

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**METABOLÔMICA DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE
XILOSE NA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS METABÓLICOS
PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

CHRISTIANE GONÇALVES CAMPOS CAVALCANTI

ORIENTADORA: DRA. PATRÍCIA VERARDI ABDELNUR
COORIENTADOR: DR. CLENILSON MARTINS RODRIGUES

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

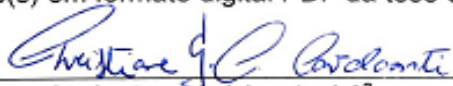
Nome completo do autor: Christiane Gonçalves Campos Cavalcanti

Título do trabalho: METABOLÔMICA DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE NA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS METABÓLICOS PARA AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 15 / 05 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**METABOLÔMICA DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE NA
IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS METABÓLICOS PARA AUMENTO DA
PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

Christiane Gonçalves Campos Cavalcanti

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Federal
de Goiás como exigência parcial,
para obtenção do título de doutor
em Química.

Orientador: Prof. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur
Coorientador: Dr. Clenilson Martins Rodrigues

Goiânia
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

GONÇALVES CAMPOS CAVALCANTI, Christiane
METABOLÔMICA DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE
XILOSE NA IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS METABÓLICOS PARA
AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G [manuscrito] / Christiane
GONÇALVES CAMPOS CAVALCANTI. - 2019.
CXX, 120 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur; co-orientador Dr.
Clenilson Martins Rodrigues .
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2019.
Bibliografia.
Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. METABOLÔMICA. 2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS. 3.
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA. 4. BIOTECNOLOGIA. 5. LEVEDURAS.
I. Verardi Abdelnur, Patrícia, orient. II. Título.

CDU 543




UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)

Ata da defesa de Tese de Doutorado de Christiane Gonçalves Campos, aluna regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Doutora em Química.

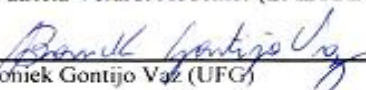
Aos dias 18 (dezoito) de fevereiro do ano de 2019 (dois mil e dezenove), com início às 14:00 hrs no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes doutores: Patrícia Verardi Abdelnur (EMBRAPA), Boniek Gontijo Vaz (UFG), Mauro Vicentini Correia (UNB), Nádia Skorupa Parachin (UNB) e Caio de Oliveira Gorgulho Silva (EMBRAPA), sob a presidência da primeira, para julgar a dissertação de Christiane Gonçalves Campos intitulada: "Metabolômica de leveduras fermentadoras de xilose na identificação de alvos metabólicos para aumento da produção de etanol 2g.". A presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

Prof. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur: Aprovada
Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz: Aprovado
Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia: Aprovado
Prof. Dra. Nádia Skorupa Parachin: Aprovada
Dr. Caio de Oliveira Gorgulho Silva: Aprovado

A seguir, na presença do público e da candidata, a presidente da Banca Examinadora declarou que Christiane Gonçalves Campos, candidata ao título de Doutora em Química foi: Aprovada (X); Reprovada (). Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, a senhora presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Themerson Blenner Cavalcante Souza, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 18 de fevereiro de 2019.



Prof. Dra. Patrícia Verardi Abdelnur (EMBRAPA)



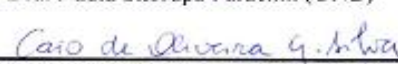
Prof. Dr. Boniek Gontijo Vaz (UFG)



Prof. Dr. Mauro Vicentini Correia (UNB)



Prof. Dra. Nádia Skorupa Parachin (UNB)



Dr. Caio de Oliveira Gorgulho Silva (EMBRAPA)

Aos meu pais Wilma e Julio Cesar,
meu marido Thiago e minha amada filha Júlia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me fortaleceu nos momentos mais difíceis, a minha família que me deu todo apoio e suporte para que eu chegasse até aqui. Agradeço em especial a minha querida mãe Wilma que mesmo sob diversas dificuldades me apoiou de maneira prática e muitas vezes psicológica. Agradeço ao meu esposo Thiago que mesmo sem entender muito bem o quão difícil é esta caminhada me ajudou muito com os cuidados da casa e da nossa filha. Agradeço minha querida filha Júlia que alegrou meus dias estressantes com muitas histórias de uma imaginação sem fim, me fazendo lembrar que eu tenho aquilo que é mais importante. Agradeço também ao nosso grupo de trabalho de espectrometria de massas chefiado pela Doutora Patrícia Verardi Abdenur. Grupo esse formado por pessoas especiais, de caráter e ética elogiáveis além de habilidades intelectuais muito acima da média. Me sinto privilegiada em fazer parte deste grupo. Agradeço em especial a minha orientadora Patrícia Abdelnur por ter sido fundamental no meu crescimento profissional e ter compartilhado seus conhecimentos com paciência e dedicação. Além do ombro amigo nos momentos necessários. Obrigada também a Unidade da Embrapa Agroenergia por todo apoio técnico, em especial aos analistas Patrícia Kalil e José Antônio, que sempre estiveram dispostos a compartilhar seus conhecimentos e ajudar de maneira prática dentro e fora do laboratório. Obrigada a CAPES pelo suporte financeiro tão importante para manter os alunos nos programas de pós-graduação.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS | 11 |
| LISTA DE TABELAS..... | 16 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 18 |
| RESUMO | 20 |
| ABSTRACT..... | 21 |
| 1 Introdução..... | 23 |
| 1.1 Aproveitamento da xilose para produção de Etanol 2G..... | 23 |
| 1.2 Metabolômica de leveduras | 25 |
| 1.2.1 Preparo de amostra em metabolômica de leveduras..... | 26 |
| 1.2.2 Técnicas analíticas avançadas para análise metabolômica..... | 29 |
| 1.2.3 Processamento dos dados em metabolômica..... | 32 |
| 1.2.4 Análise dos dados em metabolômica | 33 |
| 1.3 Contribuição da metabolômica no melhoramento de leveduras fermentadoras de xilose | 35 |
| 2 Objetivos Gerais..... | 39 |
| 2.1 Objetivos específicos | 39 |
| 3 Materiais e Métodos | 41 |
| 3.1 Reagentes e soluções | 41 |
| 3.2 Planejamento Experimental | 41 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.3 | Cultivo de leveduras..... | 42 |
| 3.4 | Determinação dos produtos de fermentação e da biomassa ... | 43 |
| 3.5 | Etapas de <i>quenching</i> e extração dos metabólitos..... | 43 |
| 3.6 | UHPLC-MS/MS | 44 |
| 3.7 | Quantificação dos metabólitos intracelulares | 46 |
| 3.8 | Análise estatística utilizando ANOVA..... | 46 |
| 3.9 | Obtenção do modelo estequiométrico..... | 47 |
| 3.10 | Análise de Fluxo Metabólico (MFA)..... | 47 |
| 4 | Resultados e discussão..... | 50 |
| 4.1 | Análise Metabolômica de leveduras fermentadoras de xilose . | 50 |
| 4.2 | Otimização dos parâmetros analíticos para a quantificação dos metabólitos | 54 |
| 4.3 | Quantificação dos metabólitos intracelulares das leveduras fermentadoras de xilose por UHPLC-MS/MS | 57 |
| 4.3.1 | Quantificação dos metabólitos intracelulares da levedura <i>S. stipitis</i> por UHPLC-MS/MS..... | 58 |
| 4.3.2 | Quantificação dos metabólitos intracelulares da levedura <i>S. passalidarum</i> por UHPLC-MS/MS | 63 |
| 4.3.3 | Quantificação dos metabólitos intracelulares da levedura <i>S. arborariae</i> por UHPLC-MS/MS..... | 70 |
| 4.3.4 | Quantificação dos metabólitos intracelulares da levedura <i>C. tenuis</i> por UHPLC-MS/MS..... | 75 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.4 | Análise estatística dos dados obtidos na quantificação de amostras de leveduras fermentadoras de xilose utilizando ANOVA . | 80 |
| 4.4.1 | Análise e interpretação dos dados da quantificação da levedura <i>S. stipitis</i> | 82 |
| 4.4.2 | Análise e interpretação dos dados da quantificação da levedura <i>S. passalidarum</i> | 89 |
| 4.4.3 | Análise e interpretação dos dados da quantificação das leveduras <i>S. arborariae</i> | 95 |
| 4.5 | Análise de fluxo metabólico (MFA) para leveduras fermentadoras de xilose | 100 |
| 4.5.1 | Validação dos metabólitos intracelulares das leveduras fermentadoras de xilose <i>S. stipitis</i> , <i>S. passalidarum</i> e <i>S. arborariae</i> utilizando MFA..... | 101 |
| 4.5.2 | Fluxo metabólico das leveduras fermentadoras de xilose <i>S. stipitis</i> , <i>S. passalidarum</i> e <i>S. arborariae</i> | 105 |
| 4.6 | Comparação do metaboloma das leveduras fermentadoras de xilose <i>S. stipitis</i>, <i>S. passalidarum</i> e <i>S. arborariae</i> | 110 |
| 5 | Conclusão | 113 |
| | Referências..... | 115 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema simplificado da via de conversão da xilose por leveduras (adaptado de Moysés et al, 2016)⁹..... 24
- Figura 2.** Visão geral de um fluxo de trabalho para um experimento de metabolômica de leveduras (Adaptado de Abdelnur et al, 2011)²³ 26
- Figura 3.** Fluxo de trabalho geral para o preparo de amostra em metabolômica targeted de leveduras para análise de metabólitos intracelulares. 27
- Figura 4.** Via simplificada do metabolismo da xilose por leveduras formada pelas vias da glicólise, pentose fosfato (PPP) e ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) Metabólitos destacados em vermelho (14) foram quantificados pelo método IPC; metabólitos destacados em amarelo (5) foram quantificados pelo método HILIC ... 37
- Figura 5.** Planejamento experimental para a realização da metabolômica de quatro espécies de leveduras fermentadoras de xilose. As replicatas de tempo (T1, T2, T3) e as replicatas técnicas (R1, R2, R3) são repetidas para cada replicata biológica aeróbica (A, B, C) e microaeróbica (D, E, F). 42
- Figura 6.** Fluxo de trabalho das etapas do preparo de amostra: A) quenching do metabolismo celular das leveduras; B) extração dos metabólitos intracelulares. (adaptado de Campos et al, 2019)⁵⁶ 44
- Figura 7.** Estrutura química dos metabólitos presentes na via de assimilação da xilose por leveduras. Metabólitos: ácido alfa cetoglutárico (AKG), ácido málico (L-MAL), dihidroxi acetona fosfato (DHAP), fosfo(enol)piruvato (PEP), eritrose-4-fosfato (E4P), frutose-6-fosfato (F6P), glicerol-3-fosfato (GLY3P), glicose-6- fosfato (G6P), gliceraldeído-3-fosfato (GAP), piruvato de sódio (PYR), ribose-5- fosfato (R5P), ribulose-5- fosfato (RU5P), sedoheptulose-7- fosfato (S7P), xilitol, xilose, glicose, xilulose (Xylu), glicerol e acetil coenzima A (ACCOA)..... 50
- Figura 8.** Cromatograma de 5 canais de MRM no modo HILIC-ESI(-)-MS/MS: a) glicerol (91> 59), b) xilulose (149> 59) e xilose (149> 59), c) xilitol (151> 59) e d) glicose (179> 59). 53
- Figura 9.** Cromatograma de 11 canais de MRM no modo IPC-ESI(-)-MS/MS: a) glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato (m/z 259 > 97); b) ribose-5- fosfato (m/z 229 > 97) e ribulose-5- fosfato (m/z 229>79); c) sedoheptulose-7-fosfato (m/z 288 > 139); d) glicerol-3-fosfato (m/z 170>79); e) eritrose-4-fosfato (m/z 199>79); f) gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (m/z 169>97), g) ácido pirúvico (m/z 87 > 43), h) ácido málico (m/z 133 >115); i) ácido alfacetoglutárico (m/z 145 > 57); j) fosfo(enol)piruvato (m/z 167 > 79) e k) acetil co-A (808 > 408). 53
- Figura 10.** Curvas de calibração ajustadas pelo modelo quadrático de quatorze padrões de metabólitos analisados pelo método IPC: A) acetil coenzima A (ACCOA), B) glicose-6- fosfato (G6P), C) ribose-5- fosfato (R5P), D) sedoheptulose-7- fosfato

(S7P), E) piruvato de sódio (PYR), F) ácido alfa cetoglutárico (AKG), G) frutose-6-fosfato (F6P), H) ribulose-5- fosfato (RU5P), i) gliceraldeído-3-fosfato (GAP), J) fosfo(enol)piruvato (PEP), K) ácido málico (L-MAL), L) dihidroxi acetona fosfato (DHAP), M) eritrose-4-fosfato (E4P), e N) glicerol-3-fosfato (GLY3P). 56

Figura 11. Curvas de calibração ajustadas pelo modelo quadrático de cinco padrões de metabólitos analisados pelo método HILIC: A) xilulose, B) glicerol, C) glicose, D) xilose e E) xilitol. 57

Figura 12. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *S. stipitis* com as soluções padrão destes compostos, nas condições aeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilose, b) xilitol, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), d) ribose-5-fosfato (R5P) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), e) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), f) glicerol-3-fosfato (Gly3P), g) dihidroxiacetona fosfato (DHAP), h) ácido pirúvico (PYR), i) ácido málico (L-MAL), j) ácido alfa cetoglutárico (AKG), k) fosfo (enol) piruvato (PEP). 61

Figura 13. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *S. stipitis* com as soluções padrão destes compostos, nas condições microaeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilose, b) xilitol, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), d) ribose-5-fosfato (R5P) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), e) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), f) glicerol-3-fosfato (Gly3P), g) di-hidroxi acetona fosfato (DHAP), h) ácido pirúvico (PYR), i) ácido málico (L-MAL), j) fosfo(enol)piruvato (PEP). 62

Figura 14. Gráficos dos produtos da fermentação da xilose pela levedura *Scheffersomyces stipitis* (xilose, xilitol e etanol) e da biomassa sob as condições de crescimento a) aeróbica e b) microaeróbica. 63

Figura 15. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *S. passalidarum* com as soluções padrão destes compostos, nas condições aeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) glicerol, b) xilose, c) xilitol, d) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), e) ribose-5-fosfato (R5P) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), f) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), g) glicerol-3-fosfato (Gly3P), h) dihidroxiacetona fosfato (DHAP), i) ácido pirúvico (PYR), j) ácido málico (L-MAL), k) ácido alfa cetoglutárico (AKG) e l) fosfo(enol)piruvato (PEP). 67

Figura 16. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *S. passalidarum* com as soluções padrão destes compostos, nas condições aeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilose, b) xilitol, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), d) ribose-5-fosfato (R5P) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), e) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), f) glicerol-3-fosfato (Gly3P), g)

| | |
|---|----|
| dihidroxiacetona fosfato (DHAP), h) ácido pirúvico (PYR), i) ácido málico (L-MAL), j) fosfo(enol)piruvato (PEP) e k) acetil co-enzima A (ACCOA)..... | 68 |
| Figura 17. Gráficos dos produtos da fermentação da xilose pela levedura <i>Spathaspora passalidarum</i> (xilose, xilitol e etanol) e da biomassa sob as condições de crescimento a) aeróbica e b) microaeróbica. | 69 |
| Figura 18. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura <i>S. arborariae</i> com as soluções padrão destes compostos, nas condições aeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilitol, b) xilose, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), d) ribose-5-fosfato (R5P) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), e) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), f) glicerol-3-fosfato (Gly3P), g) dihidroxiacetona fosfato (DHAP), h) ácido pirúvico (PYR), i) ácido málico (L-MAL), j) fosfo(enol)piruvato (PEP), k) acetil Co-enzima A (ACCOA)..... | 73 |
| Figura 19. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura <i>S. arborariae</i> com as soluções padrão destes compostos, nas condições microaeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilitol, b) xilose, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6- fosfato (F6P), d) ribulose-5-fosfato (Ru5P), e) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), f) glicerol-3-fosfato (Gly3P), g) ácido pirúvico (PYR), h) ácido málico (L-MAL), i) fosfo(enol)piruvato (PEP), j) acetil Co-enzima A (ACCOA). | 74 |
| Figura 20. Gráficos dos produtos da fermentação da xilose pela levedura <i>Spathaspora arborariae</i> (xilose, xilitol e etanol) e da biomassa sob as condições de crescimento a) aeróbica e b) microaeróbica..... | 75 |
| Figura 21. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura <i>C. tenuis</i> com as soluções padrão destes compostos, na condição aeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilose, b) xilitol, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), d) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), e) glicerol-3-fosfato (Gly3P), f) dihidroxi acetona fosfato (DHAP), g) ácido málico (L-MAL) e h) fosfo(enol)piruvato (PEP) e acetil co-enzima A (ACCOA)..... | 78 |
| Figura 22. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura <i>C. tenuis</i> com as soluções padrão destes compostos, nas condições microaeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilose, b) xilitol, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), d) ribose-5-fosfato (R5P) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), e) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), f) glicerol-3-fosfato (Gly3P), g) ácido málico (L-MAL) e h) acetil co-enzima A (ACCOA)..... | 79 |
| Figura 23. Gráficos dos produtos da fermentação da xilose pela levedura <i>Candida tenuis</i> (xilose, xilitol e etanol) e da biomassa sob as condições de crescimento a) aeróbica e b) microaeróbica. | 80 |

| | |
|--|-----|
| Figura 24. Esquema explicativo da análise estatística por ANOVA com medidas repetidas e design split-plot..... | 82 |
| Figura 25. Gráficos dos 3 pontos da fase exponencial de crescimento da levedura <i>S. stipitis</i> indicando a concentração final obtida no tratamento estatístico da quantificação das amostras nas condições microaeróbica (cinza escuro) e aeróbica (cinza claro)..... | 86 |
| Figura 26. Esquema simplificado do metabolismo central do carbono de xilose a etanol por levedura e concentrações de 13 metabólitos da levedura <i>S. stipitis</i> em condições aeróbicas (AO) e oxigênio limitado (OL). Vias metabólicas destacadas: assimilação de xilose oxidoreductiva (azul), via da pentose fosfato (verde), glicólise (vermelha) e ciclo do ácido tricarbóxico (roxo). As caixas pontilhadas indicam qual destes metabólitos são detectados pelo método HILIC e as caixas sólidas indicam as detectadas pelo método IPC..... | 88 |
| Figura 27. Gráficos dos 3 pontos da fase exponencial de crescimento da levedura <i>S. passalidarum</i> indicando a concentração final obtida no tratamento estatístico da quantificação das amostras nas condições microaeróbica (cinza escuro) e aeróbica (cinza claro)..... | 93 |
| Figura 28. Esquema simplificado do metabolismo central do carbono de xilose a etanol por levedura e concentrações de 14 metabólitos da levedura <i>S. passalidarum</i> em condições aeróbicas (AO) e oxigênio limitado (OL). Vias metabólicas destacadas: assimilação de xilose oxidoreductiva (azul), via da pentose fosfato (verde), glicólise (vermelha) e ciclo do ácido tricarbóxico (roxo). As caixas pontilhadas indicam qual destes metabólitos são detectados pelo método HILIC e as caixas sólidas indicam as detectadas pelo método IPC..... | 94 |
| Figura 29. Gráficos dos 3 pontos da fase exponencial de crescimento da levedura <i>S. arborariae</i> indicando a concentração final obtida no tratamento estatístico da quantificação das amostras nas condições microaeróbica (cinza escuro) e aeróbica (cinza claro)..... | 98 |
| Figura 30. Esquema simplificado do metabolismo central do carbono de xilose a etanol por levedura e concentrações de 13 metabólitos da levedura <i>S. arborariae</i> em condições aeróbicas (AO) e oxigênio limitado (OL). Vias metabólicas destacadas: assimilação de xilose oxidoreductiva (azul), via da pentose fosfato (verde), glicólise (vermelha) e ciclo do ácido tricarbóxico (roxo). As caixas pontilhadas indicam qual destes metabólitos são detectados pelo método HILIC e as caixas sólidas indicam as detectadas pelo método IPC..... | 99 |
| Figura 31. Correlação (R^2) entre fluxos calculados e medidos da levedura <i>S. stipitis</i> cujo metabólitos medidos são: DHAP (di-hidroxi-acetona-fosfato), (E4P) eritrose-4-fosfato), F6P (frutose-6-fosfato), G6P (glicose-6-fosfato), L-MAL (ácido málico), PEP (fosfo(enol)piruvato), PYR (piruvato), R5P (ribose-5-fosfato), RU5P (ribulose-5-fosfato), S7P (sedoheptulose-7-fosfato). O eixo X apresenta o fluxo calculado e o eixo Y o fluxo medido em mmol/gCDW.h ⁻¹ | 102 |

| | |
|---|-----|
| Figura 32. Correlação (R^2) entre fluxos calculados e medidos da levedura <i>S. arborariae</i> cujo metabólitos medidos são: ACCOA (acetil co-enzima A), DHAP (di-hidroxi-acetona-fosfato), (E4P) eritrose-4-fosfato), F6P (frutose-6-fosfato), G6P (glicose-6-fosfato), L-MAL (ácido málico), PEP (fosfo(enol)piruvato), PYR (piruvato), R5P (ribose-5-fosfato), RU5P (ribulose-5-fosfato), S7P (sedoheptulose-7-fosfato). O eixo X apresenta o fluxo calculado e o eixo Y o fluxo medido em mmol/gCDW.h ⁻¹ | 103 |
| Figura 33. Correlação (R^2) entre fluxos calculados e medidos da levedura <i>S. passalidarum</i> cujo metabólitos medidos são: ACCOA (acetil co-enzima A), DHAP (di-hidroxi-acetona-fosfato), (E4P) eritrose-4-fosfato), F6P (frutose-6-fosfato), G6P (glicose-6-fosfato), L-MAL (ácido málico), PEP (fosfo(enol)piruvato), PYR (piruvato), R5P (ribose-5-fosfato), RU5P (ribulose-5-fosfato), S7P (sedoheptulose-7-fosfato). O eixo X apresenta o fluxo calculado e o eixo Y o fluxo medido em mmol/gCDW.h ⁻¹ | 104 |
| Figura 34. Fluxo metabólico da levedura <i>S. stipitis</i> . Comparação da distribuição de carbono entre a taxa de fluxo calculada (linha superior) e medida (linha inferior). Os metabólitos intracelulares destacados em vermelho tiveram a concentração adicionada no modelo e foram validados através da simulação da taxa de fluxo medida. Os metabólitos externos tiveram as taxas de fluxo usadas como restrições. | 107 |
| Figura 35. Fluxo metabólico da levedura <i>S. arborariae</i> . Comparação da distribuição de carbono entre a taxa de fluxo calculada (linha superior) e medida (linha inferior). Os metabólitos intracelulares destacados em vermelho tiveram a concentração adicionada no modelo e foram validados através da simulação da taxa de fluxo medida. Os metabólitos externos tiveram as taxas de fluxo usadas como restrições. | 108 |
| Figura 36. Fluxo metabólico da levedura <i>S. passalidarum</i> . Comparação da distribuição de carbono entre a taxa de fluxo calculada (linha superior) e medida (linha inferior). Os metabólitos intracelulares destacados em vermelho tiveram a concentração adicionada no modelo e foram validados através da simulação da taxa de fluxo medida. Os metabólitos externos tiveram as taxas de fluxo usadas como restrições. | 109 |
| Figura 37. Concentração dos metabólitos intracelulares ($\mu\text{g/mL}$) no ponto central da fase de crescimento exponencial. | 111 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Gradiente cromatográfico usado na separação dos metabólitos pelo modo HILIC, fase móvel A: hidróxido de amônio 0.1% e B: acetonitrila + hidróxido de amônio 0.1%, a 60°C. | 45 |
| Tabela 2. Gradiente cromatográfico usado na separação dos metabólitos pelo modo IPC, fase móvel A: Tributilamina 5 mM + Ácido Acético 10 mM + 5% MeOH e B: MeOH, a 45°C. | 45 |
| Tabela 3. Parâmetros do espectrômetro de massas, voltagem do cone (V), valores de m/z Q1 e Q3 e energia de colisão (eV), otimizados para cada metabólito para a realização dos experimentos de MRM. | 52 |
| Tabela 4. Parâmetros analíticos para a quantificação de 19 metabólitos alvos da via de assimilação da xilose: coeficientes de regressão (R^2), intervalo de curva de calibração, limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ). | 55 |
| Tabela 5. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura <i>S. stipitis</i> nos pontos de coleta (22h, 26h e 29h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e C), sob condição aeróbica. | 59 |
| Tabela 6. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura <i>S. stipitis</i> nos pontos de coleta (20h, 28h e 40h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e C), sob condição microaeróbica. | 60 |
| Tabela 7. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura <i>S. passalidarum</i> nos pontos de coleta (9h, 13h e 21h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e C), sob condição aeróbica. | 65 |
| Tabela 8. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura <i>S. passalidarum</i> nos pontos de coleta (40h, 45h e 55h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração, sob condição microaeróbica. | 66 |
| Tabela 9. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura <i>S. arborariae</i> nos pontos de coleta (17h, 22h e 26h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e C) sob condição aeróbica. | 70 |
| Tabela 10. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura | 72 |
| Tabela 11. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura <i>C. tenuis</i> nos pontos de coleta (44h, 76h e 83h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e C), sob condição aeróbica. | 76 |
| Tabela 12. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura <i>C. tenuis</i> nos pontos de coleta (49h, 67h e 94h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e c), sob condição microaeróbica. ... | 77 |
| Tabela 13. Concentração dos metabólitos quantificados em amostras de <i>S. stipitis</i> após tratamento estatístico sob condição aeróbica, nos três tempos de coleta com os respectivos desvios padrão relativo (RSD) para n=3. | 83 |

| | |
|--|----|
| Tabela 14. Concentração dos metabólitos quantificados em amostras de <i>S. stipitis</i> após tratamento estatístico sob condição microaeróbica, nos três tempos de coleta com os respectivos desvios padrão relativo (RSD) para n=3. | 84 |
| Tabela 15. Nível de significância do modelo ANOVA para a levedura <i>S. stipitis</i> indicando o efeito do p-valor para condição de crescimento (Fator A), tempo de coleta (Fator B) e interação entre os fatores A e B (IAB). | 85 |
| Tabela 16. Concentração dos metabólitos quantificados em amostras de <i>S. passalidarum</i> após tratamento estatístico sob condição aeróbica, nos três tempos de coleta com os respectivos desvios padrão relativo (RSD) para n=3. | 90 |
| Tabela 17. Concentração dos metabólitos quantificados em amostras de <i>S. passalidarum</i> após tratamento estatístico sob condição microaeróbica, nos três tempos de coleta com os respectivos desvios padrão relativo (RSD) para n=3. | 91 |
| Tabela 18. Nível de significância do modelo ANOVA para a levedura <i>S. passalidarum</i> indicando o efeito do p-valor para condição de crescimento (Fator A), tempo de coleta (Fator B) e interação entre os fatores A e B (IAB). | 92 |
| Tabela 19. Concentração dos metabólitos quantificados em amostras de <i>S. arborariae</i> após tratamento estatístico sob condição aeróbica, nos três tempos de coleta com os respectivos desvios padrão relativo (RSD) para n=3. | 95 |
| Tabela 20. Concentração dos metabólitos quantificados em amostras de <i>S. arborariae</i> após tratamento estatístico sob condição microaeróbica, nos três tempos de coleta com os respectivos desvios padrão relativo (RSD) para n=3. | 96 |
| Tabela 21. Nível de significância do modelo ANOVA para a levedura <i>S. arborariae</i> indicando o efeito do p-valor para condição de crescimento (Fator A), tempo de coleta (Fator B) e interação entre os fatores A e B (IAB). | 97 |

LISTA DE ABREVIATURAS

Aald – Acetaldeído

ACCOA – Acetil Co-enzima A

ACN – Acetonitrila

AKG – Ácido Alfaacetoglutárico

CE - Cromatografia Eletroforese (do inglês, *Capillary Electrophoresis*)

CE-MS - Cromatografia eletroforese capilar acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês, *Capillary Electrophoresis Chromatography - Mass Spectrometry*)

CG – Cromatografia Gasosa (do inglês, *Gas Chromatography*)

DHAP– Dihidroxi Acetona Fosfato

DIMS – Infusão direta por Espectrometria de Massas (do inglês, *Direct Infusion Mass Spectrometry*)

ESI – Ionização por *Electrospray* (do inglês, *Electrospray ionization*)

ESI-MS - Ionização por *Electrospray* e detecção por Espectrometria de massas (do inglês, *Electrospray ionization- Mass Spectrometry*)

F6P– Frutose-6-fosfato

FE – Fase Estacionária

Femtomol – 10^{-15} mol

FM – Fase Móvel

G6P – Glicose-6-fosfato

GAP – Gliceraldeído-3-fosfato

GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês, *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*)

HILIC – Cromatografia por Interação Hidrofílica (do inglês, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*)

IEC – Cromatografia por Troca Iônica (do inglês, *Ion Exchange Chromatography*)

IPC – Cromatografia por Pareamento Iônico (do inglês, *Ion Pair Chromatography*)

LC – Cromatografia Líquida (do inglês, *Liquid Chromatography*)

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês, *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*)

L-MAL– Ácido Málico

MFA – Análise de Fluxo Metabólico

MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*)

MS – Espectrometria de Massas (do inglês, *Mass Spectrometry*)

Oaa – Ácido Oxaloacético

PEP – Fosfo(enol)piruvato

Picomol – 10^{-12} mol

PYR – Piruvato de sódio

R5P – Ribose-5-fosfato

RU5P – Ribulose-5-fosfato

RSD – Desvio padrão relativo

TBA – Tributilamina

TEA – Trietilamina

TIC – Cromatograma de íons totais (do inglês, *Total Ion Chromatogram*)

UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (do inglês, *Ultrahigh Performance Liquid Chromatography*)

UHPLC-MS – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada a espectrometria de massas (do inglês, *Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

RESUMO

Um dos desafios na produção do etanol de segunda geração (2G) está no desenvolvimento de leveduras eficientes para converter xilose em etanol no processo de fermentação de açúcares. Desta forma, a análise abrangente do metabolismo de leveduras fermentadoras de xilose é essencial para facilitar a identificação dos fatores limitantes no metabolismo de conversão desta pentose e, assim, auxiliar na construção de linhagens modificadas geneticamente mais eficientes. O objetivo deste trabalho foi utilizar uma ferramenta analítica avançada, a metabolômica, para quantificar os principais metabólitos relacionados às vias de conversão da xilose a etanol em quatro espécies de leveduras fermentadoras de xiloses: *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae* e *Candida Tenuis*. As leveduras foram cultivadas em xilose sob duas diferentes condições de crescimento, aeróbica e microaeróbica. O preparo de amostra para análise metabolômica incluiu as etapas de *quenching* e extração dos metabólitos, e para tal foram utilizados os protocolos de metanol gelado e etanol fervente, respectivamente. A quantificação dos metabólitos foi realizada por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas *tandem* (UHPLC-MS/MS), utilizando cromatografia de par iônico e a cromatografia líquida de interação hidrofílica. Os dados obtidos na quantificação foram processados e tratados através da análise de variância (ANOVA) utilizando o *software* RStudio. Um total de onze metabólitos da via do metabolismo da xilose foram quantificados e validados através da análise de fluxo metabólico (MFA) com $R^2 > 90$. Estes metabólitos foram utilizados para a construção do fluxo metabólico das três espécies de leveduras analisadas (*Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum* e *Spathaspora arborariae*). A comparação de alvos moleculares nas leveduras fermentadoras de xilose mostrou que as espécies *S. stipitis* e *S. passalidarum* tem os melhores rendimentos de produção de etanol quando crescidas com oxigênio limitado. A análise metabolômica realizada neste estudo poderá auxiliar no melhoramento genético destes microrganismos e na produção de etanol 2G.

Palavras-Chave: Metabolômica, Espectrometria de massas, Cromatografia Líquida, Biotecnologia e Leveduras.

