-1742, 2008.

LISBOA, I. P. et al Applying Soil Management Assessment Framework (SMAF) on short-term sugarcane straw removal in Brazil. **Industrial Crops and Products,** v. 129, p. 175-184, 2019.

LÖBS, A. K.; SCHWARTZ, C.; WHEELDON, I. Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications. **Synthetic and Systems Biotechnology,** v. 2, p. 198-207, 2017.

LONG, S. P. et al. Feedstocks for fuels and bioenergy. In: SOUZA, G.M. et al. (Eds). **SCOPE Bioenergy and Sustainability: bringing the gaps**. São Paulo, 2015. cap 10, p. 314-318.

MANCERA, E. et al. Genetic modification of closely related *Candida* species. **Frontiers in Microbiology,** v. 10, 357, 2019.

MARTINEZ, A. et al. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnology Progress,** v. 17, p. 287-293, 2001

MARTÍNEZ, E. A.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Effect of the oxygen transfer coefficient on xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate by CSTR fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 633-641, 2000.

MARTÍNEZ, E. A. et al. The influence of pH and dilution rate on contínuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1677–1683, 2003.

MARTÍNEZ, E, A. et al. Downstream process for xylitol produced from fermented hydrolysate**. Enzyme and Microbial Technology,** v. 40, p.1193-1198, 2007.

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.

MATTAM, A. J. et al. Cellulolytic enzyme expression and simultaneous conversion of lignocellulosic sugars into ethanol and xylitol by a new *Candida tropicalis* strain. **Biotechnology for Biofuels,** v. 9, 157, 2016.

MEDINA, J. D. C. et al. Energetic and economic analysis of ethanol, xylitol and lignin production using oil palm empty fruit bunches from a Brazilian factory. **Journal of Cleaner Production**, v. 195, p. 44-55, 2018.

MENANDRO, L. M. S. et al. Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining,** 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1002/bbb.1760. Acesso em: 12 abr. 2019.

MENON, V., RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science,** v. 38, p. 522–550, 2012.

MERRYMAN, C.; GIBSON, D. G. Methods and applications for assembling large DNA constructs. **Metabolic Enginnering,** v. 14, p. 196-204, 2012.

MELAÇOS BRASILEIROS. **Especificações técnicas do melaço de cana líquido.** 2019. Disponível em: https://melacos.com.br/especificacoes-tecnicas. Acesso em: 16 oct. 2019.

MEZAROBA, S.; MENEGUETTI, C. C.; GROFF, A. M. Processos de produção do açúcar e os possíveis reaproveitamentos dos subprodutos e resíduos resultantes do sistema. In: ENCONTRO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO AGROINDUSTRIAL, 4, 2010. Campo Mourão/PR. **Anais**... Campo Mourão/PR. 2010.

MILLERIOUX, Y. et al. Development of a *URA5* integrative cassette for gene disruption in the *Candida guilliermondii* ATCC 6260 strain. **Journal of Microbiological Methods,** v. 84, p. 355-358, 2011.

MORAES, E. J. C. et al. Xylitol-sweetner production from barley straw: Optimization of Acid Hydrolysis condition with the energy consumption simulation. **Waste and Biomass Valorization,** 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s12649-018-0501-9. Acesso em: 23 nov. 2017.

MORITA, T.A.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Effects of Initial pH on Biological Synthesis of Xylitol Using Xylose-Rich Hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 84-86, p. 751–759, 2000.

MOUNTRAKI, A. D. et al. Selection of biorefinery routes: The case of xylitol and its integration with an organosolv process. **Waste and Biomass Valorization,** v. 8, p. 2283-2300, 2018.

MOUTTA, R. O. et al. Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process. **Sugar Tech**, v. 14, p. 53-60, 2012.

MOUTTA R. O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BOM, E. P. S. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid. **Biocatalysis and Biotransformation,** v. 32, p. 93-100, 2014.

MUSSATTO, S. I. Application of xylitol on food formulations and benefits for health. In: SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. (Eds). **D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization.** Berlin: Springer-Verlag, 2012. cap. 14, p. 309–324.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry,** v. 40, p. 3801-3806, 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir de palha de arroz. **Biotecnologia Ciencia & Desenvolvimento,** n. 28, p. 34-39, 2002.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xylitol production from high xylose concentration: evaluation of the fermentation in bioreactor under different stirring rates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 331-337, 2003.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology,** v. 93, p. 1-10, 2004.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Evaluation of nutrient supplementation to charcoal- treated and untreated rice straw hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 497–502, 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry,** v. 43, p. 540-546, 2008.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Candida tropicalis.** 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid5482%5Borgn. Acesso em: 13 jul. 2017.

NEW ENGLAND BIOLABS Inc. **Gibson Assembly Cloning Kit. Instruction Manual.** 2018.