ABSTRACT

One of the challenges in the production of second generation (2G) ethanol is in the development of efficient yeasts to convert xylose into ethanol in the process of fermenting sugars. Thus, the comprehensive analysis of xylose fermenting yeast metabolism is essential to facilitate the identification of the limiting factors in the conversion metabolism of this pentose and, thus, help in the construction of more efficient genetically modified strains. The objective of this work was to use an advanced analytical tool, the metabolomics, to quantify the main metabolites related to the xylose to ethanol conversion pathways in four species of yeast xyloses: *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae* and *Candida Tenuis*. The yeasts were grown in xylose under two different growth conditions, aerobic and microaerobic. The preparation of the sample for metabolic analysis included the steps of quenching and extraction of the metabolites, for which the protocols of ice cold methanol and boiling ethanol, were used, respectively. The quantification of the metabolites was performed by ultra high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/ MS), using ion-pair chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography. The data obtained in the quantification were processed and treated through analysis of variance (ANOVA) using RStudio software. A total of eleven metabolites of the xylose metabolism pathway were quantified and validated through metabolic flow analysis (MFA) with $R^2 > 90$. These metabolites were used to construct the metabolic flow of the three species of yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum* and *Spathaspora arborariae*) analyzed. The comparison of molecular targets in yeast xylose showed that the *S. stipitis* and *S. passalidarum* species have the best yields of ethanol when grown with limited oxygen. The metabolomic analysis performed in this study may help in the genetic improvement of these microorganisms and in the production of 2G ethanol.

Keywords: Metabolomics, Mass Spectrometry, Liquid Chromatography, Biotechnology e Yeasts.

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Aproveitamento da xilose para produção de Etanol 2G

A conversão de xilose em etanol por leveduras é um dos maiores obstáculos a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, também denominado etanol de segunda geração (Etanol 2G)¹. A xilose é o segundo açúcar mais abundante da biomassa lignocelulósica, chegando, a 33% do total de açúcares fermentescíveis em bagaço de cana-de-açúcar, um subproduto da produção de etanol de primeira geração. Portanto a sua utilização é de grande importância econômica e ambiental para as usinas sucroalcooleiras ².

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo mundialmente utilizado na indústria para produção de etanol, é incapaz de converter pentoses, tais como xilose, a etanol ³. Portanto, estratégias de biotecnologia microbiana tem sido utilizadas afim de melhorar a capacidade de fermentação da xilose por leveduras, e dentre as principais estão: i) a identificação de linhagens naturalmente capazes de fermentar xilose; e ii) o desenvolvimento de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* ⁴.

A identificação de novas linhagens naturalmente capazes de fermentar xilose pode facilitar a compreensão e identificação dos fatores limitantes para o metabolismo de xilose. De fato, espécies de leveduras, tais como *Scheffersomyces stipitis* (previamente conhecida como *Pichia stipitis*), *Candida shehatae*, *Candida tenuis*, *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora passalidarum* e *Pachisolen tannophilus*, naturalmente consomem e fermentam xilose, e diversos estudos têm sido realizados para melhorar a compreensão do metabolismo de pentoses nestas espécies, culminando na recente análise genômica comparativa e evolutiva de leveduras fermentadoras de xilose⁵.

Um dos obstáculos no metabolismo de xilose reportado na literatura é a conversão eficiente da xilose em xilulose (Figura 1). O metabolismo da xilose por leveduras ocorre em duas etapas (1) redução da xilose em xilitol pela xilose redutase (XR) e (2) oxidação do xilitol em xilulose pela xilitol desidrogenase (XDH). Assim, linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* obtidas pela expressão das enzimas XR (xilose redutase) e XDH (xilitol desidrogenase, via oxido-redutiva) ou XI (via da xilose isomerase), são capazes de produzir

etanol⁶. Estas enzimas são responsáveis pela conversão de xilose a xilulose, um metabólito que a levedura é capaz de metabolizar ⁷.

Tanto as leveduras naturalmente fermentadoras de xilose quanto as linhagens construídas pela simples expressão desses genes são capazes de produzir etanol, entretanto, com baixo rendimento. Isso ocorre porque na via oxidoreductiva, a xilose é reduzida a xilitol pela enzima XR dependente de NAD(P), em seguida ocorre a oxidação do xilitol a xilulose pela enzima XDH dependente de NAD⁺, desta forma a regeneração de coenzimas NAD(P) durante a conversão de xilose em xilulose é incompleta, causando um desequilíbrio entre NAD(H) e NADP(H) que por sua vez, leva a um alto rendimento de xilitol e o bloqueio do metabolismo da xilose (Figura 1) ^{5,8}.

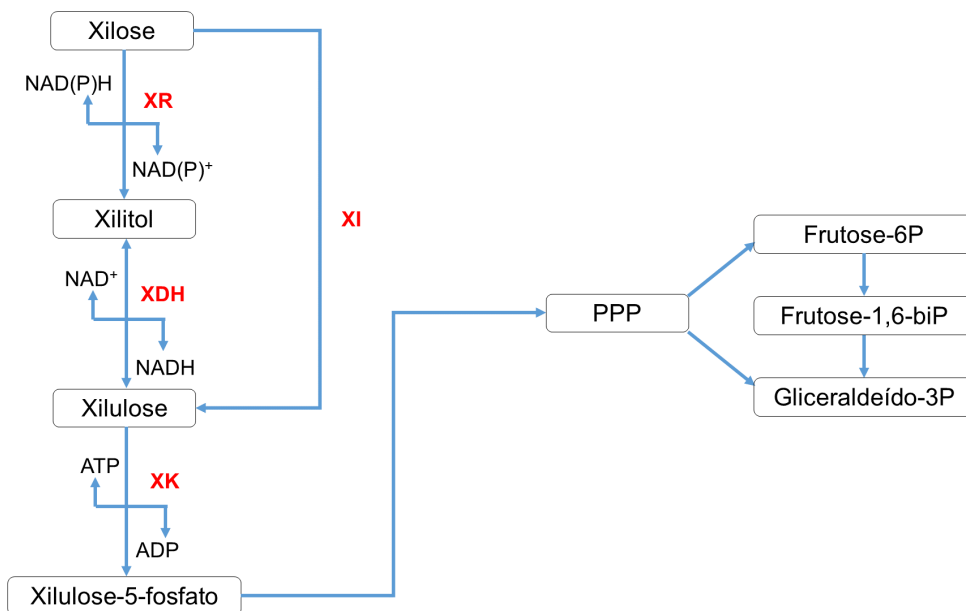


Figura 1. Esquema simplificado da via de conversão da xilose por leveduras (adaptado de Moysés *et al*, 2016)⁹.

Apesar dos avanços no desenvolvimento de leveduras para fermentação de xilose, outras modificações ainda são necessárias, já que as taxas de fermentação e rendimentos de etanol ainda precisam ser aumentadas¹⁰. Desta forma, a identificação de alvos moleculares para subsidiar programas de melhoramento genético torna-se essencial para o desenvolvimento de linhagens produtoras de etanol 2G.

As principais abordagens para o melhoramento genético de leveduras envolvem a coleta, análise e integração quantitativa de dados biológicos em larga escala através de ferramentas ÔMICAS (genômica, transcriptômica, proteômica, fluxomia e metabolômica). A integração dos dados de metabolômica destas espécies associada aos dados genômicos já disponíveis¹¹⁻¹⁵ pode ajudar na construção de modelos mais relevantes e preditivos a fim de identificar as etapas limitantes no metabolismo da xilose por leveduras ¹⁶.

1.2 Metabolômica de leveduras

A tecnologia baseada em metabolômica mostra-se atraente, pois é capaz de identificar e quantificar os metabólitos presentes em um sistema biológico ¹⁷. O Metaboloma é definido como um conjunto de moléculas de baixo peso molecular, produzidas e modificadas por um organismo vivo, os metabólitos, que são quimicamente transformados durante o metabolismo proporcionando uma leitura funcional do estado celular ^{18,19}. Desta forma, uma variação no sistema biológico pode ser identificada através de alterações no fluxo dos metabólitos ²⁰.

A complexidade da metabolômica frente às outras abordagens ômicas consiste na grande variedade química dos compostos que compõe o metaboloma, os quais incluem álcoois, cetonas, aminoácidos, carboidratos, dentre outros. Esta complexidade impossibilita a utilização de uma única plataforma analítica e a determinação simultânea de todos os metabólitos presentes em uma célula ou organismo, sendo necessária a integração de várias técnicas de análise¹⁹. A escolha da melhor estratégia de análise metabolômica deve ser realizada de acordo com os metabólitos e a via metabólica de interesse, ou com a questão biológica a ser respondida. Outro desafio em metabolômica é o processamento de dados, uma vez que uma grande quantidade de informações é gerada em uma única análise²¹. Portanto, é necessária a utilização de programas computacionais para processamento e análise dos dados, além da utilização de bancos de dados específicos.

A metabolômica possui duas principais abordagens: análise direcionada (*targeted*) e análise não direcionada (*untargeted*). A análise *targeted* consiste

na quantificação de metabólitos alvo, cujo objetivo é responder a questões bioquímicas ou hipóteses específicas de uma ou mais vias metabólicas, enquanto que a análise *untargeted* proporciona uma visão global dos metabólitos presentes no sistema. A metabolômica *targeted* permite a quantificação dos metabólitos presentes nas vias de fermentação (glicólise, pentose fosfato (PPP) e ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)) de xilose por leveduras²². Estes dados podem auxiliar grandemente a construção de redes metabólicas e regulatórias específicas das vias de utilização de pentoses nestas espécies.

A fim de investigar tais vias metabólicas específicas algumas etapas para o estudo da metabolômica devem ser seguidos, tais como: i) otimização do preparo de amostra, ii) escolha da plataforma analítica mais adequada, iii) processamento e iv) análise dos dados (Figura 2).

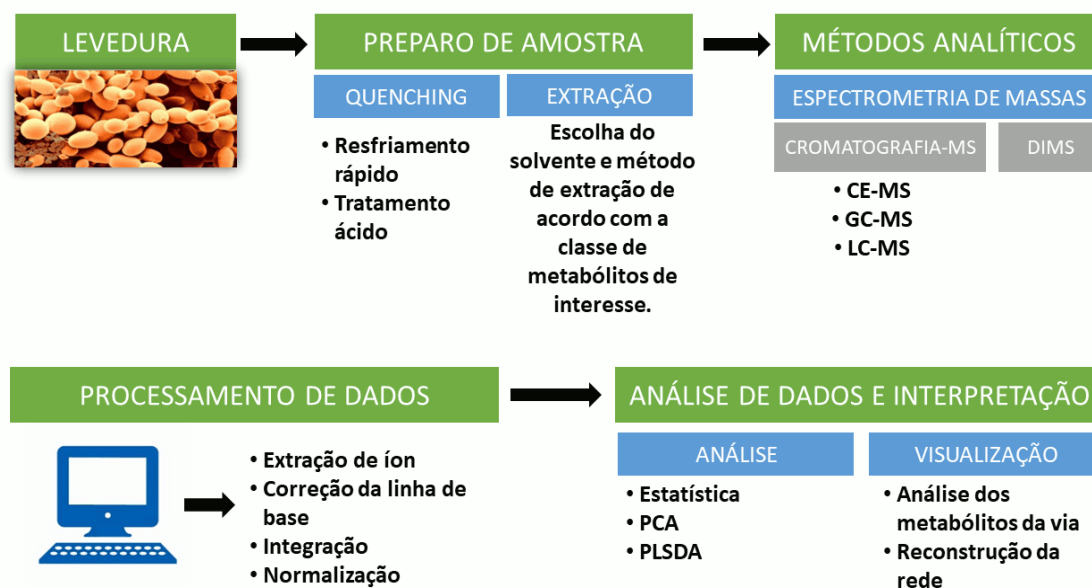


Figura 2. Visão geral de um fluxo de trabalho para um experimento de metabolômica de leveduras (Adaptado de Abdelnur *et al*, 2011)²³.

1.2.1 Preparo de amostra em metabolômica de leveduras

O preparo de amostra é um dos fatores determinantes para a obtenção de dados representativos e reprodutíveis em metabolômica, e é dependente do

organismo em estudo. O tempo de conversão de muitos intermediários das reações metabólicas é da ordem de milissegundos, portanto, a rápida interrupção da atividade celular (*quenching*) após a amostragem torna-se necessária para evitar grandes variações na composição metabólica das amostras²⁴.

A etapa subsequente a interrupção da atividade celular, é importante para tornar os metabólitos presentes na célula, disponíveis para análise, esta deve ser realizada com o mínimo de perdas, tendo em vista que a degradação pode contribuir para alterar o nível e a estrutura química dos metabólitos na amostra. O método mais utilizado para obtenção dos metabólitos é a extração²⁵. Durante a extração as paredes celulares são rompidas química, térmica ou mecanicamente para a passagem dos metabólitos para a fase líquida. Esta etapa é a mais longa, sendo inevitáveis as perdas decorrentes do processo, principalmente devido à alta diversidade química e a ampla faixa dinâmica das concentrações dos metabólitos.

De maneira geral, o preparo de amostra em metabolômica envolve dois procedimentos principais: a interrupção da atividade metabólica (*quenching*) e a extração. Na Figura 3 é apresentado o fluxo de trabalho envolvendo estas duas etapas. Após a otimização destes protocolos, os metabólitos extraídos são recuperados e podem ser analisados por diferentes métodos analíticos.

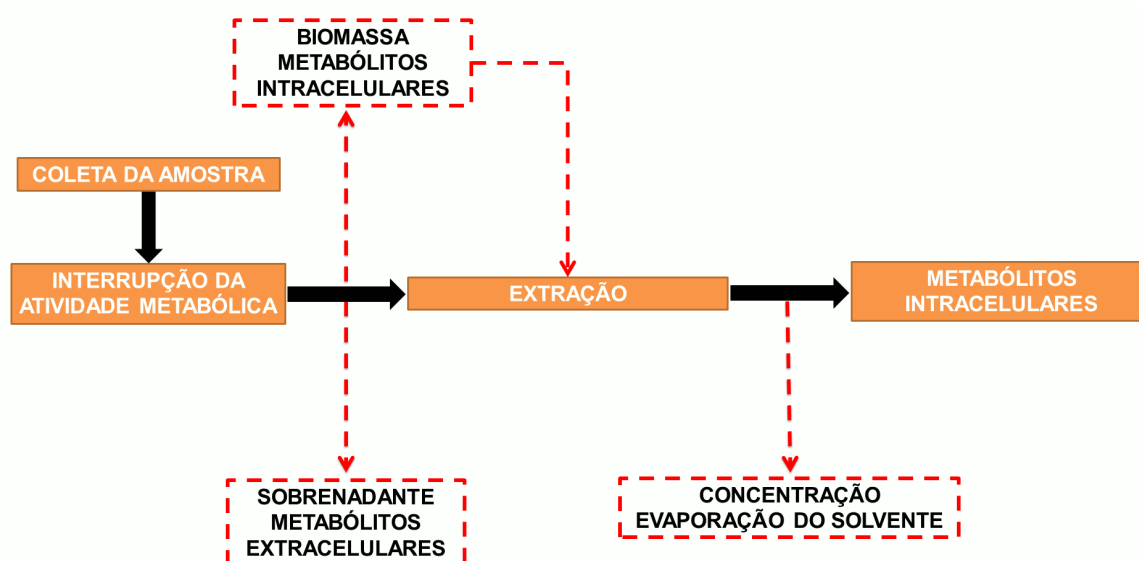


Figura 3. Fluxo de trabalho geral para o preparo de amostra em metabolômica targeted de leveduras para análise de metabólitos intracelulares.

A rápida inativação do metabolismo é geralmente alcançada através de mudanças bruscas de temperatura ou pH, ou ainda após a submissão da amostra a temperaturas muito baixas ($< -20^{\circ}\text{C}$)²⁶. De maneira geral, duas estratégias podem ser utilizadas para a realização do preparo de amostra em metabolômica: i) combinar as etapas de interrupção da atividade metabólica e extração; e ii) realizar a interrupção da atividade metabólica seguido da separação da biomassa, sendo esta última particularmente interessante para metabolômica de microrganismos, pois minimiza a interferência de metabólitos extracelulares, desde que o método escolhido seja confiável para evitar a extrusão dos metabólitos intracelulares antes do processo de extração.

Os métodos para a interrupção da atividade metabólica (*quenching*) mais utilizados na metabolômica consistem no uso de uma solução de metanol gelado, com diferentes proporções de metanol e água, utilizando temperaturas que variam de -20 a -40°C ^{24,27}. A vantagem deste método é que a membrana celular é mantida intacta, tornando possível a separação dos metabólitos extracelulares dos intracelulares após o procedimento. Outro método utilizado é a filtração rápida, que tem a vantagem de realizar a interrupção da atividade metabólica e a extração dos metabólitos em uma única etapa²⁸.

A obtenção dos metabólitos em uma amostra biológica pode ser alcançada através de altas temperaturas, pH extremo, solventes orgânicos, por ação mecânica ou pela combinação de todos esses fatores. Há três requisitos essenciais que um método ideal de extração de metabólitos deve cumprir: (i) a integridade da extração, para garantir que todos os metabólitos intracelulares estejam inteiramente acessível para análise; (ii) prevenção de conversão de metabólito durante a extração ou etapas subsequentes, principalmente por assegurar a inativação eficaz de enzimas; e (iii) ausência de extensa degradação dos metabolitos pelo próprio processo. No que diz respeito a este último requisito, as perdas parciais podem ser aceitáveis se os resultados puderem ser corrigidos por meio de fatores de recuperação ou através da utilização de padrões internos adequados²⁹.

Diferentes métodos de extração dos metabólitos intracelulares são utilizados em metabolômica de microrganismos, sendo os principais: metanol

puro (PM, do inglês *Pure Methanol*), etanol fervente (BE, do inglês *Boiling Ethanol*), metanol/clorofórmio (CM, do inglês *Methanol/ Chloroform*), água quente (HW, do inglês *Hot Water*), hidróxido de potássio (KOH), ácido perclórico (PCA, do inglês *Perchloric Acid*), congelamento e descongelamento em metanol (FTM, do inglês *Freezing-Thawing in Methanol*) e acetonitrila/metanol ácidos (AANM, do inglês *Acidic Acetonitrile-Methanol*)³⁰. A escolha do método de extração depende do tipo de amostra e do objetivo do estudo.

Neste estudo, a interrupção da atividade celular foi realizada através do método solução de metanol gelado (- 40°C) seguido do método de extração, etanol fervente, esta escolha se deve principalmente a alta polaridade da maior parte dos metabólitos de interesse.

1.2.2 Técnicas analíticas avançadas para análise metabolômica

A identificação e quantificação de uma variedade significativa de metabólitos (polares, não-polares, voláteis, entre outros) provenientes do extrato celular complexo, com concentração estimada na faixa de pmol a mmol, torna necessário a seleção e utilização de metodologias específicas capazes de analisar simultaneamente uma grande quantidade de metabólitos com alta sensibilidade e seletividade. Diversas abordagens analíticas são empregadas em metabolômica, sendo a ressonância magnética nuclear (do inglês, *Nuclear Magnetic Resonance* - NMR) e a espectrometria de massas (do inglês, *Mass Spectrometry* - MS), as mais utilizadas²². As técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas têm sido uma excelente opção para a análise de misturas complexas e por isso vêm sendo usada frequentemente na metabolômica.

A técnica de NMR é empregada principalmente para elucidação estrutural de metabólitos, sendo altamente seletiva, reprodutível e quantitativa. No entanto, ainda há algumas limitações quando se trata de amostras biológicas complexas. A resolução limitada e sensibilidade da NMR, juntamente com as dificuldades associadas à identificação de metabólitos desconhecidos (particularmente para os compostos em baixa concentração) representam um grande desafio para desvendar a complexidade das misturas biológicas. Estes

desafios têm restringido o número e a precisão quantitativa dos metabólitos analisados²⁶.

A MS é uma técnica de detecção utilizada na identificação de moléculas de diferentes pesos moleculares e estruturas baseado na relação massa/carga (m/z) de seus íons. Esta ferramenta possui grande potencial para estudo metabólico de vários organismos, principalmente devido à alta sensibilidade, com detecção de metabólitos na faixa de picomols e femtomols, seletividade, e facilidade na preparação e manipulação de amostra.

Experimentos de MS podem ser realizados utilizando diferentes espectrômetros de massas, os quais são compostos basicamente por: i) sistema de infusão de amostra; ii) fonte de ionização; iii) analisador de massas; iv) detector e v) sistema para armazenamento e processamento dos dados.

O sistema de inserção de amostra pode ser realizado por infusão direta (DIMS, do inglês *Direct infusion mass spectrometry*) ou com a separação prévia dos compostos, normalmente, utilizando métodos cromatográficos. Entre as fontes de ionização mais utilizadas em análise metabólica *targeted* está a ESI (ionização por eletrospray, do inglês *electrospray ionization* - ESI). Esta é uma técnica de ionização branda, que produz íons carregados em solução produzidos através da aplicação de um campo elétrico, sob pressão atmosférica, gerado por uma diferença de potencial. A principal vantagem do *electrospray* é a baixa temperatura de dessolvatação (≤ 80 °C) que minimiza a fragmentação das moléculas na fonte. Além disso as amostras a serem analisadas são introduzidas em solução, o que faz com que seja possível o acoplamento de técnicas de separação, como a cromatografia líquida³¹.

O espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo (QqQ, do inglês *triple quadrupole*) tem sido o mais utilizado para a quantificação de metabólitos pois oferecem maior sensibilidade e reprodutibilidade^{32,33}. O analisador quadrupolar (Q) é acoplado a uma câmara de colisão (q) preenchida com um gás inerte, a qual é conectada a um segundo quadrupolo (Q)³¹.

Em geral para a utilização do QqQ em metabólica *targeted* é necessário otimizar a energia de colisão e a razão m/z do íon fragmento para cada metabólito de interesse a fim de obter o sinal mais intenso. Após esta etapa os compostos são então analisados utilizando a abordagem de

monitoramento de reações múltiplas (*Multiple Reaction Monitoring* – MRM). Esta técnica é mais seletiva tendo em vista que o primeiro quadrupolo seleciona o íon precursor de interesse, este é então fragmentado no segundo quadrupolo, e o terceiro quadrupolo direciona o íon fragmento pré-otimizado. As análises por DIMS fornecem a identificação estrutural de uma gama de compostos químicos, e a partir de equipamentos de alta resolução, é possível obter massa e medidas exatas. Sendo assim, a DIMS pode ser utilizada na metabolômica como uma ótima ferramenta de *screening*, possibilitando uma visão global dos metabólitos presentes no organismo em estudo, tendo em vista que alta sensibilidade da MS permite níveis de detecção de metabólitos. Embora esta técnica seja muito abrangente, análises por DIMS são suscetíveis à supressão iônica, dificultando a identificação de alguns metabólitos que apresentem baixa ionização. Outra desvantagem é a incapacidade de distinguir isômeros estruturais ou estereoisômeros.

A separação cromatográfica dos metabólitos antes da análise por MS reduz o efeito de matriz e supressão iônica, e é capaz de separar os isômeros, além de fornecer maior exatidão na quantificação dos metabólitos. Atualmente existem três técnicas cromatográficas, que acopladas a MS, tem sido de grande auxílio na análise metabolômica são estas: eletroforese capilar (do inglês, *Capillary Electrophoresis* - CE), cromatografia gasosa (do inglês, *Gas Chromatography* - GC) e cromatografia líquida (do inglês, *Liquid Chromatography* - LC).

A cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (do inglês *Ultra high liquid chromatography - mass spectrometry* – UHPLC-MS), utiliza colunas cromatográficas com partículas $\leq 2 \mu\text{m}$, permite análises eficientes de alto rendimento, reduzindo o uso de solventes, melhorando a resolução do pico e conseqüentemente a separação de metabólitos³⁴. Entre os principais métodos cromatográficos utilizados pra experimentos de metabolômicas destacam-se, a cromatografia por pareamento iônico (do inglês, *ion pair chromatography* – IPC) que utiliza fase estacionária hidrofóbica e a cromatografia por interação hidrofílica (do inglês, *hydrophilic interaction liquid chromatography* – HILIC) que envolve o uso de fases estacionárias polares³⁵.

O modo IPC depende da adição de um contra-íon na fase móvel, a fim de promover a formação de pares iônicos com analitos carregados. Esses reagentes são geralmente compostos iônicos que contêm uma cadeia alquílica que confere certa hidrofobicidade para que o par iônico possa ser retido em uma coluna de fase reversa. O reagente IP interage com a fase estacionária aumentando a seletivamente e a retenção de analitos carregados³⁶.

A cromatografia HILIC envolve o uso de fases estacionárias polares como a sílica quimicamente modificada, ligadas a grupos orgânicos como: amina, amida, diol, ciano entre outros. Os compostos são separados principalmente por uma fase móvel orgânica e os analitos são eluídos em ordem decrescente de hidrofobicidade. As moléculas de água são atraídas pelos grupos polares dos diferentes tipos de fase estacionária formando uma camada aquosa sobre a superfície. A partição dos analitos entre a fase móvel (hidrofóbica) e a camada aquosa imobilizada constitui o maior mecanismo de retenção da HILIC³⁷.

1.2.3 Processamento dos dados em metabolômica

A etapa de processamento de dados ocorre após o espectro bruto ser adquirido e serve como a ligação entre os dados brutos e a análise estatística³⁸. Assim, como é necessário utilizar instrumentos sensíveis e seletivos, para a obtenção de dados de qualidade, *softwares* eficientes são essenciais para o processamento dos dados gerados nestes experimentos. Vários métodos automáticos, já incluídos nos softwares do fabricante do equipamento, auxiliam neste processo.

Em geral, o processamento de dados inclui a redução do ruído, correção da linha de base, alinhamento, normalização dos picos, e deconvolução do espectro. Para a remoção dos ruídos foram desenvolvidos vários algoritmos os quais são atualmente implementados tanto em *softwares* comercial quanto naqueles acessíveis ao público³⁹.

A correção de linha de base é um procedimento para corrigir a distorção na linha de base causada por artefatos sistemáticos, com este procedimento algumas das regiões espectrais indesejadas podem ser removidas, como água e outros contaminantes.

O alinhamento possibilita que todos os picos correspondentes ou sinais em diferentes amostras sejam alinhados ou agrupados para permitir a comparação adequada dos metabólitos⁴⁰.

A normalização é utilizada para corrigir variações sistemáticas decorrentes das análises cromatográficas, como, por exemplo, pequenas flutuações nos tempos de retenção durante as análises e fatores de diluição das amostras ³⁸.

A deconvolução é utilizada para separar compostos co-eluídos ou sobrepostos, após este procedimento é necessário definir, integrar e quantificar os picos correspondentes aos compostos individuais.

Um experimento de metabolômica envolve um grande número de amostras e conseqüentemente está sujeito a muitas variações, tais como o instrumento ou desempenho da coluna cromatográfica, composição do tampão, a complexidade da matriz, ou condições ambientais, flutuação no tempo de retenção entre outros. Desta forma a correção destas variações é muito importante para comparar as mesmas características em um conjunto de dados, apenas após estas etapas é possível analisar e interpretar os dados.

1.2.4 Análise dos dados em metabolômica

O grande volume de dados gerados em um experimento de metabolômica impulsionou a utilização e o desenvolvimento de *softwares*, ferramentas estatísticas e bancos de dados, para auxiliar no entendimento dos processos metabólicos em um sistema biológico, bem como armazenar sistematicamente estas informações.

Existem duas abordagens principais para a análise estatística de dados metabólicos: quimiometria e metabolômica quantitativa. Para o primeiro, a análise estatística é realizada diretamente sob os espectros obtidos e a intensidade do sinal, sendo os metabólitos identificados na última etapa, se necessário. Já para a metabolômica quantitativa, identifica-se todos os metabólitos primeiro e a análise estatística é realizada posteriormente sob estes dados. Apesar disso os métodos utilizados para essas diferentes abordagens são bastante similares.

As principais ferramentas utilizadas em metabolômica para facilitar a interpretação dos dados, são: análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*), análise de agrupamento hierárquico (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*), mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *Partial Least-Squares*), análise de variância (ANOVA, do inglês *Analysis of Variance*) e ANOVA - análise de componentes simultâneo (ASCA, do inglês *Simultaneous Component Analysis*).³⁹

Apesar das muitas opções para a análise estatística dos dados, variáveis, como a concentração de metabólitos, podem mudar com o tempo, criando assim uma dimensão de tempo no conjunto de dados. Embora seja possível usar ferramentas de visualização como PCA e HCA, por exemplo, a comparação de perfis metabólicos entre diferentes grupos exigem métodos estatísticos diferentes destes citados acima. Entre os diversos métodos estatísticos que podem ser usados para analisar os dados ao longo do tempo, os métodos baseados na análise de variância (ANOVA) são utilizados com frequência em experimentos químicos ou biológicos ⁴¹.

A ANOVA avalia a importância de um ou mais fatores, comparando as médias de variáveis de resposta nos diferentes níveis de fator ⁴². A utilização da ANOVA com medidas repetidas permite testar se os perfis temporais da concentração dos metabólitos são significativamente diferentes sob diferentes condições experimentais. Após a utilização de ferramentas de análise estatística os dados metabólicos mais relevantes são incorporados nas vias bioquímicas²³.

A análise de fluxo metabólico (do inglês, *Metabolic flux analysis* - MFA) é uma metodologia baseada em medidas de velocidades específicas extracelulares, assumindo-se estado estacionário (ou pseudo-estacionário) para os metabólitos intracelulares e um modelo estequiométrico para o metabolismo examinado⁴³.

A MFA fornece uma visão geral sobre como o metabolismo é equilibrado, ou seja, como os organismos convertem substratos em biomassa e produtos^{44,45}. Assim, esta análise é usada para a previsão de possíveis limitações metabólicas, permitindo uma melhor compreensão de um determinado metabolismo, a fim de melhorá-lo em direção a um composto de interesse ⁴⁶. As redes metabólicas construídas para MFA geralmente usam as

informações disponíveis a partir da anotação do genoma. Para cada rede metabólica definida, um conjunto de reações é definido e convertido em um modelo matemático.

A principal vantagem do uso de concentrações de metabólitos intracelulares nas análises de MFA, é que essas medidas intracelulares estão diretamente ligadas à rede de reações metabólicas e refletem o fenótipo do organismo naquele momento^{12,47}. Assim, a combinação das abordagens MFA e metabolômica é uma estratégia valiosa para prever fluxos metabólicos precisos e para entender o comportamento do metabolismo biológico de leveduras.

1.3 Contribuição da metabolômica no melhoramento de leveduras fermentadoras de xilose

A Biologia Sistêmica é uma abordagem multidisciplinar que inclui a coleta, análise e integração quantitativa de dados biológicos de genômica funcional (genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, fluxoma), permitindo a construção de modelos matemáticos biologicamente relevantes e preditivos⁴⁸.

Abordagens sistêmicas têm sido aplicadas, juntamente com estratégias de engenharia metabólica, genômica funcional e engenharia evolutiva no desenvolvimento de linhagens microbianas (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) e bioprocessos para a produção de fármacos, matérias-primas e produtos de química fina, combustíveis e polímeros, e outros materiais⁴⁹⁻⁵¹.

De fato, um dos exemplos concretos mais significativos da aplicação da biologia sistêmica para identificação efetiva e modificação de novos alvos de melhoramento genético foi o aumento da eficiência da capacidade fermentativa em linhagens de *S.cerevisiae* na produção de etanol⁵².

Mais especificamente, a utilização da reconstrução metabólica em escala genômica de *S. cerevisiae* permitiu investigar e validar experimentalmente diferentes estratégias e modelagens para manipulação do metabolismo redox, levando a uma diminuição da produção de xilitol e aumento do rendimento de etanol em glicose como única fonte de carbono sob condições de anaerobiose^{52,53}.

O metabolismo do carbono central, que inclui as vias da glicólise, pentose fosfato (PPP), e o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), são as principais vias a partir da qual os fluxos metabólicos são distribuídos por diferentes ramos, fornecendo precursores para reações biossintéticas, metabolismo energético e reações anapleróticas (Figura 4)⁵⁴.

Assim, a compreensão da distribuição do fluxo e sua regulação no metabolismo central de carbono, isto é, uma "quantificação" do metabolismo, é fundamental para o progresso da engenharia metabólica. Embora as vias metabólicas sejam conhecidas há várias décadas, a quantificação e a regulação das redes metabólicas ainda não são totalmente compreendidas⁴¹.

Hackett *et al.* 2016⁵⁵, mostrou o fluxo metabólico do metabolismo central de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e alguns mecanismos reguladores como o acúmulo de citrato inibiram a piruvato quinase, causando redução do fluxo glicolítico e produção de etanol. Demonstrando que a concentração de metabólitos é o principal determinante do fluxo metabólico no metabolismo central da levedura.

Este trabalho utilizou um protocolo de metabolômica previamente desenvolvido e otimizado pelo grupo⁵⁶⁻⁵⁸ para investigar a via metabólica de assimilação da xilose por leveduras formado pelas vias da glicólise, pentose fosfato (PPP) e ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Figura 4).

A plataforma analítica utilizada neste experimento baseia-se em UHPLC-MS/MS. Dois métodos cromatográficos complementares acoplados à espectrometria de massas *tandem* IPC-MS/MS e HILIC-MS/MS, foram utilizados para quantificar 14 e 5 metabólitos intracelulares, respectivamente (Figura 4), convertidos durante a fase exponencial de crescimento de quatro espécies de leveduras naturalmente fermentadora de xilose, *Scheffersomyces stipitis*, *Candida tenuis*, *Spathaspora passalidarum* e *Spathaspora arborariae*.

Duas condições de cultivo foram avaliadas: aeróbico e microaeróbico, a fim de investigar a influência de oxigênio no consumo da xilose. A análise estatística dos dados biológicos foi realizada através da análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas, desenvolvida no *software* R.

A análise de fluxo metabólico (MFA) foi realizada através do *software* Optflux e utilizada para validação e comparação de alvos moleculares nas leveduras fermentadoras de xilose em estudo.

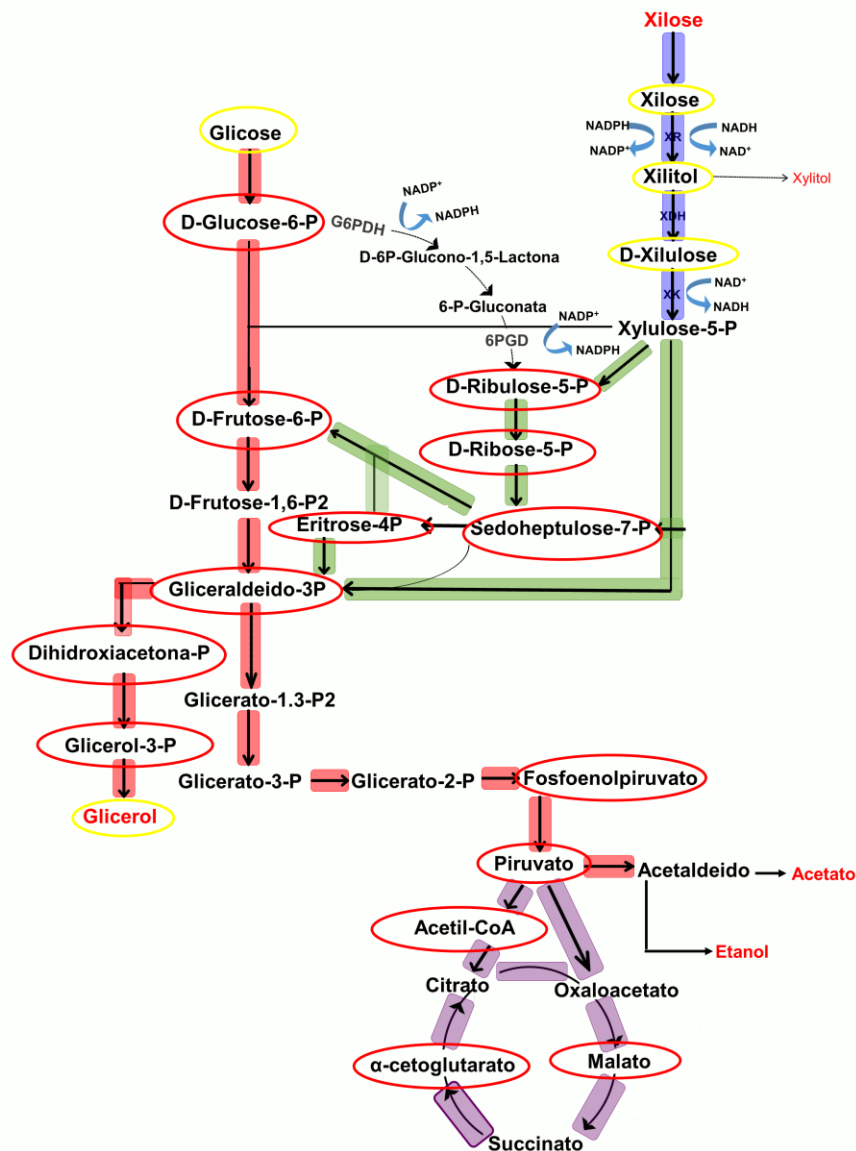


Figura 4. Via simplificada do metabolismo da xilose por leveduras formada pelas vias da glicólise, pentose fosfato (PPP) e ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) Metabólitos destacados em vermelho (14) foram quantificados pelo método IPC; metabólitos destacados em amarelo (5) foram quantificados pelo método HILIC

OBJETIVOS

2 Objetivos Gerais

O objetivo principal do presente trabalho foi quantificar os alvos moleculares relacionados as etapas limitantes na conversão de xilose em etanol, utilizando estratégias de metabolômica, visando o melhoramento genético de leveduras, e conseqüentemente, o aumento de produção de etanol de segunda geração.

2.1 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo principal, foram delineados cinco objetivos específicos:

1: Otimizar o protocolo de metabolômica para análise dos metabólitos de 4 espécies de leveduras fermentadoras de xilose (*Scheffersomyces stipitis*, *Candida tenuis*, *Spathaspora passalidarum* e *Spathaspora arborariae*) utilizando UHPLC-MS/MS.

2: Quantificar os metabólitos intracelulares produzidos por 4 espécies de leveduras fermentadoras de xilose utilizando UHPLC-MS/MS.

3: Desenvolver um modelo para análise estatística dos dados metabolômicos obtidos na quantificação dos metabólitos intracelulares de quatro espécies de leveduras fermentadoras de xilose.

4: Realizar o tratamento e interpretação dos dados obtidos na aplicação do protocolo de metabolômica através de modelo matemático apropriado a fim de comparar as condições de crescimento: aeróbico e microaeróbico e a fases de crescimento das leveduras.

5: Validar os metabólitos intracelulares presentes no metabolismo do carbono central de 4 espécies de leveduras fermentadoras de xilose, utilizando a análise de fluxo metabólico (MFA) para cada espécie.

6: Construir e comparar o fluxo metabólico de quatro espécies de leveduras visando identificar alvos metabólicos relacionados a conversão de xilose a etanol.

EXPERIMENTAL

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e soluções

Os padrões de metabólitos utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich com pureza $\geq 95\%$: acetil coenzima-A (ACCOA), ácido alfacetoglutárico (AKG), ácido málico (L-MAL), D-(+)-glicose, D-(+)-xilose, glicose-6-fosfato (G6P), frutose-6-fosfato (F6P), dihidroxi acetona fosfato (DHAP), eritrose-4-fosfato (E4P), gliceraldeído-3-fosfato (GAP), glicerol-3-fosfato (GLY3P), ribose-5-fosfato (R5P), ribulose-5-fosfato (RU5P), xilulose (Xylu), fosfo(enol)piruvato (PEP), glicerol, ácido pirúvico (PYR), sedoheptulose-7-fosfato (S7P) e xilitol. Os solventes tributilamina, acetonitrila e metanol também foram adquiridos da Sigma-Aldrich com pureza $\geq 99\%$. O acetato de amônio foi adquirido da empresa Vetec (USA) e o hidróxido de amônio da marca Fluka (USA). Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (18.2 M Ω) obtidas através do sistema de purificação Direct 16 Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

3.2 Desenho Experimental

O protocolo de metabolômica descrito neste trabalho buscou avaliar o metabolismo de quatro espécies de leveduras fermentadoras de xilose, *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae* e *Candida Tenuis*. As leveduras foram crescidas em triplicata biológica. As amostras foram coletadas em três pontos específicos e em triplicata durante a fase exponencial de crescimento, entre 20 e 94 horas de fermentação em duas condições de crescimento: aeróbica e microaeróbica (Figura 5). Cada espécie de levedura gerou 27 amostras para cada uma das diferentes condições de crescimento, desta forma, o protocolo de metabolômica desenvolvido e otimizado foi aplicado para um total de 216 amostras de leveduras.

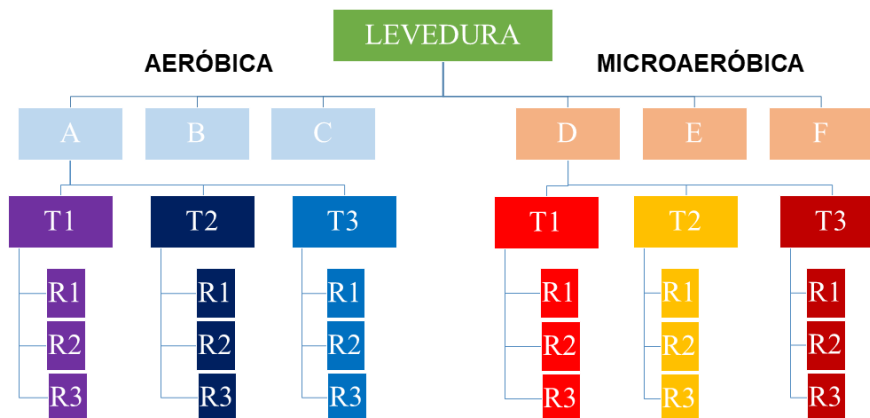


Figura 5. Desenho experimental para a realização da metabolômica de quatro espécies de leveduras fermentadoras de xilose. As replicatas de tempo (T1, T2, T3) e as replicatas técnicas (R1, R2, R3) são repetidas para cada replicata biológica aeróbica (A, B, C) e microaeróbica (D, E, F).

3.3 Cultivo de leveduras

O cultivo das leveduras foi realizado no Laboratório de Genética e Biotecnologia (LGB), na unidade da Embrapa Agroenergia. As leveduras fermentadoras de xilose *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* (NRRL Y-7124), *Spathaspora passalidarum* (NRRL Y-27907), *Candida tenuis* (NRRL Y-1498) e *Spathaspora arborariae* (NRRL Y-48658) foram crescidas em placa YPD durante a noite e pré-inoculadas em 50 mL de meio mineral⁵⁹. A xilose foi utilizada como fonte de carbono com concentração de 40 g.L⁻¹⁶⁰. Os ensaios de fermentação foram realizados em biorreatores (Multifors 2 Infors) com volume de 500 mL sob condições controladas para o crescimento celular, conforme descrito a seguir: 28 °C, agitação de 200 rpm, fluxo mínimo de ar em 0.05 L.min⁻¹, pH 5,5, ajustado com KOH 3 M, e O₂ inicial com 100%, sendo consumido no decorrer do tempo de cultivo, até ficar em condição microaeróbica. Para a condição aeróbica foi mantido 100% de ar com fluxo de 0,5-0,8 L.min⁻¹.

3.4 Determinação dos produtos de fermentação e da biomassa

A determinação dos metabólitos extracelulares foi realizada no Laboratório de Genética e Biotecnologia (LGB), na unidade da Embrapa Agroenergia. Os compostos xilose, xilitol, etanol, acetato, glicerol, piruvato e succinato, foram analisados por HPLC (Acquity UPLC H Class, Waters) equipado com uma coluna HPX-87 H (Bio-Rad Laboratories) a 45°C e detector de índice de refração previamente descrito por Veras *et al.* 2017⁶¹. Fase móvel composta por ácido sulfúrico 5 mM e o modo de eluição foi isocrático a uma taxa de 0.6 ml.min⁻¹ com duração total da corrida de 25 minutos.

A biomassa foi medida através de OD600 usando um espectrofotômetro (SpectraMax M3, Molecular Devices). Para cada ponto coletado, o peso seco da célula (CDW) foi obtido utilizando 5 mL de pré-inóculo na fase estacionária. As amostras foram retiradas e centrifugadas a 12.000xg por 5 min. Para a pesagem as células foram colocadas num tubo de vidro e secas a 60°C por 48 h. Desta forma, foi possível obter uma correlação entre os valores de OD600 e CDW.

3.5 Etapas de *quenching* e extração dos metabólitos

A Figura 6 apresenta as etapas do preparo de amostra, *quenching* e extração, utilizada na metabolômica de leveduras. O método de *quenching* foi realizado a partir da adição de 2 mL de amostra em 8 mL de uma solução metanólica 60% submerso em um banho termostático a -40°C⁶². Em seguida esta mistura foi centrifugada a -9°C, e o pellet resultante congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até futura extração. A etapa de extração foi realizada utilizando o método do etanol fervente⁶³. Inicialmente as amostras foram retiradas do freezer a -80°C e colocadas no banho termostático a -40°C, por 5 minutos. Uma solução etanólica (75% de etanol, 10mM de acetato de amônio, pH 7,4) foi aquecida à aproximadamente 85°C. O etanol quente foi adicionado diretamente no pellet na proporção (1:1) (V/V). As amostras foram homogeneizadas em um agitador tipo vortex, transferidas para um tubo eppendorf e incubadas por 3 minutos a 85°C, em um termoagitador para tubo eppendorf com agitação vigorosa constante. As células foram

resfriadas a - 40°C no banho termostático e centrifugadas em uma microcentrífuga refrigerada, a 5000 rpm e - 9°C por 3 minutos. Os restos celulares foram descartados e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo eppendorf de 2 mL. As amostras foram então levadas à secura em um concentrador a vácuo e armazenadas a -80°C.

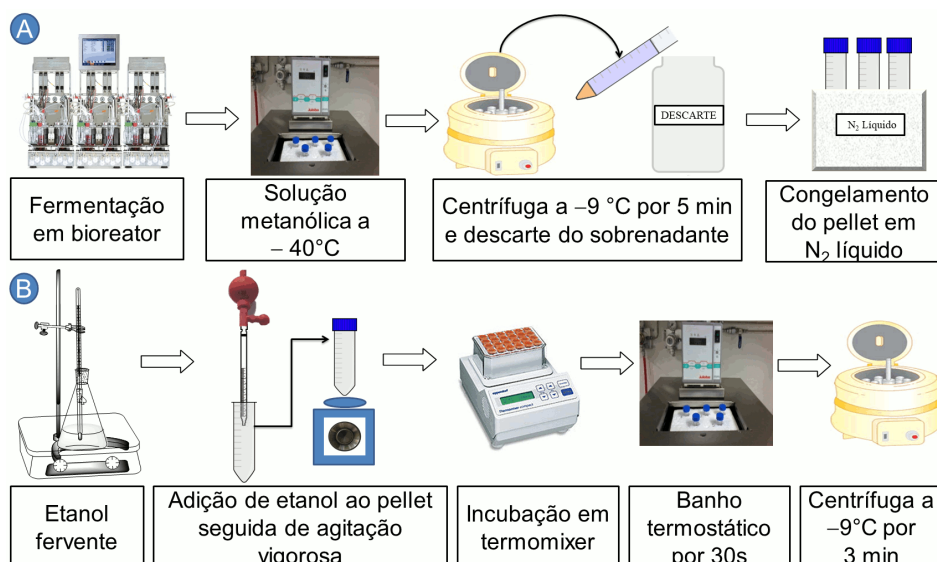


Figura 6. Fluxo de trabalho das etapas do preparo de amostra: A) *quenching* do metabolismo celular das leveduras; B) extração dos metabólitos intracelulares. (adaptado de Campos *et al*, 2019)⁵⁶

3.6 UHPLC-MS/MS

Todos os experimentos foram realizados utilizando um sistema AcQuitytm UPLC (Waters), acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (Xevo TQD, Waters) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray*. Os dados foram adquiridos e processados com o *software* MassLynx 4.1 (Waters). O MS foi operado em modo de ionização negativa, ESI (-)-MS, usando monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os parâmetros instrumentais utilizados foram: tensão capilar 3500 V, temperatura de desolvatação: 450°C, temperatura da fonte: 130 °C, fluxo de gás cone: 20 L/h e fluxo de desolvatação: 700 L/h. Os canais de transição de MRM e as voltagens das células de colisão foram otimizados para cada metabolito após infusão direta por MS.

A Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (HILIC) foi realizada usando uma coluna de amida BEH (2.1 x 150 mm x 1,7 μ m) (Waters) a 50°C, com fase móvel (A: hidróxido de amônio a 0.1%) e (B: acetonitrila com 0.1% de hidróxido de amônio). A Cromatografia de par iônico (IPC) foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa, HSS-T3 (2.1 x 150 mm x 1,8 μ m) (Waters) a 45°C, com fase móvel (A: 5 mM de tributilamina, 10 mM de ácido acético e 5% (v/v) de metanol, pH 4,8) e (B: metanol). Os gradientes utilizados para ambos os métodos são mostrados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Gradiente cromatográfico usado na separação dos metabólitos pelo modo HILIC, fase móvel A: hidróxido de amônio 0.1% e B: acetonitrila + hidróxido de amônio 0.1%, a 60°C.

| Tempo (min) | Fluxo (mL/min) | Eluente A (vol. %) | Eluente B (vol. %) |
|-------------|----------------|--------------------|--------------------|
| 0.0 | 0.2 | 15 | 85 |
| 6.5 | 0.2 | 50 | 50 |
| 7.5 | 0.4 | 50 | 50 |
| 8.0 | 0.2 | 15 | 85 |
| 12.0 | 0.2 | 15 | 85 |

Tabela 2. Gradiente cromatográfico usado na separação dos metabólitos pelo modo IPC, fase móvel A: Tributilamina 5 mM + Ácido Acético 10 mM + 5% MeOH e B: MeOH, a 45°C.

| Tempo (min) | Fluxo (mL/min) | Eluente A (vol. %) | Eluente B (vol. %) |
|-------------|----------------|--------------------|--------------------|
| 0.0 | 0.4 | 100 | 0 |
| 10.0 | 0.4 | 89.5 | 10.5 |
| 18.0 | 0.4 | 47.4 | 52.6 |
| 19.0 | 0.4 | 47.4 | 52.6 |
| 20.0 | 0.4 | 100 | 0 |
| 26.0 | 0.4 | 100 | 0 |

3.7 Quantificação dos metabólitos intracelulares

Soluções padrões individuais (SI) dos metabólitos em estudo foram preparadas a uma concentração de 1 mg/mL. Em seguida, foram utilizadas diluições das SI a 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10 e 50 µg/mL, para a construção da curva de calibração e preparo do controle de qualidade (QC). O limite de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram estabelecidos com base na relação sinal/ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente⁶⁴. A curva de calibração analítica definitiva foi construída com seis níveis de concentração, cada nível é composto da mistura das soluções padrão com os valores de concentração determinada para cada metabólito. Os valores reais de concentração foram obtidos plotando-se a área do pico versus a concentração teórica de cada padrão, a curva analítica foi ajustada com o modelo de regressão polinomial de segunda ordem.

As amostras geradas foram reconstituídas em 200 µL de água ultra pura e submetidos ao ultrassom por 5 minutos, a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante transferido para o vial. A curva analítica e as amostras foram injetadas em triplicata, o QC foi incluído a cada 9 injeções, a fim de avaliar a estabilidade do equipamento.

3.8 Análise estatística utilizando ANOVA

O desenho experimental permitiu medir o efeito do tipo e o tempo de fermentação em dois ambientes de crescimento (aeróbico e microaeróbico) através das medidas da concentração dos metabólitos. O design descrito permite que isso seja feito utilizando a ANOVA com medidas repetidas⁶⁵, de acordo com o seguinte modelo para a concentração:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \tau_k + (\alpha\tau)_{ik} + e_{ijk}$$

Sendo μ a média geral, α_i o tipo de ambiente de crescimento, $\beta_{j(i)}$ o efeito aleatório da levedura j receber o tratamento i , τ_k o efeito do tempo k de exposição ao ambiente de fermentação, $(\alpha\tau)_{ik}$ a interação entre o ambiente e o tempo de exposição ao crescimento e o erro experimental e_{ijk} .

O *software* RStudio (<http://www.rstudio.org>) foi utilizado para a construção deste modelo matemático.

3.9 Obtenção do modelo estequiométrico

O modelo estequiométrico foi construído de acordo com metodologia previamente estabelecida na literatura.^{12,15,66} O modelo é composto por 39 reações dentro da via de assimilação da xilose, que inclui as vias das pentoses fosfato (PPP), glicólise, metabolismo do piruvato e TCA. A reação de biomassa foi determinada de acordo com protocolo descrito por Walhlbom *et al.*¹² A reação inclui os componentes de macromoléculas da célula (proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos)¹². A construção do modelo estequiométrico baseou-se nos dados disponíveis na Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG). A informação genômica e bioquímica da levedura *S. stipitis* (Entrada T01023) foi usada como referência. Os genes que codificam para as enzimas no metabolismo da xilose presentes no respectivo genoma podem ser determinados usando a via KEGG. Com base nas informações genômicas, as enzimas das reações metabólicas foram identificadas na rede metabólica proposta.

3.10 Análise de Fluxo Metabólico (MFA)

O modelo foi carregado para o *software* OptFlux a partir de um arquivo do Excel (material suplementar 04 do anexo C). O grau de liberdade da rede metabólica foi calculado usando as propriedades do modelo estequiométrico. O número exato de graus de liberdade foi obtido pela diferença entre o número de metabólitos da rede e o número de equações linearmente independentes⁴⁵. Para diferenciar reações internas e externas, os metabólitos externos foram identificados com “[e]” e metabólitos intracelulares com “[c]”. A reação de biomassa foi usada como uma função objetiva^{12,67}. As taxas de fluxo extracelulares (xilose, acetato, glicerol, piruvato, succinato e xilitol) obtidas durante a fase de crescimento médio exponencial foram adicionadas ao modelo. As simulações foram executadas usando o método algébrico com ajuste de mínimos quadrados.

3.11 Validação da quantificação dos metabólitos intracelulares utilizando análise de Fluxo Metabólico (MFA)

As concentrações dos metabólitos intracelulares resultantes da análise estatística foram adicionadas ao modelo estequiométrico. Em seguida, foi realizada uma simulação com o objetivo de determinar a distribuição do fluxo dentro da rede metabólica. Inicialmente, as simulações foram realizadas com a adição de uma concentração de metabólito por tempo. Assim, foram obtidas onze distribuições de fluxo medidas, uma para cada concentração do metabólito medido. Em seguida, os fluxos obtidos a partir dos cálculos estequiométricos e aqueles com a adição dos dados do metaboloma foram comparados pelo coeficiente de correlação de Pearson (R^2). O coeficiente de correlação foi utilizado para determinar a relação entre as distribuições de fluxos calculadas e medidas. Os metabólitos, cuja correlação foi superior a 90%, foram utilizados no modelo estequiométrico para uma nova rodada de simulações de fluxos. Assim, foi possível estimar a porcentagem de erro entre fluxos calculados e medidos para cada metabólito medido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 Resultados e discussão

4.1 Análise Metabolômica de leveduras fermentadoras de xilose

Os experimentos de metabolômica *targeted* de leveduras consistiu inicialmente na otimização do preparo de amostra e na análise de 19 metabólitos presentes na via metabólica de assimilação da xilose por leveduras formado pelas vias da glicólise, pentose fosfato (PPP) e ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Figura 7).

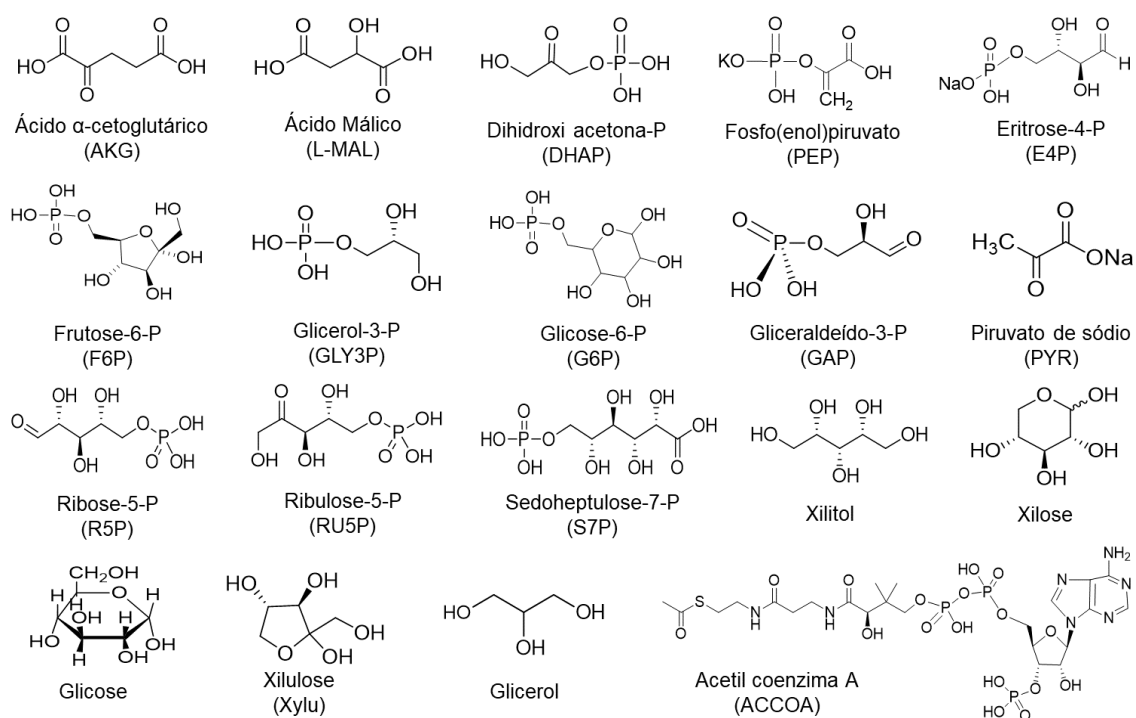


Figura 7. Estrutura química dos metabólitos presentes na via de assimilação da xilose por leveduras. Metabólitos: ácido alfa cetoglutarico (AKG), ácido málico (L-MAL), dihidroxi acetona fosfato (DHAP), fosfo(enol)piruvato (PEP), eritrose-4-fosfato (E4P), frutose-6-fosfato (F6P), glicerol-3-fosfato (GLY3P), glicose-6- fosfato (G6P), gliceraldeído-3-fosfato (GAP), piruvato de sódio (PYR), ribose-5- fosfato (R5P), ribulose-5- fosfato (RU5P), sedoheptulose-7- fosfato (S7P), xilitol, xilose, glicose, xilulose (Xylu), glicerol e acetil coenzima A (ACCOA).

O método analítico baseado em UHPLC-MS/MS foi desenvolvido por Campos *et al.* e otimizado (Anexos A e B)^{56,58} para a análise das amostras de

leveduras fermentadoras de xilose. A espectrometria de massa de infusão direta (DIMS) foi utilizada para otimizar a fonte de ionização e as tensões das células de colisão para cada metabólito. Os metabólitos em estudo foram detectados com melhor sensibilidade usando ESI(-)-MS. Os valores da energia do capilar e da energia de colisão foram otimizados para cada padrão, no entanto a energia do capilar foi a mesma para todos os metabólitos (3500 V). O íon fragmento mais intenso e/ou seletivo foi selecionado para análises por MRM (Tabela 3). Dois métodos cromatográficos complementares foram necessários para a análise simultânea dos metabólitos devido à grande variedade química dos compostos em diferentes concentrações.

A cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) foi utilizada na separação dos monossacarídeos e álcoois, desta forma cinco metabólitos foram separados e quantificados por este método, sendo: xilose, xilulose, xilitol, glicose e glicerol (Figura 8). A cromatografia de par iônico (IPC) foi utilizada na separação do segundo grupo composto por ácidos orgânicos e açúcares fosfatados, seu mecanismo de separação consiste em uma fase estacionária hidrofóbica e um reagente de par de iônico (IP) como fase móvel. O reagente IP interage com a fase estacionária, criando uma carga oposta ao analito, aumentando assim a retenção e a seletividade da coluna de fase reversa. Desta forma, 14 metabólitos, incluindo os isômeros: G6P e F6P, e R5P e Ru5P puderam ser separados e quantificados (Figura 9).

Tabela 3. Parâmetros do espectrômetro de massas, voltagem do cone (V), valores de m/z Q1 e Q3 e energia de colisão (eV), otimizados para cada metabólito para a realização dos experimentos de MRM.

| Metabólitos | Voltagem do cone (V) | Q1 (m/z) | Q3 (m/z) | Energia de colisão (eV) |
|--------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------|
| ACOOA | 60 | 808.1 | 408.0 | 50 |
| AKG | 18 | 144.6 | 56.8 | 15 |
| DHAP | 25 | 169.0 | 97.0 | 18 |
| E4P | 20 | 198.8 | 78.8 | 20 |
| F6P | 32 | 258.6 | 96.8 | 18 |
| G6P | 32 | 258.7 | 96.8 | 20 |
| GAP | 20 | 168.8 | 96.8 | 18 |
| Glicose | 15 | 179.1 | 58.9 | 18 |
| GLY3P | 30 | 170.5 | 78.7 | 25 |
| Glicerol | 18 | 91.0 | 59.1 | 18 |
| L-MAL | 18 | 132.6 | 114.8 | 10 |
| PEP | 20 | 166.6 | 78.8 | 10 |
| PYR | 20 | 86.8 | 42.8 | 8 |
| R5P | 30 | 228.8 | 96.8 | 20 |
| RU5P | 30 | 228.8 | 79.0 | 20 |
| S7P | 32 | 288.4 | 138.9 | 25 |
| Xilitol | 25 | 151.0 | 58.9 | 20 |
| Xilose | 10 | 149.0 | 59.0 | 14 |
| Xylu | 10 | 149.0 | 59.0 | 14 |

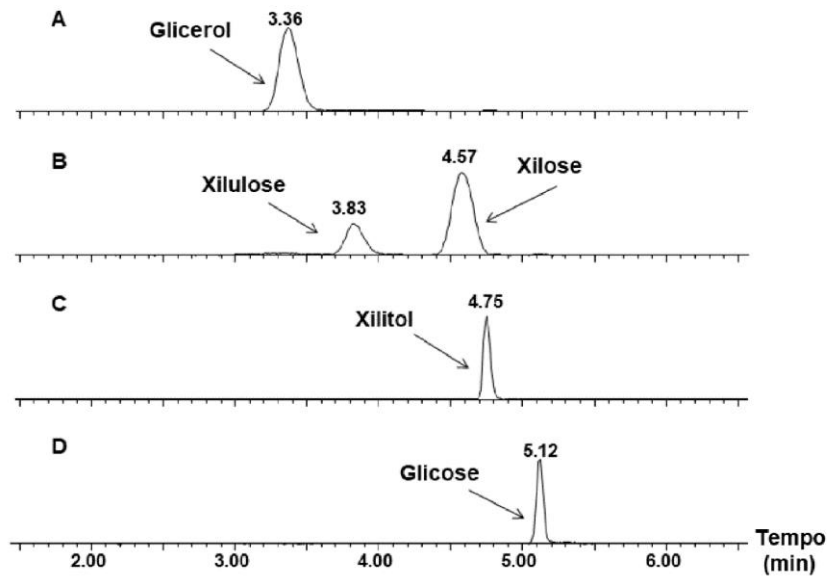


Figura 8. Cromatograma de 5 canais de MRM no modo HILIC-ESI(-)-MS/MS: a) glicerol (91> 59), b) xilulose (149> 59) e xilose (149> 59), c) xilitol (151> 59) e d) glicose (179> 59).