NEW ENGLAND BIOLABS Inc. **NEBuilder Assembly tool.** 2019. Disponível em: http://nebuilder.neb.com/#!/. Acesso em: 12 nov. 2018.

NØDVIG, C. S. et al. A CRISPR-CAS system for genetic engineering of filamentous fungi. **PLOS One**, v. 10, 0133085, 2015.

NOLASCO, D. V. **Aproveitamento do melaço de cana-de-açúcar como suplemento nutricional na produção biotecnológica de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana.** Relatório Iniciação Científica. Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. 2016. 21p.

OH, Y. J. et al. Dual modulation of glucose 6-phosphate metabolism to increase NADPH-dependent xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,** v. 47, p. 37-42, 2007.

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.

OLIVEIRA, M. R. et al. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal,** v. 37, p. 177-183, 2007.

ÖZÜDOĞRU, H. M. R. et al. Techno-economic analysis of product biorefineries utilizing sugarcane lignocelluloses: Xylitol, citric acid and glutamic acid scenarios annexed to sugar mills with electricity co-production. **Industrial Crops and Products,** v. 133, p. 259-268, 2019.

PAL, S. et al. Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology,** v. 147, p. 449–455, 2013.

PAL, S.; MONDAL, A. K.; SAHOO, D. K. Molecular strategies for enhancing microbial production of xylitol. **Process Biochemistry,** v. 51, p. 809-819, 2016.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology,** v. 74, p. 25-33, 2000.

PAPON, N. et al. *Deus ex Candida* genetics: overcoming the hurdles for the development of a molecular toolbox in the CTG clade. **Microbiology,** v. 158, p. 585-600, 2012.

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.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Xylitol production from Eucalyptus wood hydrolysates extracted with organic solvents. **Process Biochemistry,** v. 32, n. 7, p. 599–604, 1997.

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.

PERACCHI, A. Enzyme catalysis: removing chemically 'essential' residues by site-directed mutagenesis. **TRENDS in biochemical sciences,** v. 26, n. 8, p. 497-503, 2001.

PESSOA JR., A.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 3, p. 291–297, 1997.

PHILP, J. Balancing the bioeconomy: supporting biofuels and bio-based materials in public policy. **Energy and Environmental Science,** v. 8, p. 3063-3068, 2015.

PIMENTEL, L. G. et al. Decomposítion of sugarcane straw: Basis for management decisions for bioenergy production. **Biomass and Bioenergy**, v. 122, p. 133-144, 2019.

PIPPO, W. et al. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects. **Waste Biomass Valorization**. v. 2, p. 1–16, 2011.

PIRT, S. J. **Principles of Microbe and Cell Cultivation**. Oxford: Blackwell Scientific, 1975.

PICATAGGIO, S. et al. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids. **Bio/Technoloy,** v. 10, p. 894-898, 1992.

QUEIROZ, S. S. **Identificação e quantificação 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. 2019.

RAMBLA, M. A. O. et al. Méis. In: TAUPIER, L. O. G.: BALBÍN, A. C. (Eds). **Manual dos Derivados da Cana-de-Acúcar.** Brasilia: ABIPTI, 1999. p. 49-56.

RAO, L. V. et al. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology,** v. 213, p. 299-310, 2016.

RAVELLA, S. R. et al. Overview on commercial production of xylitol, economic analysis and market trends. In: SILVA, S.S.; CHANDEL, A.K. (Eds). **D-Xylitol. Fermentative production, application and commercialization.** Berlin: Springer-Verlag, 2012. cap. 13, p. 267–290.

RENÓ, M. L. G. et al. Sugarcane Biorefineries: Case studies applied to the Brazilian sugar-alcohol industry. **Energy Conversion and Management,** v. 86, p. 981-99, 2014.

RESEARCH AND MARKETS. Xylitol market: global industry trends, share, size, growth, opportunity and forecast 2018-2023. 2018. Disponível em: https://www.researchandmarkets.com/research/2wbg5g/global_xylitol?w=4. Acesso em: 06 jun. 2019.

ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Influence of k_{LA} on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Bioprocess Engineering,** v. 21, p. 505–508, 1999.

ROBERTO, I. C. et al. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology,** v. 36, p. 271-275, 1991.

RODRIGUES, D. C. G. A.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Fed-batch culture of *Candida guilliermondii* FTI 20037 for xylitol production for sugar cane bagasse hydrolysate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 359–363, 1999.

RODRIGUES, D. C. G. A. et al. Biotechnological production of xylitol from agroindustrial residues: Evaluation of bioprocesses. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 70-72, p. 869–875, 1998.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 3, p. 299–311, 2001.

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

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate at controlled pH values. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, p. 103-107, 2003b.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Current Microbiology,** v. 53, p. 53–59, 2006.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology,** v. 101, p. 1247–1253, 2010.

ROITGRUND, C.; STEINLAUF, R.; KUPIEC, M. Donation: a new, facile method of gene replacement in yeast. **Molecular and General Genetics,** v. 237, p. 306-310, 1993.

ROHRER, T. L.; PICATAGGIO, S. K. Targeted integrative transformation of *Candida tropicalis* by electroporation. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 36, p. 650-654, 1992.

RUEDA, C. et al. Biorefinery options to valorize the spent liquor from sulfite pulping. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** v. 90, p. 2218-2226, 2015.

RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RÅDSTRÖM, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels,** v. 3, n. 5, p. 1-7, 2010.

SAKA, S. Chemical composítion and distribution. In: HON, D. N. S.; SHIRAISHI, N. (Eds.) **Wood and Cellulosic Chemistry**. 2nd Ed. New York: Marcel Dekker Inc., 2001. cap. 2, p. 72.

SAMPAIO, F. C. et al. Xylitol crystallization from culture media fermented by yeasts. **Chemical Engineering and Processing,** v. 45, p. 1041-1046, 2006.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 315–318, 1988.

SANGLARD, D. et al. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 40, p. 2300-2305, 1996.

SIDDIQUI, M. S.; CHOKSI, A.; SMOLKE, C. D. A system for multi-locus chromosomal integration and transformation-free selection marker rescue. **FEMS Yeast Research,** v. 14, p. 1171-1185, 2014.

SARROUH, B.; SILVA, S. S. Evaluation of the performance of a three-phase fluidized bed reactor with immobilized yeast cells for biotechnological production of xylitol. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 6, p. 1–15, 2008.

SARROUH, B. F.; BRANCO, R. F.; SILVA, S. S. Biotechnological Production of Xylitol: Enhancement of Monosaccharide Production by Post-Hydrolysis of Dilute Acid Sugarcane Hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 153, p.153-170, 2009.

SARROUH, B.; SILVA, S. S. Repeated batch cell-immobilized system for the biotechnological production of xylitol as a renewable green sweetener. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 169, p. 2101–2110, 2013.

SASSON, A.; MALPICA, C. Bioeconomy in Latin America. **New Biotechnology**, v. 40, p. 40-45, 2018.

SEABRA, J. et al. A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. **Biomass and Bioenergy,** v. 34, p. 1065–1078, 2010.

SENE, L. et al. Effects of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 84 – 86. p. 371–380, 2000.

SENE, L. et al. Metabolic study of the adaptation of the yeast *Candida guilliermondii* to sugarcane bagasse hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v.57. p. 738–743, 2001.

SENE, L. et al. Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii.* **Brazilian Journal of Microbiology,** v. 42, p. 1142-1146, 2011.

SHATKIN, J. A. et al. Market projections of cellulose nanomaterial-enabled products − Part 1: Applications. **TAPPI Journal,** v. 13, n. 5, p. 9-16, 2014.

SIBIRNY, A. A.; BORETSKY, Y. R. *Pichia guilliermondii*. In: SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. (Eds.). **Yeast Biotechnology: diversity and applications.** Berlin: Springer Science. 2009. cap. 6, p. 113–134.

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

SILVA, C. J. S. M.; ROBERTO, I. C. Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 1119-1124, 2001.

SILVA, D. D. V. et al. Evaluation of inoculum of *Candida guilliermondii* grown in presence of glucose on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities and xylitol production during batch fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 121-124, p. 427–438, 2005.

SILVA, D. D. V. et al. Evaluation of the conditions used in the preparation of sugarcane bagasse hydrolysate for improvement of the xylitol production by fermentative process. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14, 2003, Florianópolis/ SC. **Anais ...** Florianópolis/ SC. 2003.

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, p. 248-254, 2004.

SILVA, D. D. V.; 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 and Biotechnology,** v. 81, n.7, p.1294–1300, 2006.

SILVA, D, D, V. et al. Effect of volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) on ethanol production performance by *Scheffersomyces stipitis* on hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysate. **Biochemical Engineering Journal,** v. 112, p. 249-257, 2016.

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.

SILVA, S. S. et al. Maximizing the xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-69, p. 557-564, 1997.

SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. Factors that affect the biosynthesis ox xylitol by xylose-fermenting yeasts. A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70 – 72, p. 331–339, 1998.

SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. **D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization.** Berlin: Springer-Verlag, 2012. 345p.

SLUITTER, A. et al. **Determination of ash in biomass.** Laboratory Analytical Procedure, National Renewable Energy Laboratory, Technical Report NREL/TP-510-42622, 2008a. 8p.