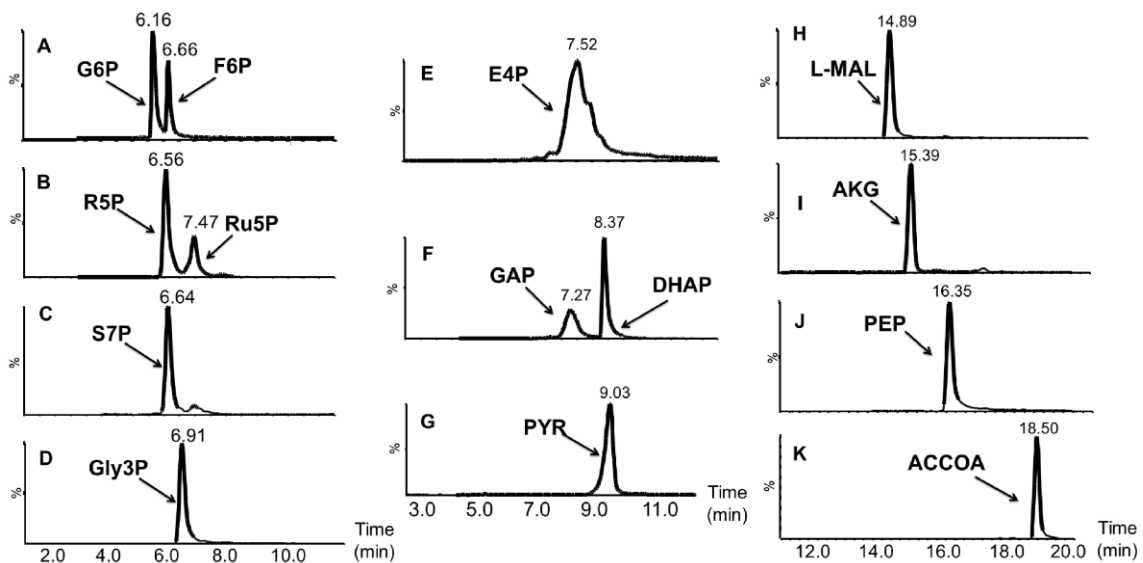


Figura 9. Cromatograma de 11 canais de MRM no modo IPC-ESI(-)-MS/MS: a) glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato (m/z 259 > 97); b) ribose-5- fosfato (m/z 229 > 97) e ribulose-5- fosfato (m/z 229>79); c) sedoheptulose-7-fosfato (m/z 288 > 139); d) glicerol-3-fosfato (m/z 170>79); e) eritrose-4-fosfato (m/z 199>79); f) gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (m/z 169>97), g) ácido pirúvico (m/z 87 > 43), h) ácido málico (m/z 133 >115); i) ácido alfacetoglutarico (m/z 145 > 57); j) fosfo(enol)piruvato (m/z 167 > 79) e k) acetil co-A (808 > 408).

Este protocolo de metabolômica foi aplicado em amostras de quatro espécies de leveduras fermentadoras de xilose, *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae* e *Candida tenuis*, cujo resultados são apresentados a seguir.

4.2 Otimização dos parâmetros analíticos para a quantificação dos metabólitos

A quantificação dos metabólitos intracelulares produzidos por quatro espécies de leveduras fermentadoras de xilose: *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae* e *Candida tenuis*, cultivadas nas condições aeróbica e microaeróbica foi realizada utilizando os métodos por UHPLC-MS/MS descritos acima.

As análises preliminares das leveduras em estudo detectaram altas concentrações de xilose e xilitol, sendo assim, foi necessário diluir as amostras 100 vezes antes de injetá-las pelo método HILIC-MS/MS. Além disso, o ácido málico e a sedoheptulose-7-fosfato ultrapassaram o limite superior da curva de calibração, sendo assim, foi necessária uma diluição de 5 vezes antes da análise por IPC-MS/MS.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) e os coeficientes de regressão (R^2) para cada metabólito foram estabelecidos para a realização da análise quantitativa dos 19 metabólitos pertencentes a via de assimilação de xilose por leveduras (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros analíticos para a quantificação de 19 metabólitos alvos da via de assimilação da xilose: coeficientes de regressão (R^2), intervalo de curva de calibração, limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ).

| # | Metabólitos | Faixa ($\mu\text{g/mL}$) | R^2 | LOD ($\mu\text{g/mL}$) | LOQ ($\mu\text{g/mL}$) |
|----|-------------|----------------------------|--------|--------------------------|--------------------------|
| 1 | ACCOA | 7.4-80 | 0.9975 | 2.35 | 7.12 |
| 2 | AKG | 3.5-50 | 0.9958 | 0.92 | 3.08 |
| 3 | L-MAL | 0.2-50 | 0.9984 | 0.03 | 0.11 |
| 4 | Gly3P | 0.5-50 | 0.9994 | 0.09 | 0.29 |
| 5 | G6P | 1.5-50 | 0.9990 | 0.43 | 1.43 |
| 6 | F6P | 3.5-50 | 0.9980 | 0.96 | 3.19 |
| 7 | DHAP | 2.0-50 | 0.9992 | 0.59 | 1.99 |
| 8 | GAP | 3.5-50 | 0.9979 | 0.92 | 3.06 |
| 9 | R5P | 2.0-50 | 0.9992 | 0.65 | 1.99 |
| 10 | Ru5P | 2.5-50 | 0.9991 | 0.61 | 2.04 |
| 11 | E4P | 1.0-50 | 0.9996 | 0.29 | 0.98 |
| 12 | S7P | 1.4-30 | 0.9983 | 0.38 | 1.27 |
| 13 | PEP | 2.5-50 | 0.9919 | 0.66 | 2.21 |
| 14 | PYR | 0.5-50 | 0.9998 | 0.14 | 0.43 |
| 15 | Xylu | 0.5-75 | 0.9971 | 0.20 | 0.50 |
| 16 | Xilose | 0.5-50 | 0.9990 | 0.20 | 0.50 |
| 17 | Glicose | 0.5-50 | 0.9991 | 0.20 | 0.50 |
| 18 | Glicerol | 0.5-50 | 0.9993 | 0.20 | 0.50 |
| 19 | Xilitol | 0.5-75 | 0.9988 | 0.20 | 0.50 |

Inicialmente as curvas de calibração foram processadas utilizando o modelo linear, no entanto, observou-se que a maior parte dos metabólitos estudados apresentavam uma tendência quadrática (Figuras 10 e 11)⁵⁸, sendo este o modelo matemático escolhido para o cálculo das concentrações.

As curvas de calibração variaram de 0.5 a 80 $\mu\text{g/mL}$, os valores de LOD variaram de 0.03 (L-MAL) a 3.19 $\mu\text{g/mL}$ (ACCOA) e LOQ de 0.11 (L-MAL) para 7.12 $\mu\text{g/mL}$ (ACCOA).

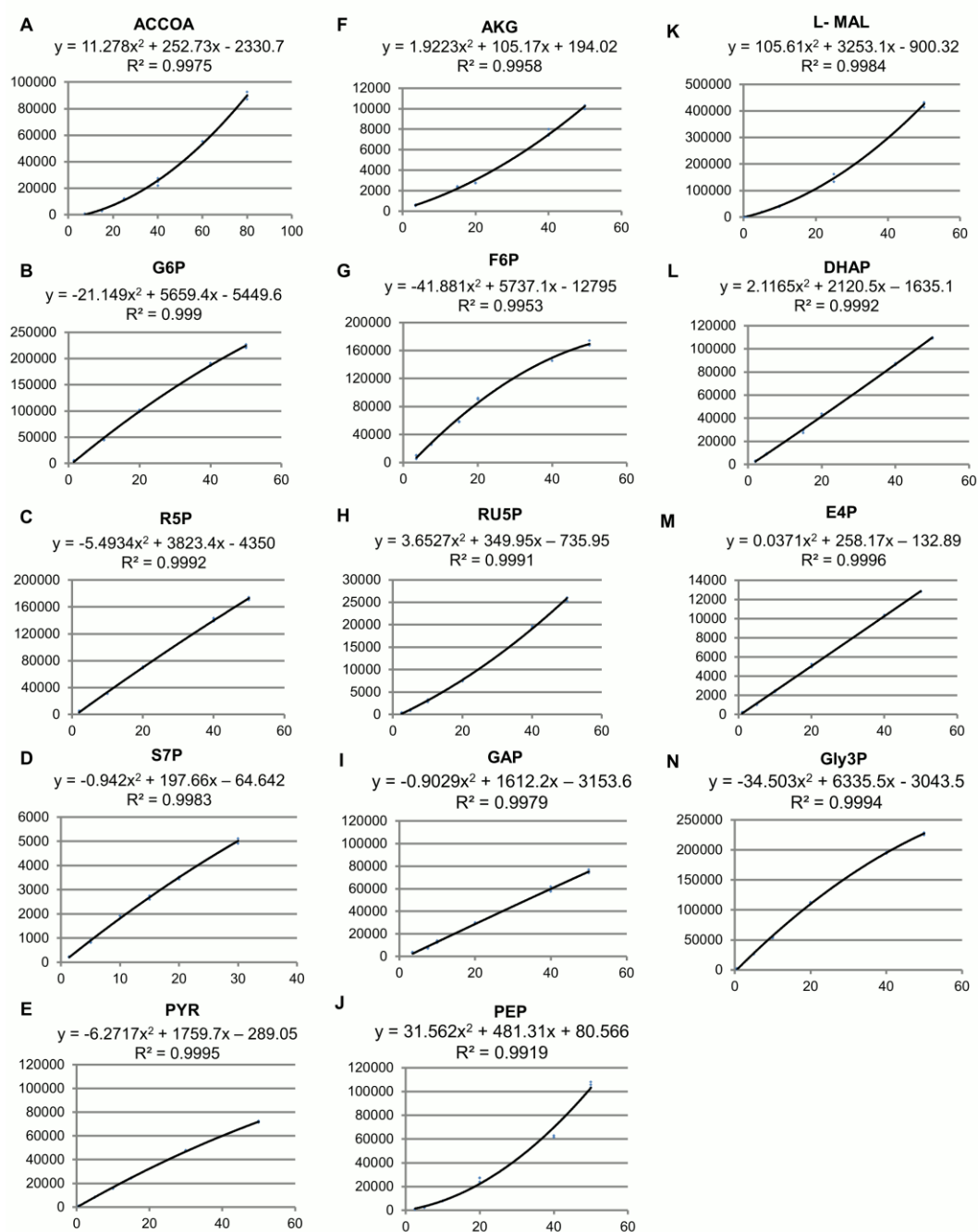


Figura 10. Curvas de calibração ajustadas pelo modelo quadrático de quatorze padrões de metabólitos analisados pelo método IPC: A) acetil coenzima A (ACCOA), B) glicose-6- fosfato (G6P), C) ribose-5- fosfato (R5P), D) sedoheptulose-7- fosfato (S7P), E) piruvato de sódio (PYR), F) ácido alfa cetoglutarico (AKG), G) frutose-6-fosfato (F6P), H) ribulose-5- fosfato (RU5P), i) gliceraldeído-3-fosfato (GAP), J) fosfo(enol)piruvato (PEP), K) ácido málico (L-MAL), L) dihidroxi acetona fosfato (DHAP), M) eritrose-4-fosfato (E4P), e N) glicerol-3-fosfato (GLY3P).

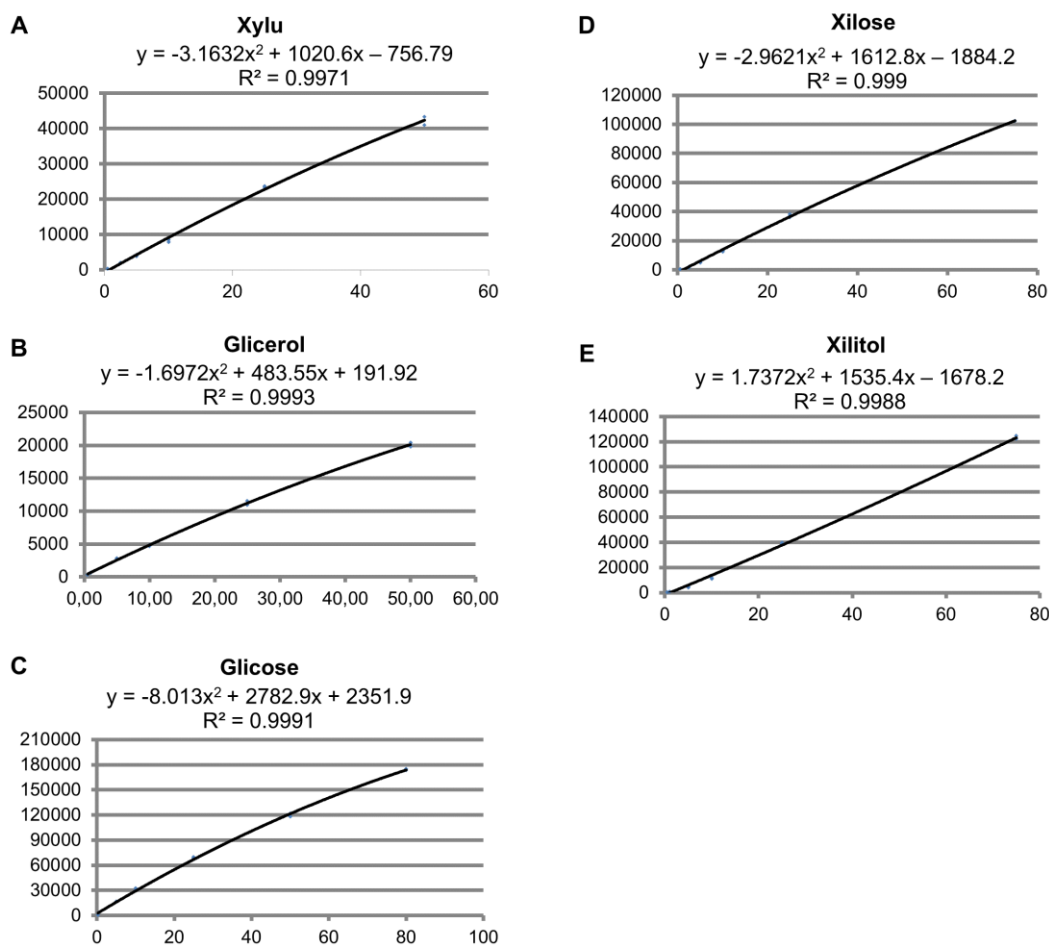


Figura 11. Curvas de calibração ajustadas pelo modelo quadrático de cinco padrões de metabólitos analisados pelo método HILIC: A) xilulose, B) glicerol, C) glicose, D) xilose e E) xilitol.

Utilizando esses parâmetros, os metabólitos detectados durante o crescimento exponencial das espécies de leveduras em estudo em meio de xilose foram quantificados.

4.3 Quantificação dos metabólitos intracelulares das leveduras fermentadoras de xilose por UHPLC-MS/MS

Um total de 54 amostras para cada espécie de levedura foram quantificadas conforme planejamento experimental (Figura 5). A xilose foi o metabólito detectado com maior concentração (5000 µg/mL), seguido do xilitol (3051 µg/mL), embora fosse esperado uma elevada concentração de xilose, já que esse açúcar foi utilizado como substrato para o experimento, a ausência de

uma etapa de lavagem das células possivelmente contribuiu para os altos valores de concentração deste açúcar. O excesso de xilitol pode indicar que o oxigênio disponível pode não ter sido suficiente para o equilíbrio redox, e, portanto, o acúmulo de xilitol⁶⁸.

A seguir são apresentados os dados de quantificação obtidos para 216 amostras das quatro espécies de leveduras fermentadoras de xilose em estudo, nas duas condições de crescimento.

4.3.1 Quantificação dos metabólitos intracelulares da levedura *S. stipitis* por UHPLC-MS/MS

A levedura naturalmente fermentadora de xilose *Scheffersomyces stipitis*, anteriormente conhecida como *Pichia stiptis*, é considerada uma levedura em potencial para a produção de etanol 2G⁶⁹. A *S. stipitis* é capaz de catabolizar a glicose, manose, galactose, ramnose, xilose, arabinose, celobiose e alguns compostos relacionados à lignina. Outra vantagem dessa levedura é seu processo de crescimento simplificado, sua forte resistência à contaminação e desintoxicação de inibidores dos produtos derivados da biomassa⁷⁰.

Neste trabalho, as células da levedura *S. stipitis* foram coletadas em três pontos durante a fase de crescimento exponencial (22h, 26h e 29h) e (20h, 28h e 40h) sob condições aeróbicas e microaeróbicas, respectivamente. Um total de 13 metabólitos foram quantificados nas amostras de *S. stipitis* em ambas as condições de crescimento (Tabelas 5 e 6). Dentre estes, 12 metabólitos (ácido málico (L-MAL), glicerol-3-fosfato (Gly3P), glicose-6-fosfato (G6P), frutose-6-fosfato (F6P), dihidroxi acetona fosfato (DHAP), ribose-5-fosfato (R5P), ribulose-5-fosfato (Ru5P), sedoheptulose-7-fosfato (S7P), fosfo(enol)piruvato (PEP), ácido pirúvico (PYR), xilose e xilitol) foram quantificados em ambas as condições. Os metabólitos ácido alfa cetoglutarico (AKG) e eritrose-4-fosfato (E4P) foram específicos para a condição aeróbica e microaeróbica respectivamente.

Tabela 5. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura *S. stipitis* nos pontos de coleta (22h, 26h e 29h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e C), sob condição aeróbica.

| # | Metabólitos | 22h | | | 26h | | | 29h | | |
|----|-------------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
| | | (µg/mL) | | | (µg/mL) | | | (µg/mL) | | |
| | | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| 1 | ACCOA | ND | | | ND | | | ND | | |
| 2 | AKG | 4.49 | 10.38 | 1.53 | 8.05 | 11.79 | 10.62 | 10.61 | 14.86 | 8.44 |
| | | 11.44 | 9.51 | 1.19 | 12.90 | 11.54 | 4.40 | 13.32 | 17.31 | 4.14 |
| 3 | L-MAL | 12.90 | 15.32 | 3.39 | 11.92 | 12.12 | 7.49 | 12.44 | 14.78 | 4.80 |
| | | 36.93 | 49.13 | 77.15 | 98.80 | 119.5 | 12.75 | 63.73 | 17.90 | 13.89 |
| | | 63.96 | 46.14 | 52.02 | 123.7 | 111.7 | 11.82 | 36.77 | 20.22 | 13.78 |
| 4 | Gly3P | 138.7 | 83.04 | 82.73 | 106.0 | 44.8 | 15.32 | 55.56 | 19.86 | 13.40 |
| | | 9.95 | 13.92 | 9.13 | 9.86 | 18.30 | 0.75 | 16.09 | 1.11 | 0.92 |
| | | 15.30 | 14.50 | 7.56 | 11.14 | 16.31 | 0.66 | 3.85 | 1.18 | 0.87 |
| 5 | G6P | 17.72 | 19.84 | 10.51 | 11.43 | 2.18 | 0.77 | 4.84 | 1.10 | 0.95 |
| | | 5.50 | 5.63 | 8.67 | 8.19 | 6.74 | 1.17 | 6.53 | 2.47 | 2.39 |
| | | 4.38 | 5.36 | 2.45 | 8.33 | 6.07 | 1.35 | 5.32 | 2.96 | 2.27 |
| 6 | F6P | 7.82 | 5.81 | 5.78 | 8.58 | 3.98 | 1.96 | 5.42 | 2.86 | 2.63 |
| | | 7.37 | 10.17 | 8.87 | 8.47 | 9.40 | 3.60 | 10.32 | 2.94 | 3.16 |
| | | 9.25 | 11.40 | 5.95 | 7.79 | 7.06 | 2.72 | 3.56 | 2.10 | 3.39 |
| 7 | DHAP | 9.78 | 12.24 | 9.91 | 8.63 | 2.77 | 2.34 | 4.61 | 3.09 | 3.84 |
| | | 1.84 | 2.60 | - | 3.41 | 3.59 | - | 3.07 | - | - |
| | | 5.52 | 2.82 | - | 4.74 | 2.17 | - | - | - | - |
| 8 | GAP | 3.54 | 3.59 | - | 3.40 | - | - | 2.10 | - | - |
| | | ND | | | ND | | | ND | | |
| | | 5.83 | 3.00 | 1.26 | 6.25 | 3.48 | 0.89 | 1.36 | 1.00 | 0.84 |
| 9 | R5P | 4.29 | 4.44 | 1.47 | 4.54 | 0.99 | 0.84 | 2.89 | 1.22 | 0.94 |
| | | 4.25 | 4.37 | 0.89 | 3.26 | 0.96 | 0.90 | 3.18 | 1.26 | 1.06 |
| | | 5.86 | 10.71 | 4.73 | 10.48 | 13.17 | 2.51 | 9.86 | 4.27 | 2.05 |
| 10 | RU5P | 17.71 | 8.68 | 4.28 | 15.76 | 9.33 | 2.33 | 5.41 | 4.02 | 2.01 |
| | | 12.90 | 17.39 | 6.04 | 12.78 | 2.73 | 2.52 | 13.00 | 4.23 | 2.36 |
| | | ND | | | ND | | | ND | | |
| 11 | E4P | 27.22 | 50.55 | 27.12 | 33.56 | 48.26 | 13.42 | 38.14 | 13.89 | 5.34 |
| | | 34.62 | 46.81 | 19.99 | 43.86 | 42.19 | 10.40 | 15.88 | 16.19 | 6.47 |
| | | 49.02 | 72.93 | 34.59 | 41.73 | 23.62 | 11.14 | 26.84 | 17.18 | 5.64 |
| 12 | S7P | 7.97 | 7.52 | 8.59 | 8.44 | 11.77 | 5.36 | 10.36 | 5.69 | 6.00 |
| | | 9.88 | 10.85 | 5.21 | 10.16 | 8.69 | 4.69 | 5.83 | 7.74 | 4.98 |
| | | 12.50 | 10.09 | 9.18 | 9.91 | 4.20 | 3.98 | 6.42 | 6.00 | 5.83 |
| 13 | PEP | 2.14 | 8.14 | 5.68 | 8.90 | 12.07 | 4.31 | 8.79 | 13.94 | 2.67 |
| | | 15.41 | 8.26 | 4.62 | 15.19 | 10.39 | 5.41 | 9.57 | 15.16 | 3.22 |
| | | 9.09 | 15.30 | 5.84 | 10.13 | 5.60 | 6.77 | 16.08 | 8.13 | 3.87 |
| 14 | PYR | ND | | | ND | | | ND | | |
| | | 3610 | 7247 | 2903 | 1439 | 1676 | 137.3 | 3518 | 71.95 | 28.06 |
| | | 4583 | 6559 | 3023 | 3002 | 1986 | 86.86 | 95.61 | 66.25 | 23.17 |
| 15 | Xilose | 2759 | 6119 | 2089 | 2775 | 111.3 | 144.6 | 130.8 | 82.97 | 29.28 |
| | | ND | | | ND | | | ND | | |
| | | ND | | | ND | | | ND | | |
| 17 | Glicose | ND | | | ND | | | ND | | |
| 18 | Glicerol | ND | | | ND | | | ND | | |
| 19 | Xilitol | 584.4 | 1267 | 1874 | 795.2 | 954.3 | 298.6 | 1202 | 265.8 | 172.6 |
| | | 980.5 | 1134 | 1213 | 1149 | 859.6 | 200.4 | 318.6 | 250.6 | 164.0 |
| | | 1561 | 1594 | 1561 | 1063 | 348.9 | 220.8 | 435.3 | 280.0 | 157.1 |

*ND: não detectado

Tabela 6. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura *S. stipitis* nos pontos de coleta (20h, 28h e 40h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e C), sob condição microaeróbica.

| # | Metabólitos | 20h | | | 28h | | | 40h | | |
|----|-------------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
| | | (µg/mL) | | | (µg/mL) | | | (µg/mL) | | |
| | | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| 1 | ACCOA | ND | | | ND | | | ND | | |
| 2 | AKG | ND | | | ND | | | ND | | |
| 3 | L-MAL | 20.03 | 18.50 | 17.72 | 30.59 | 30.00 | 26.30 | 7.46 | 6.63 | 26.17 |
| | | 21.85 | 19.00 | 13.37 | 27.00 | 27.66 | 23.00 | 6.38 | 5.48 | 21.86 |
| | | 21.90 | 21.35 | 16.33 | 29.87 | 33.23 | 25.18 | 6.52 | 6.07 | 28.15 |
| 4 | Gly3P | 4.02 | 4.27 | 4.47 | 4.02 | 5.58 | 3.77 | 0.44 | 0.36 | 4.10 |
| | | 4.32 | 4.40 | 3.26 | 3.76 | 4.98 | 3.43 | 0.41 | 0.32 | 3.28 |
| | | 4.30 | 4.89 | 3.94 | 4.08 | 6.08 | 4.01 | 0.39 | 0.34 | 4.33 |
| 5 | G6P | 4.70 | 3.20 | 3.73 | 5.93 | 7.78 | 6.52 | - | - | 6.01 |
| | | 4.40 | 3.64 | 1.84 | 4.17 | 7.04 | 6.02 | - | - | 5.42 |
| | | 4.41 | 5.99 | 2.59 | 6.30 | 8.66 | 7.03 | - | - | 5.60 |
| 6 | F6P | 7.42 | 5.86 | 3.58 | 8.71 | 8.61 | 6.56 | 1.87 | 1.50 | 7.96 |
| | | 7.55 | 9.06 | 2.86 | 9.32 | 8.19 | 5.78 | 1.65 | 1.30 | 4.80 |
| | | 8.11 | 6.76 | 3.75 | 8.76 | 10.20 | 7.00 | 1.73 | 1.55 | 7.93 |
| 7 | DHAP | 1.84 | 2.60 | - | 3.41 | 3.59 | - | 3.07 | - | - |
| | | 5.52 | 2.82 | - | 4.74 | 2.17 | - | - | - | - |
| | | 3.54 | 3.59 | - | 3.40 | - | - | 2.10 | - | - |
| 8 | GAP | ND | | | ND | | | ND | | |
| 9 | R5P | 3.66 | 4.07 | - | 3.94 | 3.27 | - | 0.73 | 0.78 | - |
| | | 3.21 | 2.63 | - | 2.71 | 3.90 | - | 0.48 | 0.83 | - |
| | | 4.61 | 4.44 | - | 4.80 | 6.50 | - | 0.72 | 0.89 | - |
| 10 | RU5P | 13.97 | 13.90 | 2.96 | 9.50 | 6.58 | 3.31 | 3.50 | 4.23 | 2.83 |
| | | 9.87 | 5.83 | 2.57 | 5.88 | 9.30 | 2.78 | 1.95 | 4.07 | 2.64 |
| | | 20.47 | 15.68 | 2.65 | 16.49 | 23.03 | 3.26 | 3.62 | 4.92 | 2.73 |
| 11 | E4P | 1.80 | 1.96 | 1.64 | 2.06 | 1.91 | 1.69 | 1.43 | 1.60 | 1.87 |
| | | 1.79 | 1.76 | 1.60 | 1.82 | 1.91 | 1.56 | 1.26 | 1.64 | 1.74 |
| | | 2.03 | 2.00 | 1.52 | 1.80 | 2.24 | 1.99 | 1.55 | 1.54 | 1.83 |
| 12 | S7P | 15.25 | 12.13 | 8.46 | 20.00 | 21.66 | 13.83 | 2.20 | 2.52 | 19.53 |
| | | 15.08 | 14.33 | 7.52 | 18.63 | 20.73 | 11.14 | 2.13 | 2.78 | 9.95 |
| | | 18.65 | 2.79 | 9.26 | 22.30 | 28.57 | 12.61 | 2.11 | 2.65 | 16.72 |
| 13 | PEP | 4.13 | 3.15 | 3.44 | 3.81 | 4.17 | 3.03 | 3.22 | 4.42 | 2.36 |
| | | 4.21 | 3.23 | 2.70 | 3.00 | 3.74 | 3.01 | 3.37 | 4.58 | 3.25 |
| | | 3.91 | 4.06 | 3.72 | 3.91 | 3.86 | 3.20 | 3.17 | 4.15 | 2.80 |
| 14 | PYR | 8.51 | 7.62 | - | 7.38 | 7.16 | 0.48 | 5.19 | 5.44 | 0.88 |
| | | 6.51 | 6.12 | - | 8.15 | 7.42 | 0.40 | 2.66 | 5.15 | 0.66 |
| | | 9.34 | 8.72 | - | 9.70 | 11.83 | 0.92 | 4.64 | 7.60 | 0.81 |
| 15 | Xylu | ND | | | ND | | | ND | | |
| 16 | Xilose | 4700 | 6575 | 5470 | 3997 | 4628 | 2874 | - | 5.54 | 2478 |
| | | 5202 | 5453 | 3316 | 2165 | 3739 | 2154 | - | 3.42 | 1852 |
| | | 5697 | 4688 | 3816 | 2746 | 5064 | 3491 | - | 5.78 | 3813 |
| 17 | Glicose | ND | | | ND | | | ND | | |
| 18 | Glicerol | ND | | | ND | | | ND | | |
| 19 | Xilitol | 246.8 | 278.3 | 190.6 | 235.4 | 328.3 | 199.8 | 83.94 | 98.68 | 222.7 |
| | | 243.9 | 272.2 | 112.7 | 131.2 | 250.5 | 118.9 | 78.23 | 89.37 | 122.2 |
| | | 266.6 | 281.0 | 133.2 | 150.4 | 360.8 | 218.7 | 78.89 | 88.76 | 305.4 |

*ND: não detectado

Apesar da complexidade das amostras biológicas o efeito de matriz não foi significativo para a interpretação dos dados. As Figuras 12 e 13 mostram uma sobreposição dos cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *S. stipitis* com as soluções padrão destes compostos, nas condições aeróbica e microaeróbica, respectivamente. Além disso, é possível observar isômeros diferentes dos padrões, nos canais de MRM selecionados para os padrões R5P e Ru5P (Figura 12d) e G6P e F6P (Figura 13c).

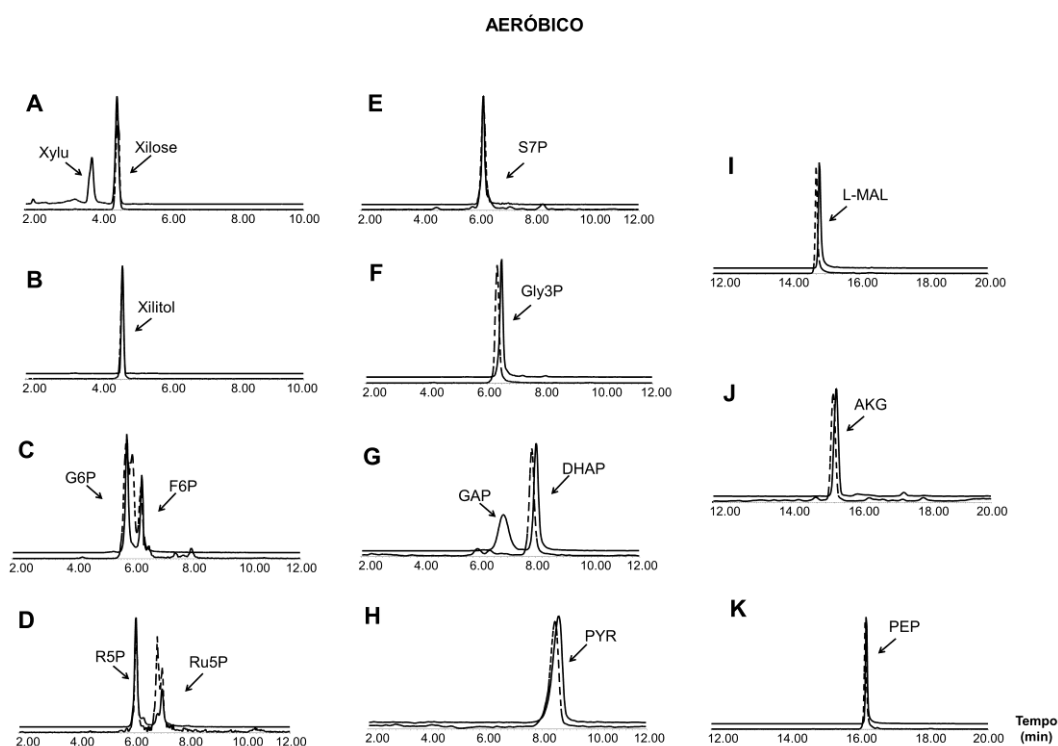


Figura 12. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *S. stipitis* com as soluções padrão destes compostos, nas condições aeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilose, b) xilitol, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), d) ribose-5-fosfato (R5P) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), e) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), f) glicerol-3-fosfato (Gly3P), g) dihidroxiacetona fosfato (DHAP), h) ácido pirúvico (PYR), i) ácido málico (L-MAL), j) ácido alfa cetoglutárico (AKG), k) fosfo (enol) piruvato (PEP).