SLUITTER, A. et al. **Determination of extractives in biomass.** Laboratory Analytical Procedure, National Renewable Energy Laboratory, Technical Report NREL/TP-510-42619, 2008b. 12p.

SLUITTER, A. et al. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass.** Laboratory Analytical Procedure, National Renewable Energy Laboratory, Technical Report NREL/TP-510-42618, 2011. 18p.

SOUZA, G. M. et al. SCOPE Bioenergy & Sustainability. Technical Summary. In: SOUZA, G. M. et al. (Eds). **SCOPE Bioenergy & Sustainability: bringing the gaps.** São Paulo, 2015. cap. 1, p. 8-26.

SU, B. et al. Metabolic engineering strategies for improving xylitol production from hemicellulosic sugars. **Biotechnology Letters,** v. 35, n. 11, p. 1781–1789, 2013.

SUSMOZAS, A. et al. Designing an olive tree pruning biorefinery for the production of bioethanol, xylitol and antioxidants: a techno-economic assessment. **Holzforschung,** v. 73, p. 15-23, 2019.

SZCZERBOWSKI, D. et al. Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composítion of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers,** v. 114, p. 95-101, 2014.

TAMANINI, C. et al. Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xilitol. **Acta Scientiarum (UEM)**, v. 26, p. 117-125, 2004.

TAMBURINI, E. et al. Cosubstrate effect on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activity levels, and its consequence on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 46, p.352–359, 2010.

TRIPP, J. D. et al. Enhancement of plasmid DNA transformation efficiencies in early stationary phase yeast cell cultures. **Yeast,** v. 30, p. 191-200, 2013.

TSAI, C. J. et al. Yeast synthetic biology toolbox and applications for biofuel production. **FEMS Yeast Research,** v. 15, n. 1. p. 1-15, 2015.

UNREAN, P.; KETSUB, N. Integrated lignocellulosic bioprocess for co-production of ethanol and xylitol from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products,** v. 123, p. 238-246, 2018.

URBAN, A.; NEUKIRCHEN, S.; JAEGER, K. E. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. **Nucleic Acids Research,** v. 25, n. 11, p. 2227-2228, 1997.

VALADARES, F. L. **Estudo de enzimas ativas sobre carboidratos secretadas por basidiomicetos e seu envolvimento na degradação de materiais lignocelulósicos.** 2017. 184p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

VANHOLME, B. et al. Towards a carbon-negative sustainable bio-based economy. **Frontiers in Plant Science,** v. 4, p. 1-17, 2013.

VARANDA, L. L.; CHERUBIN; M. R. CERRI, C. E. P. Decomposítion dynamics altered by straw removal management in the sugarcane-expansion regions in Brazil. **Soil Research,** v. 57, p. 41-52, 2019.

VERDUYN, C. et al. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a contínuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, p. 501–517, 1992.

VILLAREAL, M. L. M. et al. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by Candida guilliermondii. **Enzyme and Microbial Technology,** v.40, p.17-24, 2006.

WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 280, p. 10340-10349, 2005.

WEI, J. et al. Purification and crystallization of xylitol from fermentation broth of corncob hydrolysates. **Frontiers of Chemical Engineering in China,** v. 4, n. 1, p. 57-64, 2010.

WERPY, T.; PETERSON, G. Top value-added chemicals from biomass. Volume I – Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. **U.S. Department of Energy. Energy Efficiency and Renewable Energy.** 2004.

WILLIAMSON, P. R.; HUBER, M. A.; BENNET, J. E. Role of maltase in the utilization of sucrose by *Candida albicans*. **Biochemical Journal,** v. 291, p. 765-771, 1993.

WILSON, P. B. et al. A recyclable *Candida albicans URA3* cassette for PCR product-directed gene disruptions. **Yeast,** v. 16, p. 65-70, 2000.

YOKOYAMA, S. I. et al. Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent D-Xylose reducatases from *Candida tropicalis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering,** v. 79, p. 217-223, 1995.

YOUNG, E. M. et al. A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, p. 401-411, 2012.

ZHANG, C. et al. Integrative expression vectors for overexpression of xylitol dehydrogenase (*XYL2*) in osmotolerant yeast, *Candida glycerinogenes* WL2002-5. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** v. 42, p. 113-124, 2015.

ZHANG, J. et al. Xylitol production at high temperature by engineered *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 192–201, 2014.

ZHANG, J. et al. Improving xylitol production at elevated temperature with engineered *Kluyveromyces marxianus* through over-expressing transporters. **Bioresource Technology,** v. 175, p. 642-645, 2015.

ZHANG, G. et al. Combining C6 and C5 sugar metabolism for enhancing microbial conversion. **Current Opinion in Chemical Biology,** v. 29, p. 49-57, 2015.

ZHANG, Y. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,** v. 35, p. 367–375, 2008.