MICROAERÓBICO

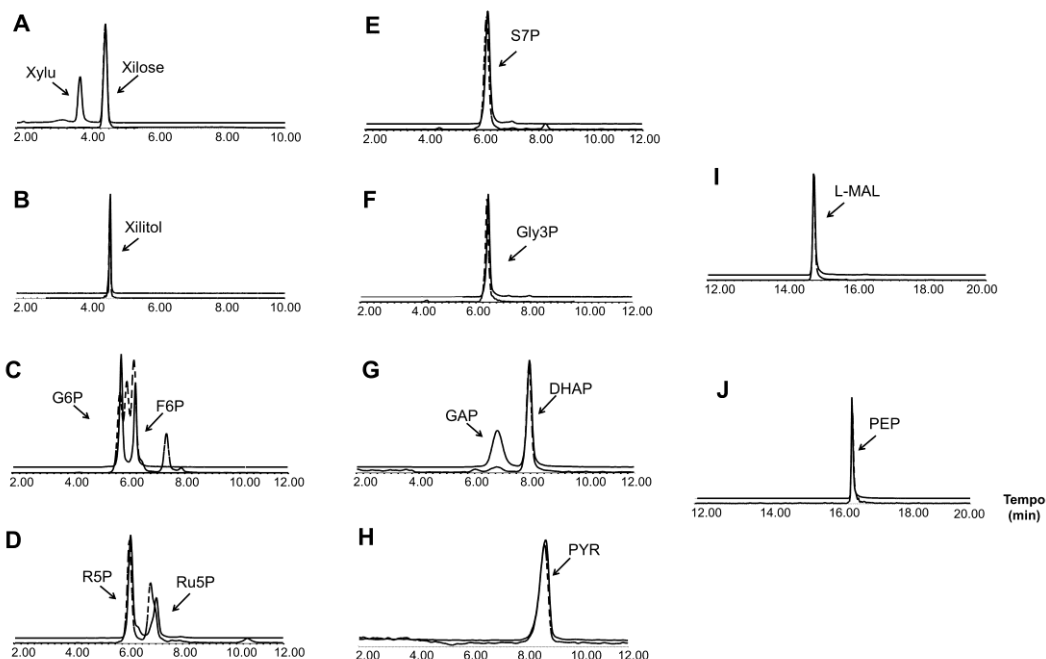


Figura 13. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *S. stipitis* com as soluções padrão destes compostos, nas condições microaeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilose, b) xilitol, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), d) ribose-5-fosfato (R5P) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), e) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), f) glicerol-3-fosfato (Gly3P), g) di-hidroxi acetona fosfato (DHAP), h) ácido pirúvico (PYR), i) ácido málico (L-MAL), j) fosfo(enol)piruvato (PEP).

A levedura *S. stipitis* tem alta capacidade de produção de etanol a partir da xilose possuindo rendimento máximo de 0.48 g.g^{-1} ⁷⁰, a fermentação realizada alcançou um rendimento de 0.45 g.g^{-1} sob condições microaeróbicas (Figura 14). Este resultado condiz com outros estudos realizados para esta espécie, os quais indicam que a regulação no nível de oxigênio é o fator principal para a produção de etanol ^{61,70,71}.

S. stipitis

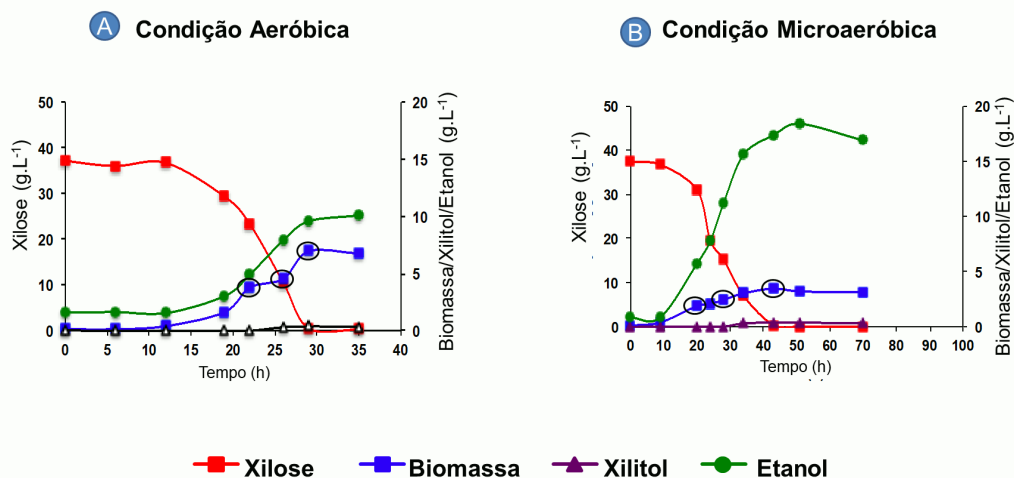


Figura 14. Gráficos dos produtos da fermentação da xilose pela levedura *Scheffersomyces stipitis* (xilose, xilitol e etanol) e da biomassa sob as condições de crescimento a) aeróbica e b) microaeróbica.

Em contrapartida a quantidade de biomassa para a condição aeróbica (0.16 g.g⁻¹) é praticamente o dobro em relação a condição microaeróbica (0.09 g.g⁻¹). Estes resultados podem explicar a identificação do metabólito AKG apenas na condição aeróbica, o metabólito AKG faz parte do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Figura 4), de fato, a fermentação sob condições aeróbicas leva ao metabolismo respiratório. Já a E4P é um intermediário importante para conectar a via das pentoses fosfato (PPP) à via glicolítica (Figura 4) permitindo assim que a xilose seja convertida a etanol, característica de uma fermentação com pouco oxigênio.

4.3.2 Quantificação dos metabólitos intracelulares da levedura *S. passalidarum* por UHPLC-MS/MS

A levedura *Spathaspora passalidarum* é atualmente a mais promissora levedura fermentadora de xilose em termos de crescimento e fermentação a etanol^{68,72}. Esta espécie foi originalmente isolada do intestino médio de um besouro pascal que habita em madeiras branca de decomposição.

A *S. passalidarum* possui duas enzimas XR, uma delas utiliza NADH como cofator o que permite consumir mais eficientemente xilose e produzir etanol sob condições de crescimento aeróbica e microaeróbica, em comparação com outras leveduras fermentadoras de xilose como a *S. stipitis*, por exemplo, e outras espécies nativas⁷³.

A partir das amostras analisadas nos tempos 9, 13 e 21h de fermentação aeróbica e 40, 45 e 55h de fermentação microaeróbica foi possível quantificar 15 e 14 metabólitos, respectivamente (Tabelas 7 e 8). Sendo que, 12 destes compostos (ácido málico (L-MAL), glicerol-3-fosfato (Gly3P), glicose-6-fosfato (G6P), frutose-6-fosfato (F6P), diidroxiacetona-fosfato (DHAP), ribose-5-fosfato (R5P), ribulose-5-fosfato (Ru5P), eritrose-4-fosfato (E4P), sedoheptulose-7-fosfato (S7P), fosfo(enol)piruvato (PEP), ácido pirúvico (PYR), xilose e xilitol) foram quantificados em ambas as condições de crescimento em amostras de *S. passalidarum*. O metabólito acetil co-A (ACCOA) foi detectado apenas na condição microaeróbica, enquanto que os compostos, ácido alfa cetoglutárico (AKG) e glicerol foram quantificados apenas nas amostras obtidas com livre demanda de oxigênio. Tendo em vista que o glicerol também é um produto de fermentação, não é possível garantir que o glicerol detectado é proveniente do citosol, ou seja, do interior da célula.

Tabela 7. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura *S. passalidarum* nos pontos de coleta (9h, 13h e 21h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e C), sob condição aeróbica.

| # | Metabólitos | 9h (µg/mL) | | | 13h (µg/mL) | | | 21h (µg/mL) | | |
|----|-------------|---------------|-------|-------|----------------|-------|--------|----------------|-------|-------|
| | | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| 1 | ACCOA | ND | | | ND | | | ND | | |
| 2 | AKG | - | - | - | 4.03 | 4.10 | - | 12.53 | 10.10 | 8.45 |
| | | - | - | - | 1.82 | 5.65 | - | 7.74 | 14.05 | 6.83 |
| | | - | - | - | 1.66 | 7.22 | 3.48 | 10.42 | 17.62 | 9.39 |
| 3 | L-MAL | 36.17 | 45.51 | 56.14 | 95.04 | 85.64 | 78.86 | 82.17 | 77.57 | 69.29 |
| | | 35.13 | 52.24 | 63.75 | 85.15 | 85.86 | 78.62 | 69.96 | 76.34 | 69.35 |
| | | 37.83 | 43.39 | 69.79 | 82.37 | 91.57 | 98.11 | 72.46 | 81.73 | 73.54 |
| 4 | Gly3P | 6.55 | 7.14 | 7.59 | 6.14 | 3.45 | 8.14 | 8.45 | 8.04 | 3.91 |
| | | 5.88 | 8.17 | 8.95 | 4.99 | 5.07 | 8.18 | 6.58 | 8.19 | 3.91 |
| | | 6.61 | 6.42 | 10.87 | 4.90 | 5.80 | 10.88 | 7.22 | 9.00 | 4.43 |
| 5 | G6P | 9.16 | 11.52 | 8.45 | 4.93 | 3.92 | 12.59 | 10.50 | 14.16 | 6.43 |
| | | 8.60 | 15.39 | 8.63 | 4.31 | 5.98 | 13.11 | 11.61 | 10.40 | 5.99 |
| | | 10.42 | 12.87 | 10.13 | 5.42 | 8.47 | 16.51 | 11.27 | 7.41 | 7.08 |
| 6 | F6P | 13.39 | 14.42 | 18.21 | 8.75 | 6.15 | 17.37 | 11.70 | 7.47 | 7.88 |
| | | 12.60 | 17.99 | 20.52 | 8.91 | 9.99 | 17.88 | 10.33 | 9.02 | 7.09 |
| | | 13.21 | 13.64 | 29.86 | 9.57 | 12.28 | 27.54 | 10.82 | 8.19 | 8.22 |
| 7 | DHAP | 2.48 | 3.54 | 2.65 | 1.81 | 1.40 | 2.57 | 1.41 | 1.52 | 0.93 |
| | | 2.28 | 4.24 | 2.20 | 1.33 | 2.82 | 2.63 | 1.26 | 1.08 | 0.89 |
| | | 3.91 | 5.56 | 3.77 | 1.91 | 3.81 | 4.51 | 1.21 | 1.09 | 0.95 |
| 8 | GAP | ND | | | ND | | | ND | | |
| 9 | R5P | 2.59 | 3.25 | 2.85 | 2.38 | 1.92 | 2.71 | 1.61 | 1.46 | 1.33 |
| | | 2.34 | 3.85 | 2.84 | 1.91 | 3.34 | 2.66 | 1.41 | 1.39 | 1.28 |
| | | 3.53 | 4.96 | 3.02 | 2.57 | 3.75 | 4.10 | 1.43 | 1.38 | 1.33 |
| 10 | RU5P | 3.47 | 3.92 | 5.57 | 5.05 | 3.08 | 5.10 | 3.00 | 2.36 | 2.18 |
| | | 3.15 | 5.52 | 5.73 | 3.23 | 9.09 | 5.29 | 2.31 | 2.17 | 2.43 |
| | | 4.22 | 5.74 | 5.24 | 5.42 | 11.92 | 7.95 | 1.40 | 2.38 | 2.10 |
| 11 | E4P | 2.53 | 2.49 | 2.18 | 1.265 | 1.52 | 2.62 | 1.35 | 1.33 | 1.56 |
| | | 1.73 | 1.11 | 2.40 | 1.56 | 1.42 | 2.50 | 1.44 | 1.38 | 1.30 |
| | | 1.88 | 1.80 | 2.65 | 1.99 | 1.66 | 2.84 | 1.46 | 1.52 | 1.63 |
| 12 | S7P | 29.71 | 35.96 | 215.1 | 74.80 | 5.52 | 172.2 | 8.93 | 5.91 | 27.11 |
| | | 29.76 | 61.64 | 271.8 | 51.79 | 46.84 | 190.8 | 7.06 | 7.65 | 26.81 |
| | | 36.20 | 29.79 | 264.9 | 58.27 | 62.13 | 354.8 | 7.99 | 6.49 | 28.16 |
| 13 | PEP | 17.85 | 23.23 | 14.64 | 21.95 | 23.71 | 18.26 | 18.39 | 14.38 | 32.43 |
| | | 16.90 | 19.79 | 13.87 | 21.42 | 22.57 | 17.84 | 16.05 | 15.94 | 32.53 |
| | | 15.46 | 20.72 | 23.37 | 22.27 | 24.12 | 21.20 | 16.45 | 15.87 | 34.25 |
| 14 | PYR | 5.79 | 5.65 | 5.058 | 8.35 | 5.44 | 7.26 | 4.89 | 3.98 | 3.94 |
| | | 5.07 | 7.50 | 6.03 | 5.78 | 6.86 | 8.42 | 3.29 | 3.42 | 3.45 |
| | | 6.97 | 7.67 | 7.96 | 6.35 | 7.25 | 13.44 | 3.58 | 3.83 | 4.03 |
| 15 | Xylu | ND | | | ND | | | ND | | |
| 16 | Xilose | 3654 | 3115 | 2593 | 278.4 | 147.3 | 913.5 | 28.37 | 21.67 | 21.90 |
| | | 3084 | 4221 | 3391 | 222.7 | 137.8 | 961.4 | 21.22 | 23.60 | 21.57 |
| | | 3722 | 3896 | 3468 | 219.0 | 156.6 | 1461 | 23.38 | 22.54 | 22.60 |
| 17 | Glicose | ND | | | ND | | | ND | | |
| 18 | Glicerol | 88.50 | 151.3 | 116.7 | 206.6 | 138.0 | 144.78 | 157.2 | 136.7 | 76.00 |
| | | 90.29 | 207.6 | 157.2 | 159.7 | 134.6 | 152.2 | 108.7 | 115.5 | 80.30 |
| | | 99.67 | 170.5 | 166.5 | 145.7 | 149.9 | 230.9 | 127.3 | 133.8 | 89.92 |
| 19 | Xilitol | 518.1 | 637.8 | 494.6 | 505.22 | 291.2 | 612.8 | 232.5 | 170.5 | 103.2 |
| | | 478.8 | 909.7 | 616.3 | 409.4 | 273.4 | 588.9 | 166.0 | 168.0 | 110.0 |
| | | 546.2 | 643.0 | 803.5 | 374.1 | 316.3 | 901.8 | 186.8 | 180.0 | 120.4 |

*ND: não detectado

Tabela 8. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura *S. passalidarum* nos pontos de coleta (40h, 45h e 55h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração, sob condição microaeróbica.

| # | Metabólitos | 40h (µg/mL) | | | 45h (µg/mL) | | | 55h (µg/mL) | | |
|----|-------------|----------------|-------|--------|----------------|-------|-------|----------------|-------|-------|
| | | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| 1 | ACCOA | 9.48 | 9.65 | 8.32 | 10.69 | 9.52 | 8.71 | 14.48 | 18.91 | 12.32 |
| | | 9.08 | 8.98 | 7.60 | 9.88 | 9.82 | 8.29 | 14.31 | 17.03 | 12.34 |
| | | 9.42 | 10.12 | 7.30 | 9.85 | 10.92 | 9.16 | 15.23 | 16.96 | 13.41 |
| 2 | AKG | 49.23 | 50.06 | 40.62 | 62.52 | 53.64 | 49.33 | 61.30 | 50.68 | 53.59 |
| | | 47.12 | 47.02 | 30.79 | 54.63 | 56.36 | 45.84 | 57.94 | 48.33 | 51.02 |
| | | 45.52 | 50.76 | 29.22 | 53.00 | 57.82 | 53.26 | 60.00 | 46.60 | 54.22 |
| 3 | L-MAL | 5.82 | 5.80 | 4.31 | 7.42 | 5.07 | 5.75 | 2.34 | 0.96 | 2.09 |
| | | 5.44 | 5.37 | 2.94 | 5.91 | 5.89 | 4.97 | 2.05 | 0.60 | 1.87 |
| | | 5.18 | 5.97 | 2.74 | 5.46 | 6.23 | 6.74 | 2.23 | 0.20 | 2.21 |
| 4 | Gly3P | 12.58 | 17.23 | 9.60 | 16.00 | 15.78 | 16.54 | 6.36 | 8.92 | 5.56 |
| | | 12.70 | 16.08 | 6.15 | 15.75 | 18.13 | 15.79 | 5.88 | 8.34 | 6.16 |
| | | 11.37 | 16.86 | 6.85 | 13.44 | 20.52 | 21.58 | 7.39 | 13.70 | 7.51 |
| 5 | G6P | 18.21 | 21.51 | 11.80 | 21.40 | 20.26 | 10.80 | 7.28 | 8.98 | 9.81 |
| | | 17.64 | 20.39 | 6.68 | 19.64 | 19.35 | 8.93 | 7.42 | 7.94 | 8.68 |
| | | 19.75 | 23.21 | 6.59 | 20.37 | 25.56 | 12.77 | 8.52 | 14.81 | 10.75 |
| 6 | F6P | 1.87 | 3.51 | 1.05 | 4.02 | 3.11 | 0.95 | 1.45 | 1.04 | 0.55 |
| | | 2.22 | 3.20 | 0.70 | 2.73 | 3.33 | 0.87 | 1.57 | 0.71 | 0.56 |
| | | 2.65 | 3.37 | 0.81 | 3.18 | 3.55 | 1.02 | 2.34 | 1.49 | 0.56 |
| 7 | DHAP | 4.11 | 8.29 | 1.22 | 8.16 | 6.32 | 1.31 | 2.12 | 2.09 | 1.16 |
| | | 6.35 | 6.97 | 1.12 | 5.26 | 8.04 | 1.42 | 2.16 | 1.41 | 1.12 |
| | | 4.66 | 5.85 | 1.22 | 5.54 | 6.82 | 1.56 | 2.52 | 2.36 | 1.12 |
| 8 | GAP | 8.78 | 14.15 | 7.91 | 14.33 | 10.37 | 5.08 | 5.29 | 3.76 | 2.60 |
| | | 10.05 | 11.06 | 5.68 | 10.22 | 13.88 | 4.74 | 4.89 | 2.70 | 2.47 |
| | | 8.08 | 10.20 | 5.09 | 9.53 | 13.25 | 5.87 | 6.13 | 3.76 | 2.56 |
| 9 | R5P | 2.72 | 2.66 | 2.28 | 2.91 | 2.61 | 2.73 | 2.15 | 1.78 | 2.29 |
| | | 2.64 | 2.66 | 2.13 | 2.55 | 2.75 | 2.41 | 2.06 | 1.79 | 2.26 |
| | | 2.55 | 2.58 | 2.33 | 2.50 | 2.66 | 2.62 | 1.75 | 1.79 | 2.20 |
| 10 | RU5P | 93.88 | 124.1 | 86.64 | 205.4 | 35.80 | 59.42 | 19.38 | 30.93 | 11.94 |
| | | 93.85 | 96.33 | 121.84 | 131.2 | 32.11 | 48.66 | 17.25 | 15.20 | 9.82 |
| | | 81.63 | 146.5 | 186.6 | 108.7 | 25.60 | 101.5 | 19.63 | 14.64 | 14.12 |
| 11 | PEP | 9.39 | 11.69 | 12.56 | 15.51 | 12.21 | 13.62 | 20.38 | 18.68 | 19.67 |
| | | 9.29 | 8.02 | 6.61 | 12.82 | 11.78 | 9.42 | 19.62 | 16.66 | 17.84 |
| | | 11.04 | 15.47 | 6.17 | 13.94 | 16.63 | 15.58 | 20.30 | 19.11 | 20.80 |
| 12 | S7P | 2.16 | 3.74 | 0.42 | 6.98 | 4.33 | 0.54 | 6.93 | 4.61 | 2.17 |
| | | 3.33 | 2.06 | 0.29 | 4.84 | 4.37 | 0.42 | 6.12 | 4.26 | 2.14 |
| | | 2.90 | 3.58 | 0.22 | 5.20 | 4.82 | 0.50 | 7.91 | 4.51 | 3.36 |
| 13 | Xylu | 3266 | 2299 | 3341 | 2514 | 1082 | 1639 | 51.50 | 27.77 | 54.56 |
| | | 2621 | 1751 | 2620 | 1683 | 1253 | 1260 | 41.37 | 14.08 | 43.82 |
| | | 2266 | 2338 | 2441 | 1770 | 1490 | 1627 | 48.46 | 17.99 | 59.43 |
| 14 | Xilose | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| | | 428.6 | 248.3 | 287.6 | 591.6 | 181.7 | 402.4 | 129.6 | 57.48 | 220.0 |
| | | 364.0 | 201.0 | 167.1 | 346.5 | 228.0 | 296.2 | 106.4 | 44.42 | 169.0 |
| 15 | Glicose | 322.9 | 272.3 | 153.1 | 307.5 | 273.4 | 428.7 | 114.9 | 46.28 | 215.6 |
| | | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| | | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 16 | Glicerol | 428.6 | 248.3 | 287.6 | 591.6 | 181.7 | 402.4 | 129.6 | 57.48 | 220.0 |
| | | 364.0 | 201.0 | 167.1 | 346.5 | 228.0 | 296.2 | 106.4 | 44.42 | 169.0 |
| | | 322.9 | 272.3 | 153.1 | 307.5 | 273.4 | 428.7 | 114.9 | 46.28 | 215.6 |
| 17 | Xilitol | 428.6 | 248.3 | 287.6 | 591.6 | 181.7 | 402.4 | 129.6 | 57.48 | 220.0 |
| | | 364.0 | 201.0 | 167.1 | 346.5 | 228.0 | 296.2 | 106.4 | 44.42 | 169.0 |
| | | 322.9 | 272.3 | 153.1 | 307.5 | 273.4 | 428.7 | 114.9 | 46.28 | 215.6 |

*ND: não detectado

A confirmação da identidade dos metabólitos alvo produzidos pela levedura *S. passalidarum* pode ser observada através da sobreposição dos cromatogramas de MRM das amostras com seus respectivos padrões em ambas as condições de crescimento (Figuras 15 e 16). É possível ainda visualizar um isômero não identificado, no canal de MRM selecionado para os padrões G6P e F6P (Figura 16c).

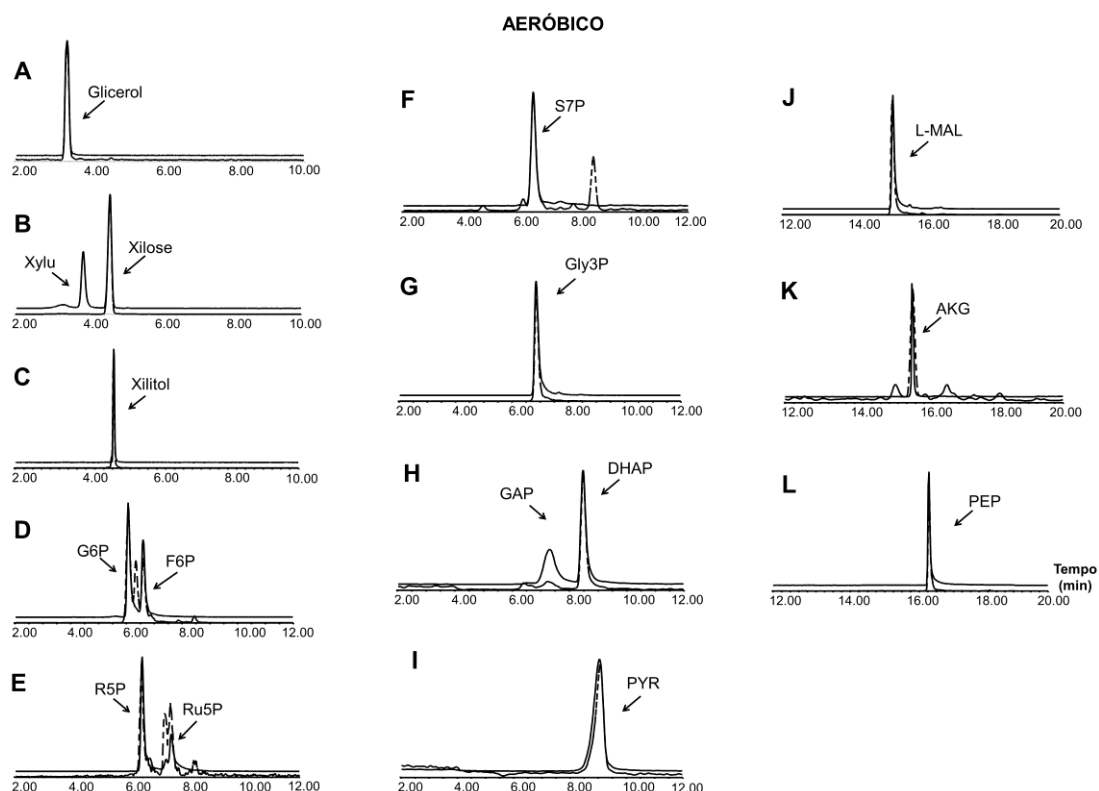


Figura 15. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *S. passalidarum* com as soluções padrão destes compostos, nas condições aeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) glicerol, b) xilose, c) xilitol, d) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), e) ribose-5-fosfato (R5P) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), f) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), g) glicerol-3-fosfato (Gly3P), h) dihidroxiacetona fosfato (DHAP), i) ácido pirúvico (PYR), j) ácido málico (L-MAL), k) ácido alfa cetoglutárico (AKG) e l) fosfo(enol)piruvato (PEP).

MICROAERÓBICO

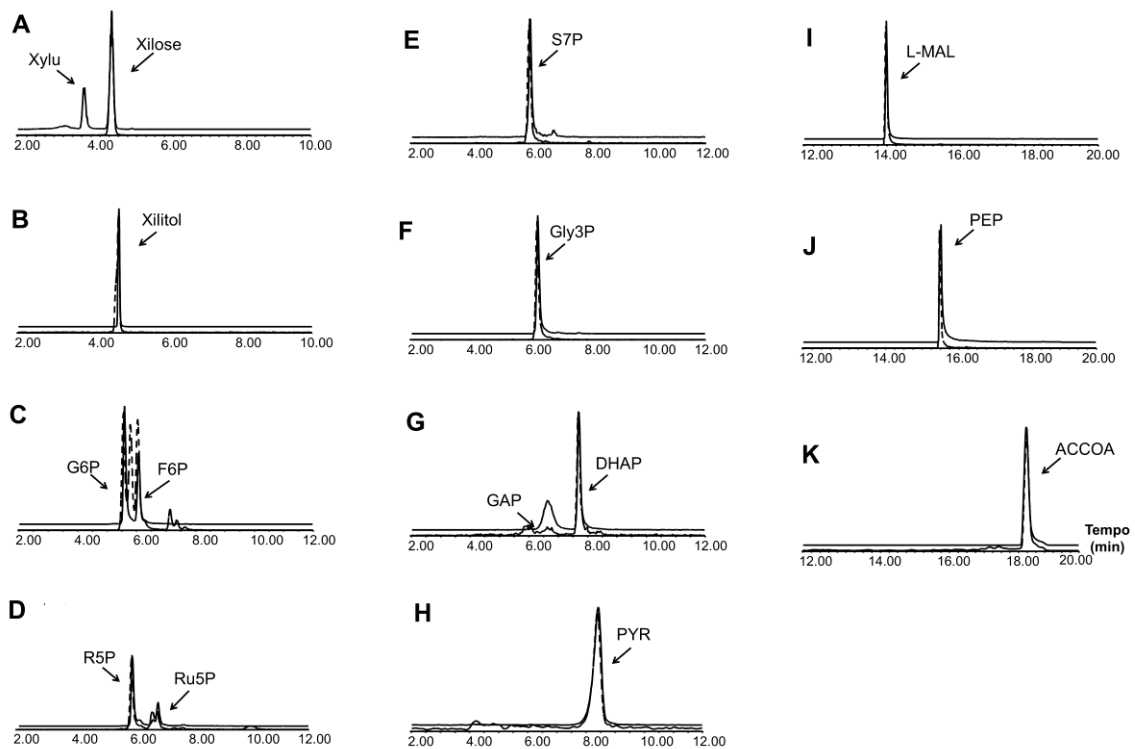


Figura 16. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *S. passalidarum* com as soluções padrão destes compostos, nas condições aeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilose, b) xilitol, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), d) ribose-5-fosfato (R5P) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), e) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), f) glicerol-3-fosfato (Gly3P), g) dihidroxiacetona fosfato (DHAP), h) ácido pirúvico (PYR), i) ácido málico (L-MAL), j) fosfo(enol)piruvato (PEP) e k) acetil co-enzima A (ACCOA).

A levedura *S. passalidarum* apresentou alto rendimento de etanol (0.48 g.g⁻¹), sob condições microaeróbicas, alto consumo de xilose e baixa produção de xilitol (Figura 17).

S. passalidarum

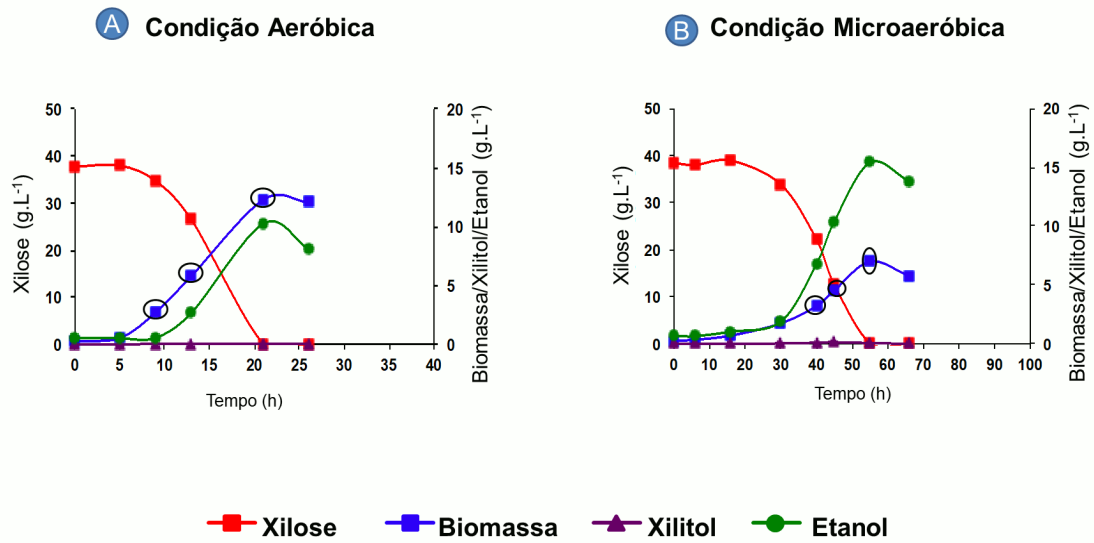


Figura 17. Gráficos dos produtos da fermentação da xilose pela levedura *Spathaspora passalidarum* (xilose, xilitol e etanol) e da biomassa sob as condições de crescimento a) aeróbica e b) microaeróbica.

Acredita-se que o habitat natural desta espécie, o intestino médio de besouros pascal, seja um ambiente com baixa demanda de oxigênio, desta forma é esperado uma melhor evolução no consumo de açúcares pela *S. passalidarum* sob condições de oxigênio limitado⁷⁹.

4.3.3 Quantificação dos metabólitos intracelulares da levedura *S. arborariae* por UHPLC-MS/MS

A linhagem *Spathaspora* contém várias espécies de leveduras fermentadoras de xilose isoladas de madeira em decomposição ou de insetos que perfuram a madeira⁷⁴. A levedura *S. arborariae* é uma das espécies mais recentes descobertas desta linhagem capaz de fermentar eficientemente xilose a etanol⁶⁸. Um total de 13 metabólitos (xilitol, xilose, ácido pirúvico (PYR), sedoheptulose-7-fosfato (S7P), glicose-6-fosfato (G6P), frutose-6-fosfato (F6P), glicerol-3-fosfato (Gly3P), ácido málico (L-MAL), fosfo (enol) piruvato (PEP), acetil Co-enzima A (ACCOA), ribose-5-fosfato (R5P), ribulose-5-fosfato (Ru5P) e dihidroxi acetona (DHAP)) foram quantificados nas amostras de *S. arborariae* em ambas as condições de crescimento (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura *S. arborariae* nos pontos de coleta (17h, 22h e 26h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e C) sob condição aeróbica.

| # | Metabólitos | 17h | | | 22h | | | 26h | | |
|----|-------------|---------|-------|-------|---------|-------|--------|---------|-------|-------|
| | | (µg/mL) | | | (µg/mL) | | | (µg/mL) | | |
| | | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| 1 | ACCOA | 14.20 | 18.40 | 20.81 | 15.97 | 22.61 | 22.51 | 36.20 | 29.77 | 24.19 |
| | | 14.83 | 15.60 | 16.03 | 16.59 | 19.07 | 17.54 | 28.25 | 28.22 | 21.95 |
| | | 15.20 | 17.16 | 19.33 | 18.58 | 19.45 | 19.61 | 28.73 | 27.75 | 25.37 |
| 2 | AKG | ND | | | ND | | | ND | | |
| 3 | L-MAL | 57.10 | 79.00 | 67.07 | 59.52 | 98.55 | 75.23 | 48.80 | 27.25 | 77.43 |
| | | 57.54 | - | 49.12 | 56.00 | 74.96 | 56.50 | 37.08 | 29.34 | 64.15 |
| | | 51.00 | 66.70 | 76.37 | 79.33 | 74.20 | 57.44 | 34.53 | - | - |
| 4 | Gly3P | 6.02 | 7.23 | 5.01 | 7.15 | 17.60 | 7.14 | 7.94 | 1.76 | 8.75 |
| | | 5.83 | 5.39 | 4.09 | 7.48 | 15.32 | 5.38 | 6.05 | 1.70 | 7.30 |
| | | 5.81 | 5.55 | 5.16 | 8.11 | 15.52 | 5.63 | 5.76 | 1.65 | 10.62 |
| 5 | G6P | 2.49 | 3.75 | 2.17 | 5.21 | 18.42 | 2.65 | 13.82 | 4.63 | 13.78 |
| | | 2.68 | 2.92 | 2.02 | 4.94 | 13.09 | 2.07 | 9.68 | 4.46 | 15.82 |
| | | 3.70 | 4.65 | 2.06 | 6.13 | 14.80 | 2.80 | 8.97 | 4.88 | 17.45 |
| 6 | F6P | 4.40 | 5.71 | 3.91 | 6.94 | 14.17 | 3.91 | 10.70 | 5.00 | 22.69 |
| | | 4.45 | 4.47 | 3.09 | 7.13 | 10.74 | 3.67 | 7.75 | 4.77 | 14.55 |
| | | 4.25 | 5.07 | 3.76 | 9.23 | 11.85 | 3.68 | 6.54 | 4.71 | 23.27 |
| 7 | DHAP | 1.43 | 1.82 | 0.88 | 1.82 | 2.55 | 0.91 | 1.58 | 1.35 | 6.49 |
| | | 1.36 | 1.61 | 1.04 | 1.83 | 2.70 | 0.89 | 1.53 | 1.28 | 4.71 |
| | | 1.54 | 1.71 | 0.90 | 2.05 | 3.35 | 0.87 | 1.46 | 1.17 | 5.21 |
| 8 | GAP | ND | | | ND | | | ND | | |
| 9 | R5P | 2.86 | 3.13 | 1.71 | 2.87 | 3.74 | 1.78 | 2.74 | 2.34 | 5.58 |
| | | 2.53 | 2.56 | 1.67 | 3.00 | 3.52 | 1.76 | 2.48 | 2.24 | 4.90 |
| | | 2.75 | 3.06 | 1.66 | 3.30 | 3.78 | 1.77 | 2.00 | 2.04 | 9.56 |
| 10 | RU5P | 15.45 | 24.08 | 25.71 | 21.50 | 19.33 | 40.80 | 13.48 | 3.51 | 22.28 |
| | | 15.00 | 19.38 | 30.00 | 21.87 | 18.20 | 28.06 | 11.31 | 3.11 | 21.21 |
| | | 15.19 | 19.81 | 34.23 | 22.37 | 18.91 | 35.31 | 10.71 | 3.38 | 28.76 |
| 11 | E4P | ND | | | ND | | | ND | | |
| 12 | S7P | 33.03 | 39.10 | 8.76 | 32.46 | 61.18 | 19.64 | 38.82 | 13.11 | 90.72 |
| | | 25.90 | - | 4.46 | 32.71 | 39.32 | 7.24 | 26.66 | 14.32 | 60.38 |
| | | 30.15 | 34.61 | 14.21 | 46.82 | 43.21 | 11.92 | 19.75 | - | - |
| 13 | PEP | 5.88 | 17.02 | 11.38 | 16.41 | 24.53 | 16.41 | 42.31 | 35.39 | 21.31 |
| | | 12.82 | 14.44 | - | 18.92 | 23.66 | 12.82 | 33.20 | 34.04 | 16.27 |
| | | 11.03 | 12.85 | 9.65 | 20.16 | 20.29 | 12.21 | 33.00 | 31.78 | 19.60 |
| 14 | PYR | 0.6348 | 3.00 | 2.09 | 1.01 | 5.25 | 2.54 | 2.83 | 2.38 | 5.16 |
| | | 0.6265 | 2.15 | 2.07 | 0.87 | 4.26 | 2.11 | 1.71 | 2.20 | 4.03 |
| | | 0.6319 | 3.16 | 2.28 | 1.92 | 4.52 | 2.33 | 1.53 | 1.97 | 4.63 |
| 15 | Xylu | ND | | | ND | | | ND | | |
| 16 | Xilose | 5974 | 4456 | 436.0 | 3412 | 719.4 | 506.08 | 268.9 | 345.7 | 2129 |
| | | 5171 | 3357 | 414.0 | 3244 | 550.6 | 306.11 | 207.6 | 329.6 | 1585 |
| | | 4700 | 3735 | 416.4 | 4068 | 600.9 | 394.61 | 196.5 | 295.6 | 2474 |
| 17 | Glicose | ND | | | ND | | | ND | | |
| 18 | Glicerol | ND | | | ND | | | ND | | |
| 19 | Xilitol | 832.4 | 1188 | 584.2 | 1104 | 2461 | 991.0 | 1436 | 3205 | 1216 |
| | | 688.9 | 894.0 | 605.4 | 1087 | 1872 | 436.8 | 812.9 | 3170 | 905.2 |
| | | 725.3 | 936.3 | 625.5 | 1229 | 1918 | 588.6 | 765.4 | 3136 | 1500 |

*ND: não detectado

Tabela 10. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura *S. arborariae* nos pontos de coleta (27h, 32h e 41h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e C), sob condição microaeróbica.

| # | Metabólitos | 27h | | | 32h | | | 41h | | |
|----|-------------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
| | | (µg/mL) | | | (µg/mL) | | | (µg/mL) | | |
| | | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| 1 | ACCOA | 6.95 | 10.72 | 8.01 | 6.61 | 10.75 | 8.30 | 5.24 | 9.96 | 9.33 |
| | | 5.73 | 10.21 | 7.79 | 6.28 | 10.58 | 8.17 | 5.21 | 9.89 | 8.86 |
| | | 6.04 | 10.79 | 8.05 | 6.95 | 10.87 | 8.65 | 5.34 | 10.11 | 9.21 |
| 2 | AKG | ND | | | ND | | | ND | | |
| 3 | L-MAL | 8.22 | 8.98 | 8.06 | 15.56 | 19.80 | 14.32 | 4.95 | 7.51 | 13.38 |
| | | 6.73 | 7.54 | 7.76 | 11.39 | 12.70 | 12.95 | 5.59 | 7.85 | 11.74 |
| | | 11.38 | 11.07 | 12.70 | 19.15 | 20.93 | 14.92 | 7.04 | 11.20 | 15.67 |
| 4 | Gly3P | 2.17 | 1.93 | 1.74 | 2.78 | 3.01 | 2.17 | 1.18 | 1.55 | 3.95 |
| | | 1.74 | 1.63 | 1.61 | 2.07 | 2.12 | 1.92 | 1.40 | 1.70 | 3.43 |
| | | 2.38 | 2.09 | 2.23 | 2.98 | 3.02 | 2.46 | 1.51 | 2.18 | 4.00 |
| 5 | G6P | 1.23 | 11.82 | 2.26 | 1.08 | 5.46 | 4.28 | 3.38 | 6.87 | 12.55 |
| | | 1.54 | 9.09 | 2.91 | 2.57 | 5.50 | 4.17 | 2.88 | 8.55 | 12.00 |
| | | 2.01 | 11.45 | 5.21 | 4.25 | 8.57 | 5.30 | 4.85 | 11.46 | 13.08 |
| 6 | F6P | 4.79 | 8.65 | 4.82 | 4.10 | 6.87 | 4.60 | 3.66 | 5.31 | 9.45 |
| | | 5.49 | 7.59 | 4.42 | 3.87 | 5.38 | 4.42 | 3.57 | 6.92 | 9.27 |
| | | 7.35 | 9.46 | 5.31 | 5.86 | 7.71 | 6.90 | 4.79 | 8.29 | 11.11 |
| 7 | DHAP | 1.69 | 1.32 | 0.39 | 0.53 | 1.51 | 0.61 | 1.03 | 1.77 | 1.62 |
| 8 | GAP | ND | | | ND | | | ND | | |
| 9 | R5P | 1.70 | 2.81 | 1.87 | 1.03 | 2.11 | 1.85 | 1.07 | 1.80 | 3.81 |
| | | 1.60 | 2.32 | 1.42 | 0.75 | 2.17 | 1.85 | 0.93 | 1.91 | 3.88 |
| | | 1.53 | 3.09 | 1.86 | 1.94 | 3.64 | 1.99 | 1.09 | 2.49 | 3.32 |
| 10 | RU5P | 4.04 | 5.59 | 3.65 | 5.81 | 11.00 | 7.96 | 3.61 | 4.38 | 11.11 |
| | | 3.48 | 4.68 | 3.55 | 4.91 | 8.00 | 7.09 | 3.80 | 4.90 | 10.14 |
| | | 4.44 | 5.95 | 4.35 | 7.73 | 11.98 | 8.89 | 4.53 | 6.19 | 11.81 |
| 11 | E4P | ND | | | ND | | | ND | | |
| 12 | S7P | 12.32 | 22.80 | 10.82 | 13.71 | 22.61 | 14.74 | 7.35 | 9.43 | 23.93 |
| | | 12.13 | 18.62 | 10.44 | 12.90 | 15.96 | 13.07 | 7.06 | 11.25 | 20.74 |
| | | 19.21 | 24.47 | 17.06 | 21.25 | 23.07 | 18.90 | 9.59 | 15.19 | 26.52 |
| 13 | PEP | 3.24 | 4.12 | 3.19 | 4.84 | 6.55 | 3.65 | 2.09 | 4.80 | 6.27 |
| | | 4.16 | 3.60 | 2.71 | 3.57 | 4.54 | 3.51 | 1.40 | 6.80 | 5.41 |
| | | 2.52 | 5.44 | 3.00 | 4.36 | 5.94 | 5.42 | 2.84 | 6.58 | 7.56 |
| 14 | PYR | 2.13 | 1.50 | 0.54 | 1.81 | 2.10 | 0.51 | 1.35 | 1.17 | 1.36 |
| | | 1.73 | 1.33 | 0.32 | 1.28 | 1.80 | 0.57 | 1.79 | 1.40 | 1.01 |
| | | 1.42 | 1.60 | 0.42 | 1.86 | 2.28 | 0.58 | 1.16 | 1.39 | 1.05 |
| 15 | Xylu | ND | | | ND | | | ND | | |
| 16 | Xilose | - | 6153 | 3944 | - | 5929 | 4791 | - | 2609 | 3166 |
| | | - | 5332 | 3508 | - | 5453 | 4709 | - | 3589 | 2375 |
| | | - | 7743 | 4465 | - | 4628 | 5186 | - | 3546 | 3019 |
| 17 | Glicose | ND | | | ND | | | ND | | |
| 18 | Glicerol | ND | | | ND | | | ND | | |
| 19 | Xilitol | - | 436.3 | 353.9 | - | 524.4 | 377.7 | - | 618.2 | 871.5 |
| | | - | 354.0 | 325.4 | - | 352.2 | 361.5 | - | 757.9 | 705.2 |
| | | - | 451.3 | 491.3 | - | 454.4 | 465.3 | - | 975.2 | 902.2 |

*ND: não detectado

As Figuras 18 e 19 mostram um baixo efeito de matriz através da sobreposição significativa dos cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *S. arborariae* com as soluções padrão destes compostos, nas condições aeróbica e microaeróbica, respectivamente. Além disso, outro isômero, diferente dos padrões, foi detectado no canal de MRM dos metabólitos R5P e Ru5P (Figura 18d).

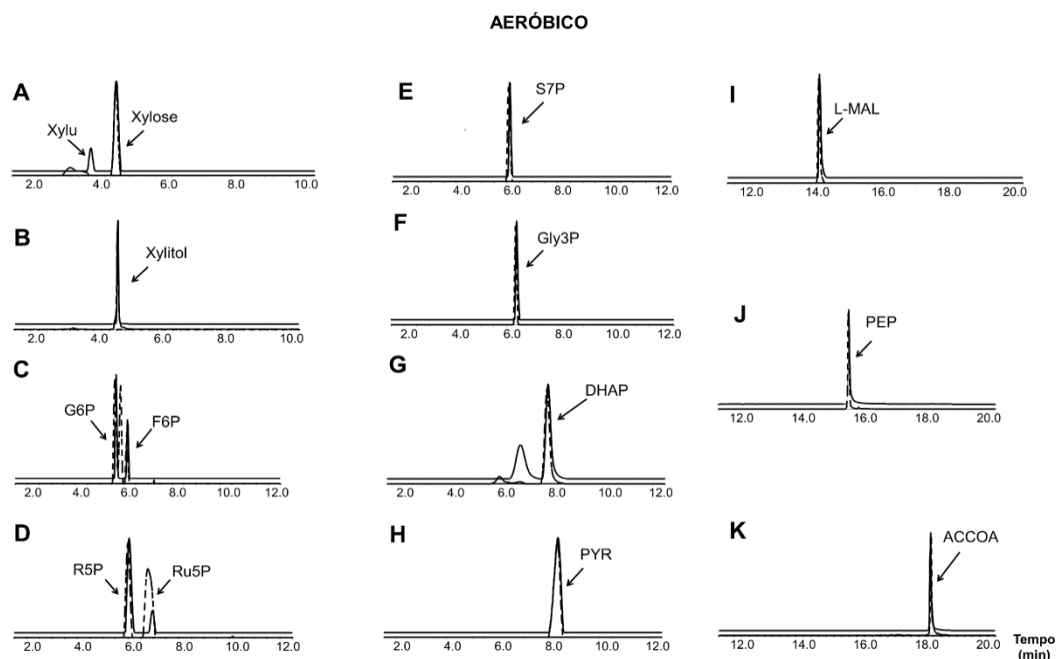


Figura 18. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *S. arborariae* com as soluções padrão destes compostos, nas condições aeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilitol, b) xilose, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), d) ribose-5-fosfato (R5P) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), e) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), f) glicerol-3-fosfato (Gly3P), g) dihidroxiacetona fosfato (DHAP), h) ácido pirúvico (PYR), i) ácido málico (L-MAL), j) fosfo(enol)piruvato (PEP), k) acetil Co-enzima A (ACCOA).

MICROAERÓBICO

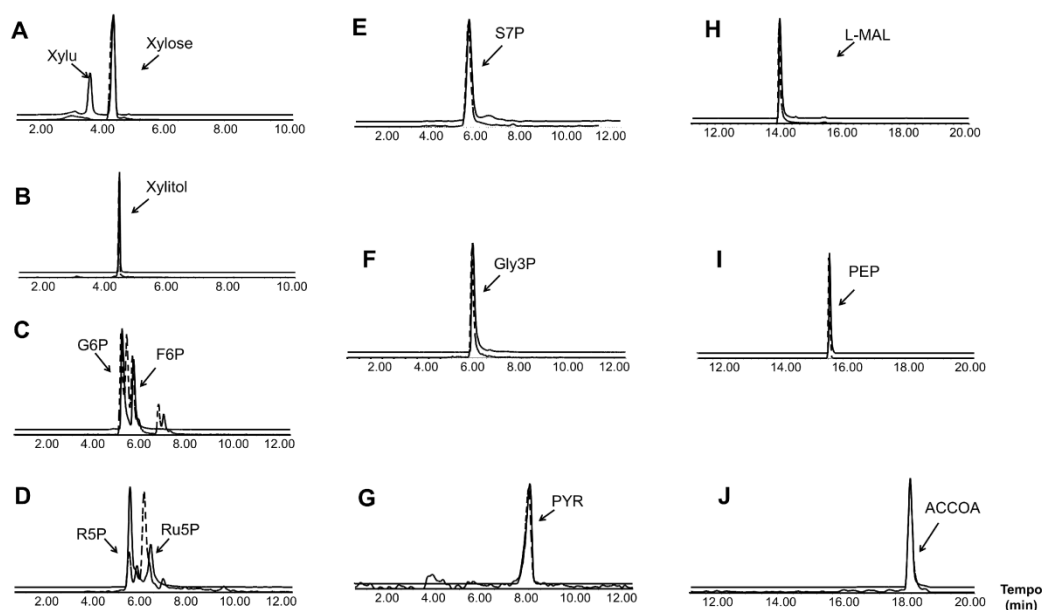


Figura 19. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *S. arborariae* com as soluções padrão destes compostos, nas condições microaeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilitol, b) xilose, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6- fosfato (F6P), d) ribulose-5-fosfato (Ru5P), e) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), f) glicerol-3-fosfato (Gly3P), g) ácido pirúvico (PYR), h) ácido málico (L-MAL), i) fosfo(enol)piruvato (PEP), j) acetil Co-enzima A (ACCOA).

A levedura *S. arborariae* obteve baixos rendimentos na produção de etanol, 0.25 g.g^{-1} (aeróbico) e 0.31 g.g^{-1} (microaeróbico), quando comparado com as outras duas espécies avaliadas (*S. stipitis* e *S. passalidarum*) (Figura 20).

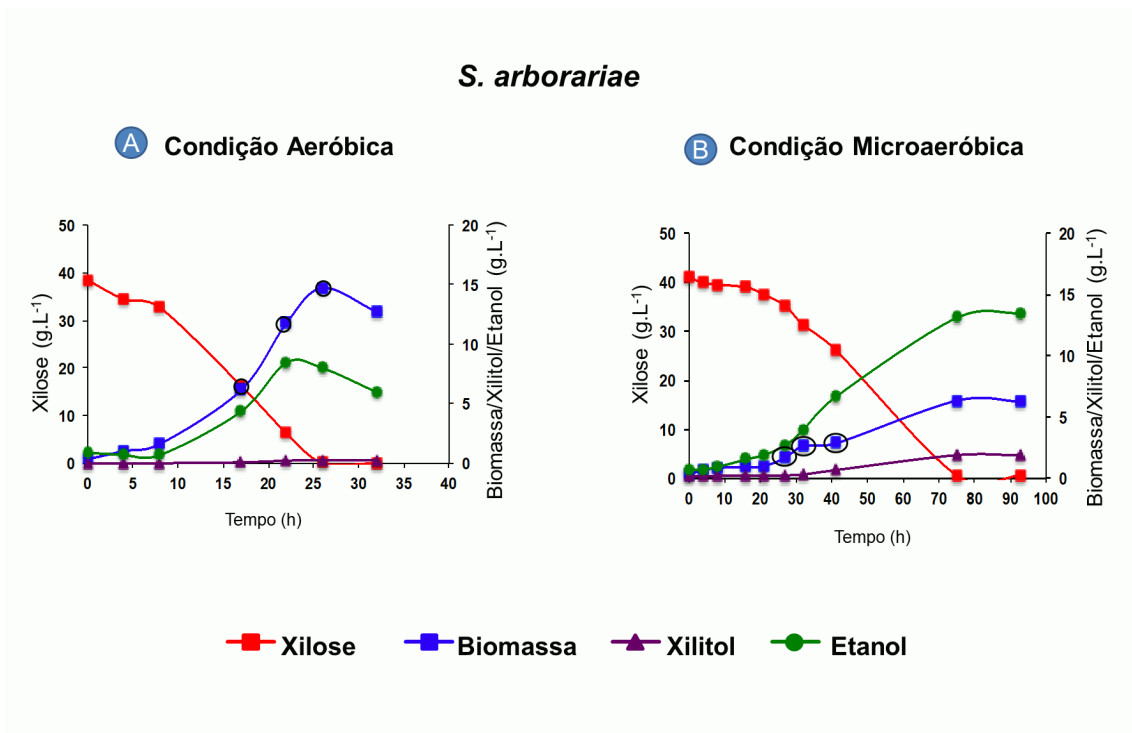


Figura 20. Gráficos dos produtos da fermentação da xilose pela levedura *Spathaspora arborariae* (xilose, xilitol e etanol) e da biomassa sob as condições de crescimento a) aeróbica e b) microaeróbica.

4.3.4 Quantificação dos metabólitos intracelulares da levedura *C. tenuis* por UHPLC-MS/MS

A levedura *Candida tenuis* têm sido estudada na literatura devido sua capacidade de converter xilose a etanol^{4,5,14}. Um total de 10 metabólitos foram quantificados nas amostras de *C. tenuis* na condição aeróbica e 9 metabólitos na condição microaeróbica (Tabelas 11 e 12).

Dentre estes, 8 metabólitos (acetil Co-A (ACCOA), ácido málico (L-MAL), glicerol-3-fosfato (Gly3P), glicose-6-fosfato (G6P), frutose-6-fosfato (F6P), sedoheptulose-7-fosfato (S7P), xilose e xilitol) foram quantificados em ambas as condições. Os compostos dihidroxi acetona fosfato (DHAP) e fosfo(enol)piruvato (PEP) foram quantificados apenas nas amostras obtidas com livre demanda de oxigênio, já os metabólitos R5P e PYR não puderam ser quantificados pois estavam abaixo do limite de quantificação. Para a condição microaeróbica a ribulose-5-fosfato (Ru5P) foi o composto diferencial.

Tabela 11. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura *C. tenuis* nos pontos de coleta (44h, 76h e 83h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e C), sob condição aeróbica.

| # | Metabólitos | 44h | | | 76h | | | 83h | | |
|----|-------------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
| | | (µg/mL) | | | (µg/mL) | | | (µg/mL) | | |
| | | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| 1 | ACCOA | 15.67 | 15.06 | 16.61 | 14.56 | 14.22 | 14.39 | 15.98 | 16.63 | 14.90 |
| | | 14.85 | 14.51 | 16.28 | 15.26 | 14.38 | 13.96 | 16.67 | 17.67 | 15.44 |
| | | 14.80 | 15.19 | 15.86 | 15.36 | 14.24 | 13.93 | 15.63 | 17.40 | 14.92 |
| 2 | AKG | ND | | | ND | | | ND | | |
| 3 | L-MAL | 22.69 | 24.68 | 38.27 | 13.63 | 13.90 | 17.85 | 44.62 | 41.79 | 13.56 |
| | | 20.09 | 21.03 | 36.21 | 27.15 | 13.17 | 14.82 | 45.55 | 15.41 | 32.09 |
| | | 18.38 | 12.38 | 23.74 | 18.47 | 26.36 | 10.91 | 40.55 | 44.00 | 16.07 |
| 4 | Gly3P | 17.75 | 16.38 | 29.91 | 9.85 | 9.81 | 13.02 | 42.94 | 37.00 | 7.67 |
| | | 14.99 | 13.69 | 25.09 | 19.70 | 9.24 | 7.97 | 44.48 | 21.31 | 24.40 |
| | | 11.76 | 8.05 | 24.23 | 11.90 | 17.64 | 6.40 | 35.75 | 39.29 | 24.45 |
| 5 | G6P | 4.68 | 4.37 | 4.71 | 2.48 | 1.75 | 1.51 | 4.64 | 4.44 | 1.31 |
| | | 3.45 | 3.73 | 5.07 | 3.27 | 1.85 | 1.89 | 5.16 | 2.69 | 1.69 |
| | | 4.38 | 3.27 | 5.19 | 3.46 | 1.80 | 1.44 | 5.41 | 5.79 | 1.71 |
| 6 | F6P | 5.82 | 5.17 | 5.95 | 3.84 | 3.30 | 3.06 | 4.94 | 5.07 | 3.03 |
| | | 4.85 | 4.64 | 5.69 | 4.22 | 3.17 | 3.28 | 5.54 | 3.99 | 2.93 |
| | | 5.26 | 4.69 | 5.55 | 4.22 | 3.11 | 2.95 | 5.68 | 6.62 | 3.02 |
| 7 | DHAP | 2.00 | 2.15 | 2.07 | 1.90 | 1.95 | - | 2.00 | 1.99 | 2.22 |
| | | 2.04 | 1.99 | 1.95 | 1.95 | 1.87 | 1.93 | 2.18 | 2.10 | - |
| | | 2.00 | 5.84 | 2.15 | 1.91 | 1.93 | - | 1.92 | 2.70 | 1.88 |
| 8 | GAP | ND | | | ND | | | ND | | |
| 9 | R5P | <LOQ | | | <LOQ | | | <LOQ | | |
| 10 | RU5P | ND | | | ND | | | ND | | |
| 11 | E4P | ND | | | ND | | | ND | | |
| 12 | S7P | 14.19 | 15.57 | 18.84 | 6.20 | 4.38 | 3.75 | 14.78 | 16.19 | 3.17 |
| | | 9.85 | 12.44 | 17.94 | 8.81 | 4.16 | 4.69 | 16.87 | 15.60 | 4.37 |
| | | 12.52 | 14.17 | 18.67 | 8.21 | 4.68 | 3.22 | 16.13 | 21.31 | 4.45 |
| 13 | PEP | 4.94 | 4.48 | 3.02 | 2.52 | 2.64 | 2.41 | 4.49 | 3.12 | 2.29 |
| | | 2.87 | 3.60 | 4.40 | 4.54 | 2.42 | 2.21 | 5.63 | 5.94 | 2.79 |
| | | 3.46 | 3.76 | 3.45 | 2.92 | 1.94 | 1.99 | 5.75 | 6.09 | 2.82 |
| 14 | PYR | <LOQ | | | <LOQ | | | <LOQ | | |
| 15 | Xylu | ND | | | ND | | | ND | | |
| 16 | Xilose | 3581 | 3952 | 4086 | 2189 | 2508 | 1921 | 2012 | 2153 | 2118 |
| | | 3165 | 4110 | 3158 | 2071 | 1732 | 2864 | 2101 | 2113 | 2007 |
| | | 4050 | 3861 | 3696 | 1921 | 2185 | 1764 | 1639 | 2972 | 1984 |
| 17 | Glicose | ND | | | ND | | | ND | | |
| 18 | Glicerol | ND | | | ND | | | ND | | |
| 19 | Xilitol | 3494 | 3351 | 3778 | 2501 | 2149 | 2154 | 6146 | 5491 | 2989 |
| | | 2716 | 3269 | 3173 | 3382 | 1675 | 2318 | 6081 | 4984 | 4385 |
| | | 2882 | 2417 | 3528 | 2591 | 2489 | 1633 | 5467 | 5071 | 4212 |

*ND: não detectado

Tabela 12. Concentração dos metabólitos intracelulares das réplicas da levedura *C. tenuis* nos pontos de coleta (49h, 67h e 94h), durante a fase exponencial de crescimento, e em triplicata de extração (A, B e c), sob condição microaeróbica.

| # | Metabólitos | 49h | | | 67h | | | 94h | | |
|----|-------------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|------|-------|
| | | (µg/mL) | | | (µg/mL) | | | (µg/mL) | | |
| | | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| 1 | ACCOA | 6.85 | 6.88 | 6.84 | 7.10 | 6.90 | 6.64 | 7.49 | 7.36 | 7.44 |
| | | 6.74 | 6.94 | 6.45 | 7.05 | 7.21 | 6.75 | 7.03 | 7.22 | 6.97 |
| | | 6.68 | 6.55 | 6.71 | 7.20 | 7.36 | 6.80 | 7.04 | 7.36 | 7.26 |
| 2 | AKG | ND | | | ND | | | ND | | |
| 3 | L-MAL | 1.74 | 2.15 | 3.50 | 3.14 | 1.86 | 3.70 | 3.14 | 3.55 | 3.67 |
| | | 1.17 | 1.99 | 1.14 | 3.14 | 2.91 | 2.92 | 2.00 | 2.62 | 2.30 |
| | | 1.31 | 0.94 | 3.44 | 2.07 | 1.64 | 2.89 | 2.30 | 3.21 | 2.18 |
| 4 | Gly3P | 0.71 | 0.65 | 1.64 | 1.29 | 0.58 | 1.51 | 1.44 | 1.61 | 2.05 |
| | | 0.55 | 0.66 | 0.55 | 1.40 | 0.76 | 1.27 | 0.88 | 1.02 | 1.12 |
| | | 0.61 | 0.51 | 1.26 | 0.79 | 0.58 | 1.15 | 1.04 | 1.29 | 1.00 |
| 5 | G6P | 1.92 | 2.56 | 1.24 | 2.03 | 2.21 | 0.99 | 1.60 | 1.75 | 1.37 |
| | | 1.36 | 2.36 | 0.79 | 1.99 | 2.94 | 0.97 | 1.04 | 1.37 | 0.96 |
| | | 1.52 | 1.32 | 1.46 | 1.61 | 2.00 | 1.10 | 1.24 | 1.90 | 0.99 |
| 6 | F6P | 3.05 | 3.61 | 2.47 | 3.34 | 3.50 | 2.25 | 2.71 | 2.75 | 2.67 |
| | | 2.59 | 3.66 | 2.06 | 3.20 | 4.20 | 2.16 | 2.34 | 2.66 | 2.21 |
| | | 2.88 | 2.65 | 2.76 | 2.86 | 3.43 | 2.19 | 2.53 | 3.08 | 2.22 |
| 7 | DHAP | ND | | | ND | | | ND | | |
| 8 | GAP | ND | | | ND | | | ND | | |
| 9 | R5P | ND | | | ND | | | ND | | |
| 10 | RU5P | 3.30 | 2.33 | 2.79 | 2.75 | 2.39 | 2.48 | 2.46 | 2.47 | 3.78 |
| | | 3.40 | 2.84 | 2.26 | 3.09 | 1.86 | 4.91 | 2.55 | 2.58 | 2.62 |
| | | 2.35 | 1.75 | 3.29 | 2.93 | 2.57 | 4.42 | 2.29 | 2.20 | 2.53 |
| 11 | E4P | ND | | | ND | | | ND | | |
| 12 | S7P | 4.25 | 5.18 | 3.31 | 5.01 | 3.99 | 2.34 | 3.04 | 2.95 | 2.62 |
| | | 3.05 | 4.62 | 1.50 | 4.31 | 5.14 | 2.04 | 1.94 | 2.16 | 1.46 |
| | | 3.50 | 2.34 | 4.09 | 3.21 | 3.49 | 2.23 | 1.80 | 3.03 | 1.398 |
| 13 | PEP | ND | | | ND | | | ND | | |
| 14 | PYR | ND | | | ND | | | ND | | |
| 15 | Xylu | ND | | | ND | | | ND | | |
| 16 | Xilose | 5416 | 4353 | 5369 | 4142 | 3431 | 3409 | 4084 | 3859 | 3584 |
| | | 4468 | 5803 | 3124 | 5198 | 6432 | 3751 | 3633 | 3633 | 2869 |
| | | 5246 | 3371 | 5220 | 5447 | 3779 | 4387 | 4424 | 4143 | 2507 |
| 17 | Glicose | ND | | | ND | | | ND | | |
| 18 | Glicerol | ND | | | ND | | | ND | | |
| 19 | Xilitol | 370.3 | 630.9 | 508.7 | 798.4 | 684.0 | 522.9 | 1671 | 1650 | 1134 |
| | | 250.5 | 741.1 | 252.8 | 1027 | 1457 | 729.9 | 1378 | 1339 | 810.8 |
| | | 293.2 | 310.7 | 440.7 | 916.0 | 712.3 | 808.1 | 1684 | 1526 | 773.5 |

*ND: não detectado

O glicerol-3-fosfato (Gly3P) está entre os metabólitos mais concentrados nas amostras analisadas sob condição aeróbica (Tabela 11). Esta é uma característica comum desta espécie já relatado na literatura¹⁴. O acúmulo de Gly3P sob condições aeróbicas pode estar relacionado com a alta atividade da enzima XR por esta levedura⁷⁶.

As Figuras 21 e 22 apresentam os cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *C. tenuis* com as soluções padrão destes compostos, nas condições aeróbica e microaeróbica, respectivamente. Como os níveis de concentrações de alguns dos metabólitos ficaram muito próximos dos limites de quantificação a qualidade dos picos cromatográficos para estes compostos foi afetada.

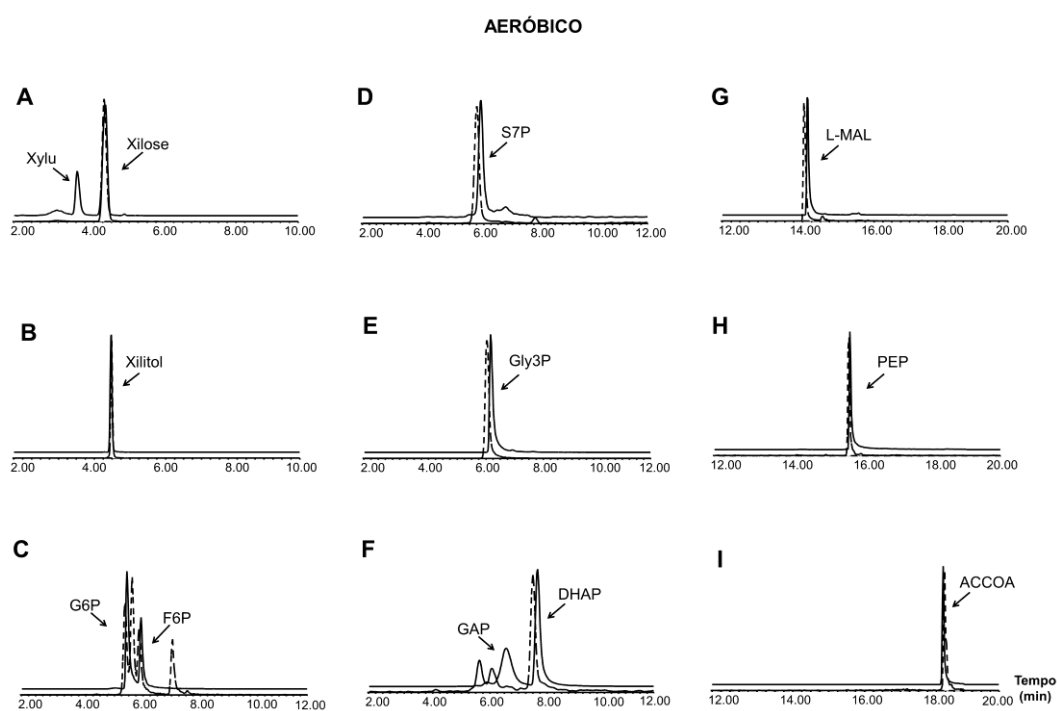


Figura 21. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *C. tenuis* com as soluções padrão destes compostos, na condição aeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilose, b) xilitol, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), d) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), e) glicerol-3-fosfato (Gly3P), f) dihidroxi acetona fosfato (DHAP), g) ácido málico (L-MAL) e h) fosfo(enol)piruvato (PEP) e acetil co-enzima A (ACCOA).

MICROAERÓBICO

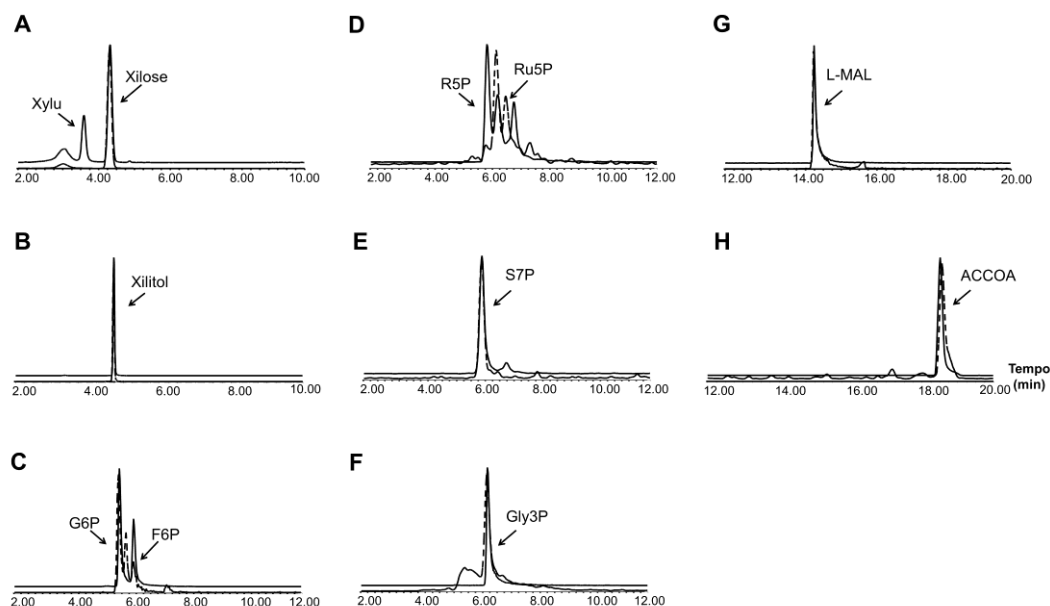


Figura 22. Cromatogramas de MRM dos metabólitos identificados nas amostras da levedura *C. tenuis* com as soluções padrão destes compostos, nas condições microaeróbica. A linha sólida corresponde a solução padrão e a linha pontilhada os metabólitos quantificados na amostra: a) xilose, b) xilitol, c) glicose-6-fosfato (G6P) e frutose-6-fosfato (F6P), d) ribose-5-fosfato (R5P) e ribulose-5-fosfato (Ru5P), e) sedoheptulose-7-fosfato (S7P), f) glicerol-3-fosfato (Gly3P), g) ácido málico (L-MAL) e h) acetil co-enzima A (ACCOA).

Uma quantidade significativa de metabólitos não foi detectado nas amostras de *C. tenuis*, quando comparado com as outras espécies de leveduras em estudo. Embora tenha sido proposto anteriormente que a levedura *C. tenuis* é capaz de fermentar xilose, esta levedura apresentou as menores taxas de consumo de xilose entre as leveduras avaliadas e não foi capaz de produzir etanol em nenhuma das condições de crescimento testadas. Em contrapartida, houve um acúmulo de xilitol durante a fermentação com oxigênio limitado (15.4 g.L^{-1}) (Figura 23). Provavelmente algumas mudanças nos parâmetros da fermentação em relação a trabalhos anteriores podem ter influenciado o metabolismo da *C. tenuis*. A baixa taxa de fluxo de ar durante a fermentação microaeróbica e o uso de meio mineral definido em vez de extrato

de levedura por exemplo, podem estar relacionados com a não detecção de etanol neste experimento⁶¹. Por esta razão a análise estatística e metabólica dessa espécie de levedura não foi realizada.

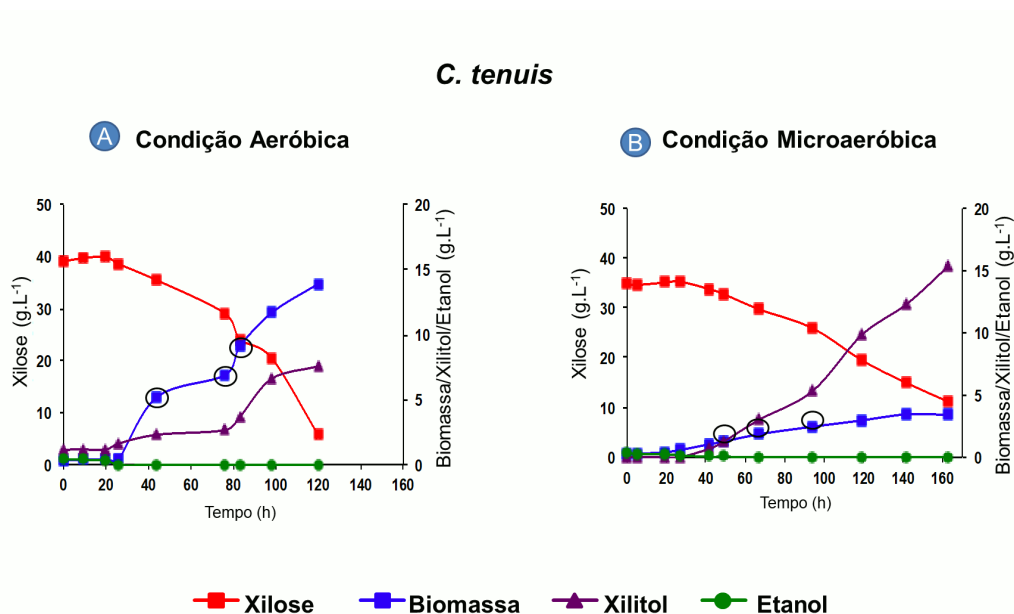


Figura 23. Gráficos dos produtos da fermentação da xilose pela levedura *Candida tenuis* (xilose, xilitol e etanol) e da biomassa sob as condições de crescimento a) aeróbica e b) microaeróbica.

Sendo assim, os dados da quantificação das outras três leveduras avaliadas foram submetidos a análise estatística para a continuação do estudo metabólico dessas espécies.

4.4 Análise estatística dos dados obtidos na quantificação de amostras de leveduras fermentadoras de xilose utilizando ANOVA

Um modelo matemático e biologicamente representativo foi construído para a análise e interpretação dos dados obtidos, devido ao grande número de dados gerados pelas análises metabólicas, conforme apresentado no desenho experimental (Figura 5).

Desta forma, era necessário avaliar diferenças significativas da extração em relação as réplicas biológicas, avaliar a influência do tempo de crescimento

da levedura e determinar se a abundância relativa de cada metabólito identificado foi significativamente diferente entre as condições de crescimento.

A análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas e abordagem *split-plot* foi o modelo matemático escolhido para o tratamento dos dados gerados através do software RStudio, cujo código de programação foi desenvolvido pelo colaborador Igor Ferreira Nascimento, aluno de doutorado na área de estatística da Universidade de Brasília.

A partir do processo experimental desenvolvido (Figura 5) foi necessário realizar as análises estatísticas por medidas repetidas. Inicialmente, as leveduras foram submetidas a dois tipos de tratamentos (aeróbico e microaeróbico) - fator A, e em 3 diferentes tempos de fermentação durante a fase de crescimento exponencial das leveduras - fator B. Ao final do processo em triplicata para cada tratamento, foram obtidas 9 unidades.

As replicatas biológicas são as *whole-plots*, e as variações nessas unidades são responsáveis por analisar o efeito do fator A. Cada *whole-plot* é dividida em três partes denominada *split-plot*, em que o tempo de coleta é atribuída a cada uma. Neste caso, cada uma das 9 unidades teve a concentração medida em cada unidade de tempo. Tais unidades são as medidas repetidas, utilizadas para medir o erro do efeito do fator B e a interação entre o efeito A e B (Figura 24).

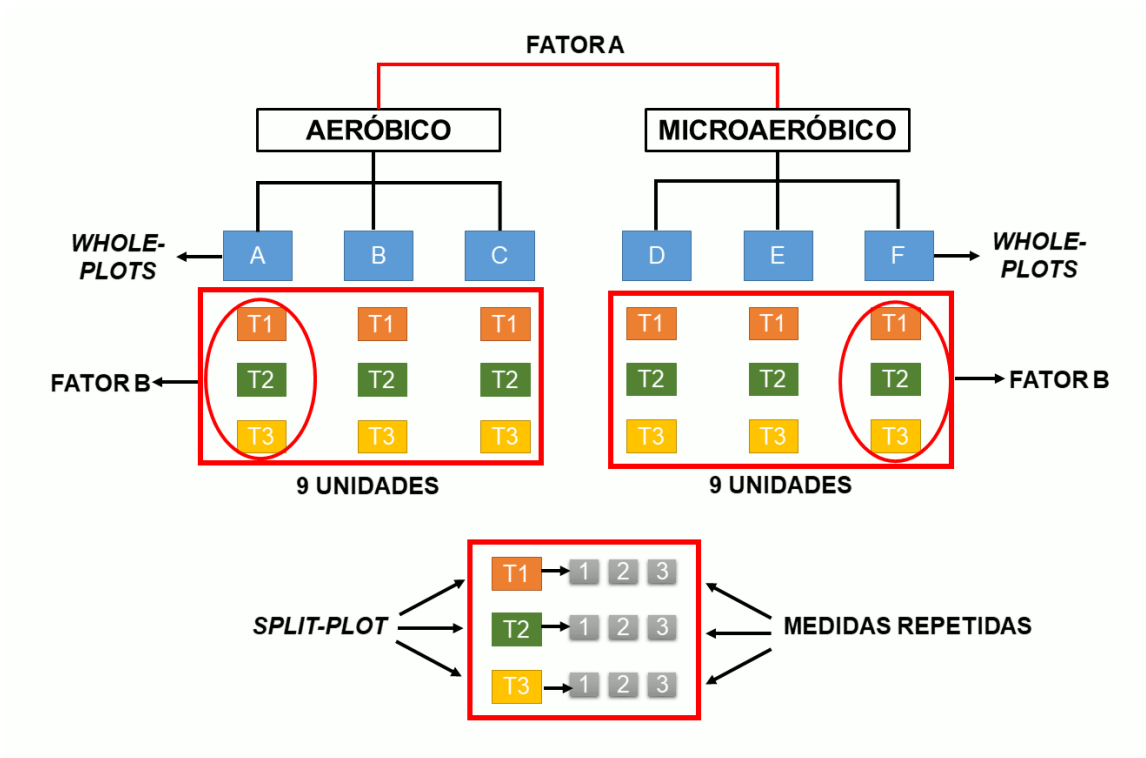


Figura 24. Esquema explicativo da análise estatística por ANOVA com medidas repetidas e design *split-plot*.

Tendo em vista que cada unidade de tempo foi medida três vezes, essas três medidas foram utilizadas para reduzir o erro operacional (extração). Assim para análise estatística foram utilizadas as médias das réplicas de medidas em cada *split-plot* de tempo.

O modelo ANOVA estabeleceu um valor único representativo das concentrações de metabólitos intracelulares, sendo o desvio padrão relativo (RSD) o quociente do desvio padrão pela média das concentrações das réplicas biológicas e técnicas.

4.4.1 Análise e interpretação dos dados da quantificação da levedura *S. stipitis*

As Tabelas 13 e 14 apresentam as médias das concentrações dos metabólitos quantificados nas réplicas biológicas da levedura *S. stipitis* para cada unidade de tempo sob condição aeróbica (22, 26 e 29h) e microaeróbica (20, 28 e 40h).

Como o desvio padrão relativo (RSD) descreve a distribuição dos dados em termos de média, o mesmo foi calculado em porcentagem. Assim quanto menor o valor do desvio padrão relativo, mais homogêneos são os dados, ou seja, menor a dispersão em torno da média. De uma forma geral, valores de RSD em experimentos biológicos podem variar de acordo com o tipo de matriz a ser analisada, sendo este valor dependente da quantidade de variáveis que compõe o processo^{77,78}.

Os maiores valores de desvio padrão relativo (RSD) foram encontrados para os experimentos realizados sob condição aeróbica (Tabela 13), especificamente para os metabólitos L-MAL (121.58%), AKG (64.7%), Gly3P (81.0%) e S7P (51.77%).

Tabela 13. Concentração dos metabólitos quantificados em amostras de *S. stipitis* após tratamento estatístico sob condição aeróbica, nos três tempos de coleta com os respectivos desvios padrão relativo (RSD) para n=3.

| # | Metabólitos | 22h | | 26h | | 29h | |
|----|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | (µg/mL) | RSD (%) | (µg/mL) | RSD (%) | (µg/mL) | RSD (%) |
| 1 | AKG | 7.68 | 64.68 | 10.07 | 22.35 | 11.15 | 44.27 |
| 2 | L-MAL | 69.98 | 14.62 | 71.61 | 71.53 | 28.35 | 73.01 |
| 3 | Gly3P | 13.16 | 27.75 | 8.35 | 81.00 | 3.44 | 121.58 |
| 4 | G6P | 5.72 | 2.93 | 5.33 | 64.98 | 3.66 | 50.16 |
| 5 | F6P | 9.44 | 17.14 | 6.06 | 45.16 | 4.11 | 44.43 |
| 6 | DHAP | 3.33 | 13.40 | 2.89 | 47.30 | <LOQ | - |
| 7 | R5P | 2.97 | 48.49 | 2.95 | 70.17 | 1.51 | 57.49 |
| 8 | Ru5P | 9.82 | 42.23 | 7.96 | 66.45 | 5.25 | 71.64 |
| 9 | S7P | 40.32 | 37.31 | 29.84 | 51.77 | 16.18 | 65.37 |
| 10 | PEP | 9.09 | 14.06 | 7.64 | 33.94 | 6.49 | 15.10 |
| 11 | PYR | 8.28 | 31.98 | 8.93 | 33.95 | 8.85 | 54.72 |
| 12 | Xilose | 4322.00 | 47.85 | 1262.35 | 90.42 | 449.68 | 153.92 |
| 13 | Xilitol | 1307.99 | 19.46 | 654.53 | 58.93 | 360.76 | 71.34 |

Para a condição microaeróbica os valores de desvio padrão relativo do segundo ponto de coleta durante a fase de crescimento exponencial ficaram abaixo de 25% para todos os metabólitos quantificados exceto para o xilitol, que apresentou um RSD de 35.8% (Tabela 14).

Tabela 14. Concentração dos metabólitos quantificados em amostras de *S. stipitis* após tratamento estatístico sob condição microaeróbica, nos três tempos de coleta com os respectivos desvios padrão relativo (RSD) para n=3.

| # | Metabólitos | 20h | | 28h | | 40h | |
|----|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | (µg/mL) | RSD (%) | (µg/mL) | RSD (%) | (µg/mL) | RSD (%) |
| 1 | L-MAL | 18.10 | 22.82 | 28.09 | 10.25 | 11.64 | 77.66 |
| 2 | Gly3P | 3.94 | 19.04 | 4.41 | 22.45 | 1.29 | 122.48 |
| 3 | G6P | 3.53 | 42.21 | 6.61 | 17.85 | 5.35 | 5.61 |
| 4 | F6P | 6.11 | 38.63 | 8.50 | 9.53 | 3.37 | 90.80 |
| 5 | DHAP | 2.86 | 87.41 | 3.50 | 8.57 | 0.09 | 166.67 |
| 6 | R5P | 3.77 | 2.12 | 4.19 | 10.25 | 0.74 | 17.57 |
| 7 | Ru5P | 9.77 | 64.18 | 11.81 | 12.41 | 3.39 | 26.25 |
| 8 | E4P | 1.61 | 29.81 | 1.89 | 14.06 | 1.40 | 13.57 |
| 9 | S7P | 11.50 | 36.78 | 19.94 | 7.41 | 6.73 | 58.10 |
| 10 | PEP | 3.62 | 11.60 | 3.53 | 19.61 | 3.48 | 23.28 |
| 11 | PYR | 5.20 | 86.73 | 8.61 | 11.90 | 3.61 | 76.45 |
| 12 | Xilose | 4991.1 | 14.21 | 3389.29 | 24.82 | 910.15 | 171.74 |
| 13 | Xilitol | 225.05 | 31.09 | 221.58 | 35.85 | 129.80 | 58.21 |

A Tabela 15 apresenta o nível de significância do modelo ANOVA para os fatores avaliados, condição de crescimento (A) e tempo de coleta (B), e a interação entre eles (AB), sendo considerado significativo p-valores até 5%.

O fator B é significativo ao nível de 5% em relação a variável resposta para praticamente todos os metabólitos com exceção para a ribose-5-fosfato e a xilose que apresentaram significância ao nível de 1%. Indicando assim que a concentração destes metabólitos pode ser explicada pelo fator tempo de coleta.

O fator A apresentou significância negativa para os metabólitos fosfo(enol)piruvato (5%) e xilitol (1%) indicando que a variável concentração diminui em experimentos com pouco ou nenhum oxigênio para esta levedura. Além disso, existe um efeito de interação ao nível de 5% para estes metabólitos entre as variáveis condição de crescimento e tempo de coleta.

Tabela 15. Nível de significância do modelo ANOVA para a levedura *S. stipitis* indicando o efeito do p-valor para condição de crescimento (Fator A), tempo de coleta (Fator B) e interação entre os fatores A e B (IAB).

| # | Metabólitos | p-valores | | |
|----|-------------|-----------|----|-----|
| | | A | B | IAB |
| 1 | L-MAL | | | |
| 2 | Gly3P | | * | |
| 3 | G6P | | | |
| 4 | F6P | | * | |
| 5 | DHAP | | * | |
| 6 | R5P | | ** | |
| 7 | Ru5P | | * | |
| 8 | E4P | | | |
| 9 | S7P | | * | |
| 10 | PEP | - | * | * |
| 11 | PYR | | | |
| 12 | Xilose | | ** | |
| 13 | Xilitol | -- | * | * |

Código de significância 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * . 0.1 ' ' 1

Os gráficos com os valores finais da concentração dos metabólitos intracelulares das amostras resultantes da fermentação da levedura *S. stipitis*, durante a fase exponencial de crescimento nas condições de fermentação: aeróbica e microaeróbica obtidos através da ANOVA com medidas repetidas, relacionam as 3 réplicas biológicas e os 3 diferentes tempos de coleta (Figura 25). Desta forma é possível observar a diferença significativa entre as condições de crescimento e o efeito de interação entre as variáveis, condição de crescimento e tempo de coleta.

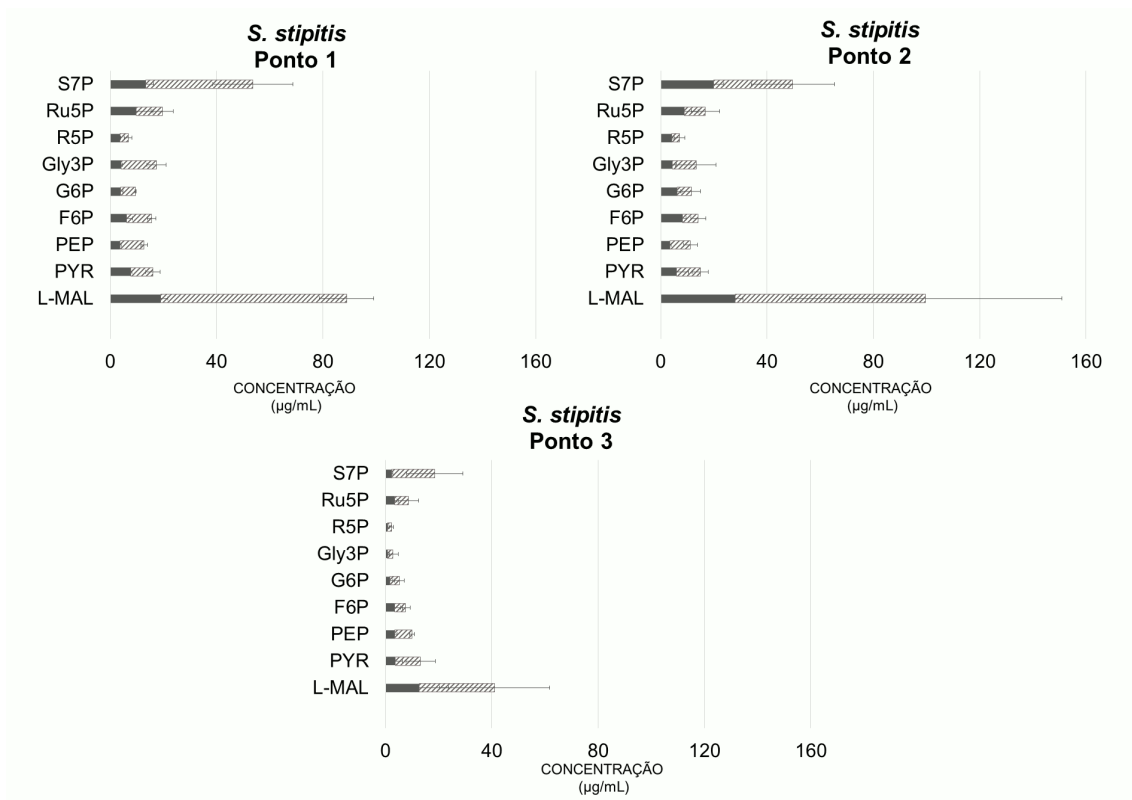


Figura 25. Gráficos dos 3 pontos da fase exponencial de crescimento da levedura *S. stipitis* indicando a concentração final obtida no tratamento estatístico da quantificação das amostras nas condições microaeróbica (cinza escuro) e aeróbica (cinza claro).

A partir, desta análise pode-se concluir que não é possível sintetizar os diferentes estágios de crescimento desta levedura. Sendo necessário escolher um único tempo de coleta para a análise metabolômica. Desta forma, o segundo ponto da fase exponencial foi selecionado, por ser o ponto central de crescimento da levedura onde, os compostos apresentam maior linearidade e menores valores de dispersão dos dados ($RSD < 25\%$), para a maior parte dos metabólitos intracelulares medidos.

A via simplificada do metabolismo da xilose por leveduras é apresentada na Figura 26. As concentrações resultantes da quantificação dos metabólitos das amostras da levedura *S. stipitis* no segundo ponto da fase exponencial de crescimento foram plotados em função das condições de crescimento avaliadas.

O metabolismo da xilose pela *S. stipitis* ocorre pela via oxidoreductiva em duas etapas comum à leveduras fermentadoras de xilose, a xilose redutase (XR) e a xilitol desidrogenase (XDH)⁷¹. No entanto, esta espécie é um dos poucos tipos de levedura que possuem cofatores XR específicos para NADPH e NADH, o que fornece a capacidade de excretar menos xilitol durante a fermentação da xilose, principalmente sob condição microaeróbica (Figura 26). Embora o fluxo glicolítico não tenha sido diretamente afetado pelos níveis de oxigênio, o metabólito L-MAL aumentou cerca de 2.5 vezes quando as células foram submetidas a condição aeróbica, indicando que sob esta condição o fluxo é direcionado para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA).

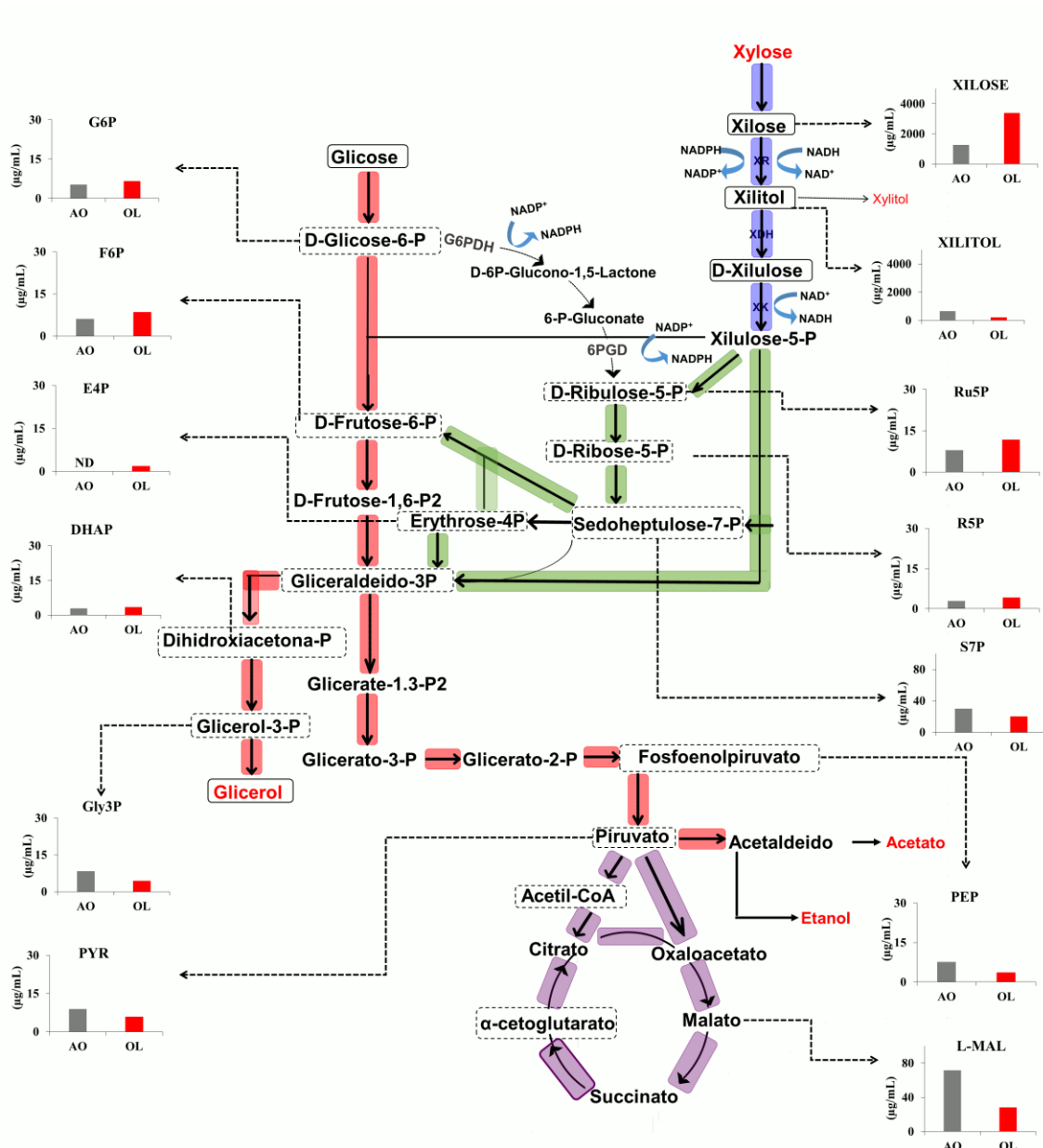


Figura 26. Esquema simplificado do metabolismo central do carbono de xilose a etanol por levedura e concentrações de 13 metabólitos da levedura *S. stipitis* em condições aeróbicas (AO) e oxigênio limitado (OL). Vias metabólicas destacadas: assimilação de xilose oxidoreductiva (azul), via da pentose fosfato (verde), glicólise (vermelha) e ciclo do ácido tricarboxílico (roxo). As caixas pontilhadas indicam qual destes metabólitos são detectados pelo método HILIC e as caixas sólidas indicam as detectadas pelo método IPC.

Conforme já indicado na análise por ANOVA existem indícios estatísticos de que o nível de oxigênio influencia na concentração dos metabólitos. Desta

forma, foi necessário selecionar uma única condição de crescimento para a análise metabolômica.

Os dados obtidos para a condição de crescimento microaeróbica no segundo ponto de coleta apresentaram menores valores de desvio padrão relativo quando comparados com a condição aeróbica (Tabelas 13 e 14). Além disso, os dados apresentados anteriormente (seção 4.3.1) mostraram que a regulação no nível de oxigênio é um fator fundamental para bons rendimentos na produção de etanol para a levedura *S. stipitis*. Tendo esta espécie apresentado maior rendimento de etanol (0.45 g.g^{-1}) sob condições microaeróbicas (Figura 14). Assim, esta foi a condição selecionada para a continuação do estudo da metabolômica desta levedura.

4.4.2 Análise e interpretação dos dados da quantificação da levedura *S. passalidarum*

As concentrações obtidas na quantificação das amostras das leveduras *S. passalidarum* estão apresentadas como uma média das réplicas biológicas com os respectivos valores de RSD, nas duas condições de crescimento e seus respectivos tempos de coleta (Tabelas 15 e 16). O metabólito S7P apresentou os maiores valores de RSD sob condição aeróbica nos três tempos de fermentação analisados (9, 13 e 21 h). Os metabólitos G6P, F6P, xilitol (13h) e PEP (21h) obtiveram coeficientes de variação acima de 40%, os outros metabólitos alcançaram RSD em torno de 30% ou menos (Tabela 16).

Tabela 16. Concentração dos metabólitos quantificados em amostras de *S. passalidarum* após tratamento estatístico sob condição aeróbica, nos três tempos de coleta com os respectivos desvios padrão relativo (RSD) para n=3.

| # | Metabólitos | 09h | | 13h | | 21h | |
|----|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | (µg/mL) | RSD (%) | (µg/mL) | RSD (%) | (µg/mL) | RSD (%) |
| 1 | AKG | - | - | 3.65 | 34.08 | 10.56 | 23.74 |
| 2 | L-MAL | 48.89 | 27.65 | 86.89 | 1.70 | 74.71 | 5.24 |
| 3 | Gly3P | 7.58 | 18.79 | 6.40 | 36.40 | 6.64 | 34.08 |
| 4 | G6P | 10.57 | 22.06 | 8.36 | 59.56 | 9.43 | 27.02 |
| 5 | F6P | 17.10 | 30.00 | 13.27 | 49.99 | 8.97 | 19.32 |
| 6 | DHAP | 3.40 | 26.64 | 2.59 | 31.32 | 1.15 | 17.59 |
| 7 | R5P | 3.25 | 20.66 | 2.86 | 17.57 | 1.40 | 5.72 |
| 8 | Ru5P | 4.73 | 21.01 | 6.24 | 27.77 | 2.26 | 1.53 |
| 9 | E4P | 2.09 | 14.70 | 1.93 | 32.35 | 1.44 | 3.61 |
| 10 | S7P | 108.32 | 113.86 | 118.54 | 88.24 | 14.02 | 82.57 |
| 11 | PEP | 18.43 | 13.34 | 21.47 | 10.24 | 21.81 | 44.84 |
| 12 | PYR | 6.42 | 7.75 | 7.73 | 22.16 | 3.83 | 2.25 |
| 13 | Xilose | 3460.70 | 8.60 | 499.80 | 106.50 | 22.99 | 5.22 |
| 14 | Glicerol | 138.71 | 30.58 | 162.49 | 11.65 | 113.95 | 24.25 |
| 15 | Xilitol | 627.57 | 17.25 | 474.78 | 43.70 | 159.75 | 27.21 |

O experimento sob condições microaeróbicas apresentou baixa dispersão dos dados, principalmente no segundo ponto de coleta (45h de fermentação), onde a maior parte dos metabólitos intracelulares obtiveram RSD abaixo de 10%. Com exceção para os metabólitos G6P (13.10%) e PYR (16.24%) (Tabela 17).

Tabela 17. Concentração dos metabólitos quantificados em amostras de *S. passalidarum* após tratamento estatístico sob condição microaeróbica, nos três tempos de coleta com os respectivos desvios padrão relativo (RSD) para n=3.

| # | Metabólitos | 40h | | 45h | | 55h | |
|----|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | (µg/mL) | RSD (%) | (µg/mL) | RSD (%) | (µg/mL) | RSD (%) |
| 1 | ACCOA | 9.45 | 1.90 | 10.12 | 0.37 | 16.15 | 12.94 |
| 2 | L-MAL | 48.29 | 2.90 | 56.33 | 0.97 | 54.15 | 14.63 |
| 3 | Gly3P | 5.6 | 2.86 | 6.00 | 6.29 | 1.40 | 82.14 |
| 4 | G6P | 14.39 | 23.00 | 16.60 | 13.10 | 8.43 | 31.67 |
| 5 | F6P | 20.12 | 11.13 | 21.10 | 4.21 | 9.16 | 21.83 |
| 6 | DHAP | 2.80 | 27.86 | 3.33 | 0.40 | 1.44 | 34.72 |
| 7 | R5P | 6.04 | 23.34 | 6.69 | 7.79 | 2.11 | 10.43 |
| 8 | Ru5P | 10.39 | 19.25 | 11.93 | 6.75 | 4.43 | 32.51 |
| 9 | E4P | 2.64 | 0.11 | 2.66 | 0.59 | 1.89 | 7.41 |
| 10 | S7P | 106.05 | 21.69 | 140.06 | 8.46 | 24.96 | 35.18 |
| 11 | PEP | 10.82 | 11.92 | 13.82 | 2.82 | 19.13 | 7.21 |
| 12 | PYR | 2.96 | 7.77 | 5.09 | 16.24 | 5.72 | 31.12 |
| 13 | Xilose | 2424.01 | 17.17 | 1632.66 | 30.92 | 33.53 | 57.29 |
| 14 | Xilitol | 306.18 | 30.33 | 321.48 | 41.24 | 83.18 | 57.44 |

A Tabela 18 apresenta os níveis de significância do modelo ANOVA para os p-valores obtidos na análise na levedura *S. passalidarum*. O fator A (microaeróbico) apresentou níveis de significância negativos para os metabólitos L-MAL (1%), PEP (5%) e Gly3P (5%) (Tabela 18), indicando que os valores da concentração diminuem sob efeito desta variável. O contrário ocorre para os compostos R5P e Ru5P em que a condição de crescimento sem oxigênio tem um efeito positivo na concentração ao nível de significância de 1%.

O fator B mostrou ter efeito significativo sob a variável resposta, com nível de significância abaixo de 5%, para a maior parte dos metabólitos analisados (Tabela 18). A concentração dos metabólitos Gly3P e G6P não puderam ser explicados por este fator.

Tabela 18. Nível de significância do modelo ANOVA para a levedura *S. passalidarum* indicando o efeito do p-valor para condição de crescimento (Fator A), tempo de coleta (Fator B) e interação entre os fatores A e B (IAB).

| # | Metabólitos | p-valores | | |
|----|-------------|-----------|-----|-----|
| | | A | B | IAB |
| 1 | L-MAL | -- | ** | |
| 2 | Gly3P | - | | |
| 3 | G6P | | | |
| 4 | F6P | | * | |
| 5 | DHAP | | ** | |
| 6 | R5P | ++ | *** | * |
| 7 | Ru5P | ++ | ** | |
| 8 | E4P | | ** | |
| 9 | S7P | | * | |
| 10 | PEP | - | * | |
| 11 | PYR | | * | * |
| 12 | Xilose | | *** | * |
| 13 | Xilitol | | ** | -- |

Código de significância 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' 1

A Figura 27 apresenta os gráficos com os valores finais da concentração dos metabólitos intracelulares das amostras resultantes da fermentação da levedura *S. passalidarum*. É possível observar as diferenças entre as variáveis tempo de coleta principalmente para os compostos S7P, F6P, G6P que vão diminuindo ao longo do tempo.

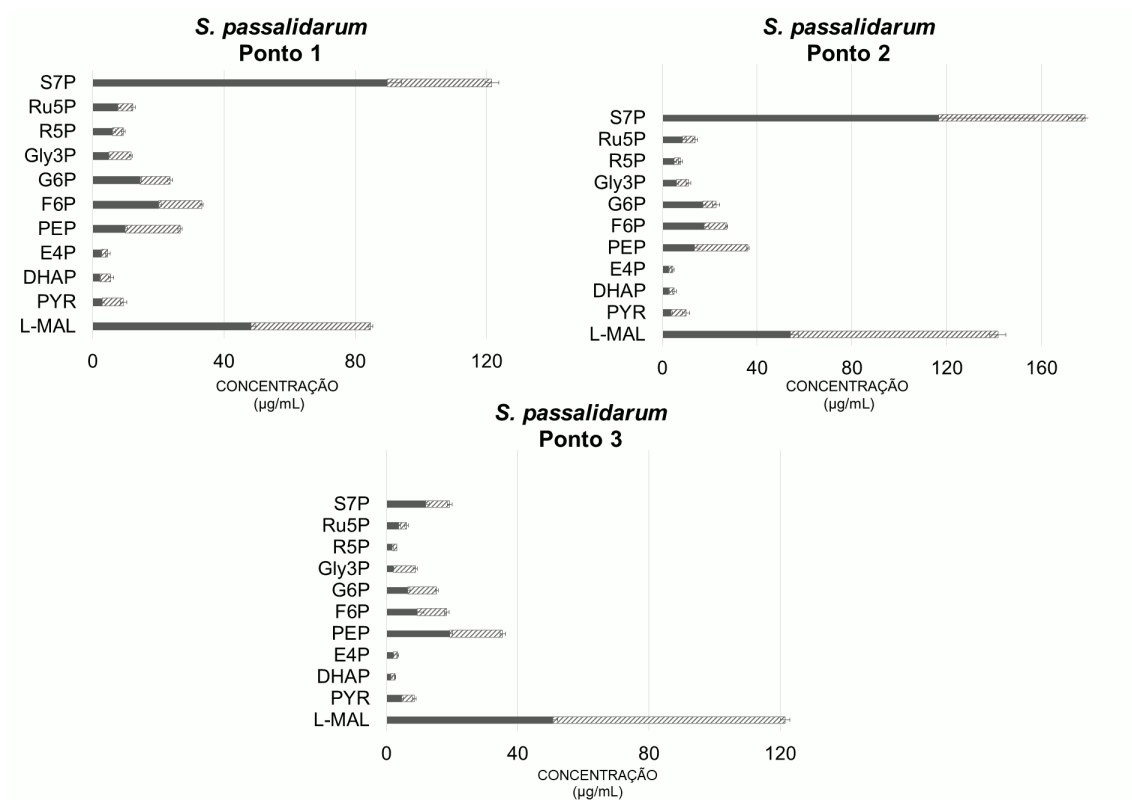


Figura 27. Gráficos dos 3 pontos da fase exponencial de crescimento da levedura *S. passalidarum* indicando a concentração final obtida no tratamento estatístico da quantificação das amostras nas condições microaeróbica (cinza escuro) e aeróbica (cinza claro).

A análise estatística das amostras da levedura *S. passalidarum* também apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao tempo de crescimento da levedura e a condição de crescimento. Desta forma, o segundo ponto de coleta e a condição microaeróbica foram selecionados para a análise metabolômica. O desvio padrão relativo dos metabólitos coletados nestas condições ficou abaixo de 16%. Além disso, a levedura *S. passalidarum* obteve alto rendimento de etanol (0.48 g.g^{-1}), sob condições microaeróbicas (Figura 17).

A enzima XR nesta levedura tem uma preferência por NADH e a enzima XDH é dependente de NAD^+ . Portanto, o NAD^+ exigido pela XDH pode ser satisfeito pela reoxidação do NADH pela XR da *S. passalidarum* (Figura 28), sem necessidade de oxigênio extra⁸⁰.

A levedura *S. passalidarum* apresentou maiores valores de concentração no segundo ponto de coleta para os metabólitos S7P, G6P e F6P

sob condição microaeróbica, indicando que o fluxo do metabolismo da xilose nesta levedura é direcionado para as vias PPP e glicólise (Figura 28).

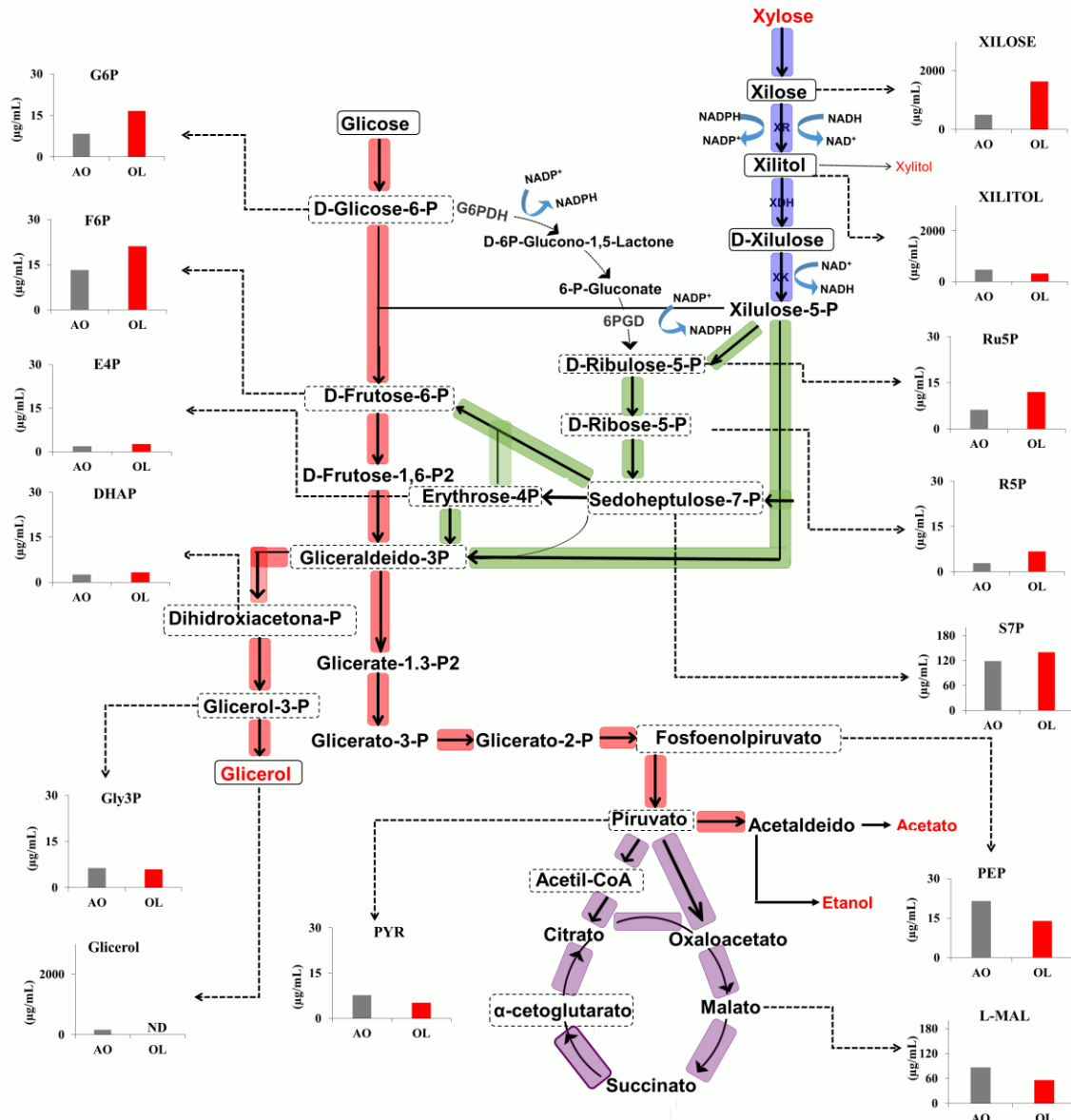


Figura 28. Esquema simplificado do metabolismo central do carbono de xilose a etanol por levedura e concentrações de 14 metabólitos da levedura *S. passalidarum* em condições aeróbicas (AO) e oxigênio limitado (OL). Vias metabólicas destacadas: assimilação de xilose oxidoreductiva (azul), via da pentose fosfato (verde), glicólise (vermelha) e ciclo do ácido tricarboxílico (roxo). As caixas pontilhadas indicam qual destes metabólitos são detectados pelo método HILIC e as caixas sólidas indicam as detectadas pelo método IPC.

4.4.3 Análise e interpretação dos dados da quantificação da levedura *S. arborariae*

Os dados de quantificação tratados por ANOVA da levedura *S. arborariae* apresentaram coeficiente de correlação próximos ou acima de 50% principalmente para o terceiro ponto da fase exponencial de crescimento, com exceção para ACCOA e PEP (Tabelas 19 e 20). Este ponto é muito próximo a fase estacionária, onde a variação na quantidade da fonte de carbono disponível é maior. Possivelmente ocasionando maiores diferenças nas concentrações intracelulares das réplicas biológicas.

Tabela 19. Concentração dos metabólitos quantificados em amostras de *S. arborariae* após tratamento estatístico sob condição aeróbica, nos três tempos de coleta com os respectivos desvios padrão relativo (RSD) para n=3.

| # | Metabólitos | 17h | | 22h | | 26h | |
|----|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | (µg/mL) | RSD (%) | (µg/mL) | RSD (%) | (µg/mL) | RSD (%) |
| 1 | ACCOA | 16.84 | 11.90 | 19.10 | 9.44 | 27.83 | 13.18 |
| 2 | L-MAL | 63.59 | 14.39 | 69.69 | 16.20 | 45.96 | 48.30 |
| 3 | Gly3P | 5.57 | 12.69 | 9.93 | 54.84 | 5.72 | 64.14 |
| 4 | G6P | 2.94 | 28.58 | 7.79 | 87.01 | 10.39 | 53.19 |
| 5 | F6P | 4.35 | 17.15 | 7.93 | 53.58 | 11.11 | 72.41 |
| 6 | DHAP | 1.37 | 28.19 | 1.89 | 52.48 | 2.75 | 85.57 |
| 7 | R5P | 2.44 | 27.28 | 2.84 | 34.35 | 3.77 | 67.04 |
| 8 | Ru5P | 22.10 | 33.67 | 25.16 | 33.53 | 13.09 | 79.71 |
| 9 | S7P | 25.63 | 56.57 | 32.45 | 56.70 | 38.79 | 83.85 |
| 10 | PEP | 11.73 | 22.56 | 18.38 | 24.54 | 29.66 | 31.21 |
| 11 | PYR | 1.85 | 59.55 | 2.76 | 63.23 | 2.94 | 49.12 |
| 12 | Xilose | 3184.5 | 78.42 | 1533.7 | 115.50 | 870.4 | 118.82 |
| 13 | Xilitol | 786.8 | 25.84 | 1299.0 | 55.37 | 1794.4 | 66.67 |

A Tabela 20 apresenta os dados do experimento sob condições microaeróbica. Para o segundo ponto de coleta (32h) obteve-se 3 metabólitos medidos com RSD > 30% (G6P, R5P e PYR). Em contrapartida, o primeiro (27h) e o terceiro ponto (41h) obtiveram 4 e 8 metabólitos medidos, respectivamente, com RSD > 30%.

Tabela 20. Concentração dos metabólitos quantificados em amostras de *S. arborariae* após tratamento estatístico sob condição microaeróbica, nos três tempos de coleta com os respectivos desvios padrão relativo (RSD) para n=3.

| # | Metabólitos | 27h | | 32h | | 41h | |
|----|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | (µg/mL) | RSD (%) | (µg/mL) | RSD (%) | (µg/mL) | RSD (%) |
| 1 | ACCOA | 8.26 | 26.39 | 8.58 | 24.13 | 8.13 | 154.00 |
| 2 | L-MAL | 9.16 | 3.93 | 15.74 | 12.20 | 9.43 | 41.36 |
| 3 | Gly3P | 1.95 | 6.67 | 2.50 | 11.20 | 2.32 | 55.60 |
| 4 | G6P | 5.28 | 92.05 | 4.59 | 42.27 | 8.40 | 52.86 |
| 5 | F6P | 6.43 | 29.86 | 5.55 | 18.56 | 6.93 | 42.86 |
| 6 | DHAP | 1.13 | 59.29 | < LOQ | - | 1.48 | 26.35 |
| 7 | R5P | 2.02 | 30.69 | 1.93 | 36.27 | 2.26 | 58.85 |
| 8 | Ru5P | 4.41 | 19.50 | 8.15 | 25.77 | 8.15 | 25.77 |
| 9 | S7P | 16.43 | 29.64 | 17.39 | 15.70 | 14.56 | 56.18 |
| 10 | PEP | 3.55 | 21.13 | 4.73 | 17.34 | 4.86 | 49.18 |
| 11 | PYR | 1.22 | 56.56 | 1.42 | 54.93 | 1.30 | 11.54 |
| 12 | Xilose | 5000.86 | 29.07 | 5116.46 | 6.10 | 3051.26 | 9.15 |
| 13 | Xilitol | 402.06 | 4.17 | 422.62 | 7.06 | 3051.26 | 9.15 |

LOQ = limite de quantificação

Os metabólitos ACCOA, Gly3P, Ru5P, S7P e PEP apresentaram um efeito negativo com nível de significância abaixo de 5%, em relação ao fator A (microaeróbico) (Tabela 21).

Diferentemente das outras duas espécies de leveduras analisadas anteriormente o efeito do fator tempo de coleta (Fator B) não foi significativo para a maior parte dos metabólitos. No entanto, o segundo ponto de coleta foi selecionado para a análise metabolômica, pois apresentou uma maior quantidade de metabólitos com RSD < 30% quando comparado aos outros dois pontos de coleta (Tabela 20).

Tabela 21. Nível de significância do modelo ANOVA para a levedura *S. arborariae* indicando o efeito do p-valor para condição de crescimento (Fator A), tempo de coleta (Fator B) e interação entre os fatores A e B (IAB).

| # | Metabólitos | p-valores | | |
|----|-------------|-----------|----|-----|
| | | A | B | IAB |
| 1 | ACCOA | --- | ** | ** |
| 2 | L-MAL | | | |
| 3 | Gly3P | --- | | |
| 4 | G6P | | | |
| 5 | F6P | | | |
| 6 | DHAP | | | |
| 7 | R5P | | | |
| 8 | Ru5P | - | * | * |
| 9 | S7P | --- | | |
| 10 | PEP | -- | ** | ** |
| 11 | PYR | | | |
| 12 | Xilose | | | |
| 13 | Xilitol | | | |

Código de significância 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' 1

A Figura 29 apresenta os gráficos com os valores finais da concentração obtidas por ANOVA das amostras resultantes da fermentação da levedura *S. arborariae*, relacionando as 3 réplicas biológicas e os 3 diferentes tempos de coleta, nas duas condições de crescimento: aeróbica e microaeróbica. Os metabólitos S7P, Ru5P, PEP, L-MAL e ACCOA apresentaram as maiores concentrações principalmente sob condição aeróbica

Em geral, todos os metabólitos quantificados em condições microaeróbicas foram detectados em concentração mais baixa quando comparados com a condição aeróbica (Figura 29). A levedura *S. arborariae* produziu duas vezes mais biomassa sob condições aeróbicas (0.31 g.g-1) do que sob oxigênio limitado (0.15 g.g-1) (Figura 20). Esta diferença nas concentrações para as condições de crescimento analisadas pode estar relacionada com o rendimento da biomassa.

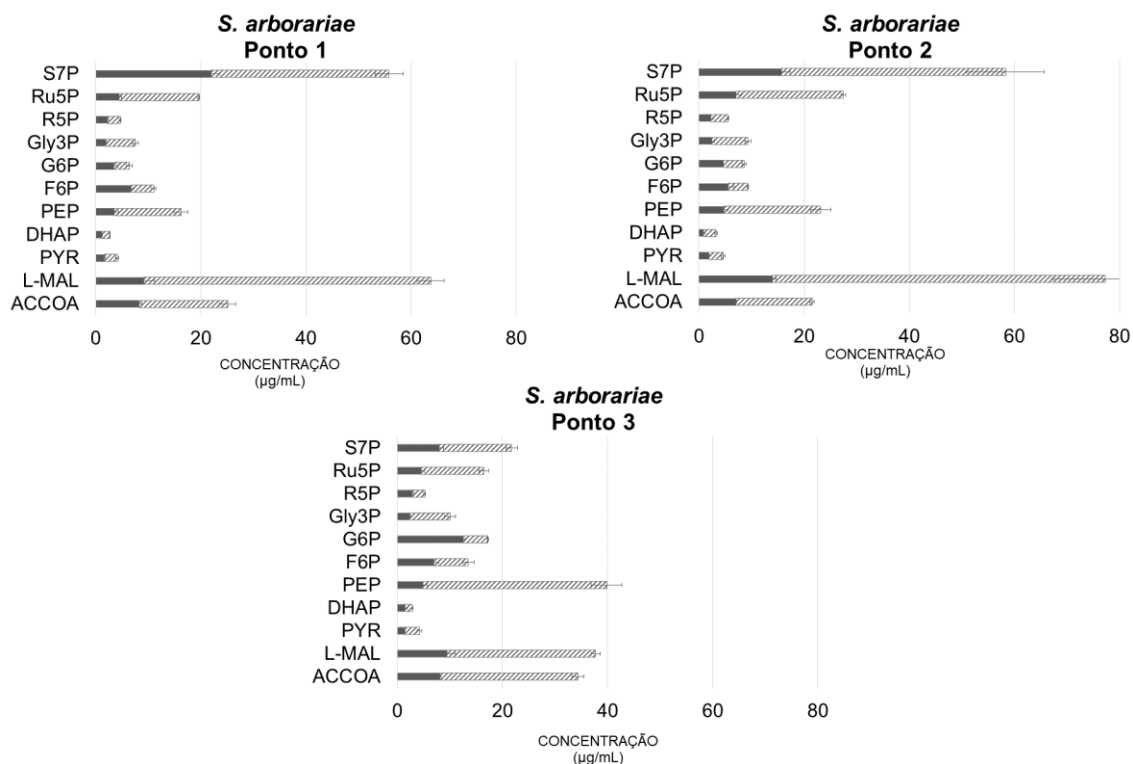


Figura 29. Gráficos dos 3 pontos da fase exponencial de crescimento da levedura *S. arborariae* indicando a concentração final obtida no tratamento estatístico da quantificação das amostras nas condições microaeróbica (cinza escuro) e aeróbica (cinza claro).

Os metabólitos L-MAL e ACCOA apresentaram valores de concentração 4.5 e 2.4 vezes maiores para a condição aeróbica, respectivamente (Tabelas 19 e 20), confirmando uma maior atividade no ciclo TCA sob esta condição (Figura 30).

Três metabólitos da via PPP (ribose-5-fosfato (R5P), ribulose-5-fosfato (RU5P) e sedoptulose-7-fosfato (S7P)), foram quantificados nas amostras de *S. arborariae*, sendo o S7P o metabólito mais abundante em ambas as condições de crescimento (Figura 30). O excesso de S7P em *S. arborariae* pode ser atribuído a atividade insuficiente de enzimas PPP, como ocorre na levedura *S. cerevisiae* nativa⁸¹. A superexpressão de genes de PPP não oxidativos em *S. cerevisiae* mostrou melhorar a conversão de xilose a etanol⁸². Além disso, a presença da glicose-6-fosfato (G6P) e a frutose-6-fosfato (F6P) pode indicar a necessidade de regeneração do cofator NADPH na via PPP não oxidativo⁸¹.

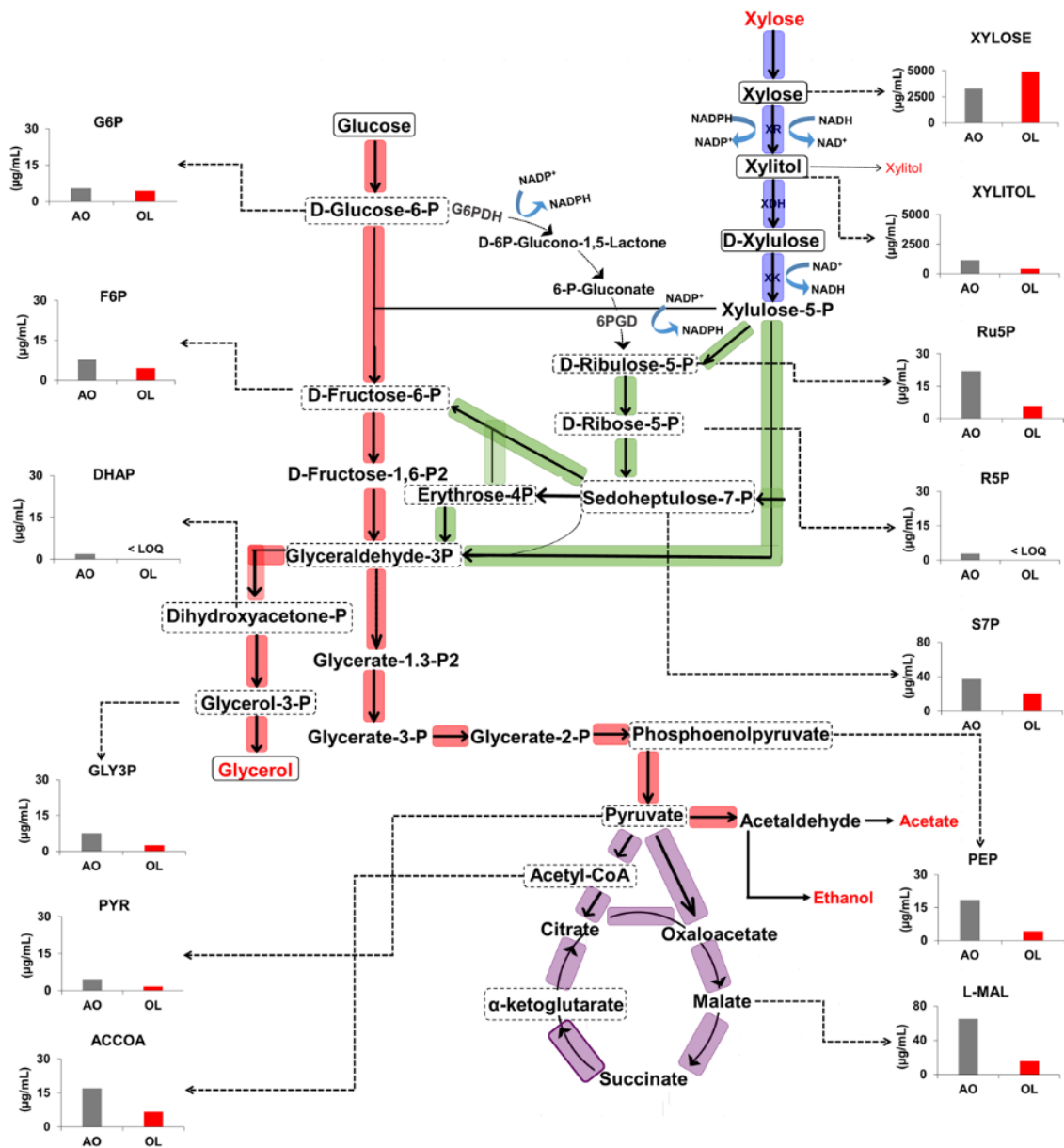


Figura 30. Esquema simplificado do metabolismo central do carbono de xilose a etanol por levedura e concentrações de 13 metabólitos da levedura *S. arborariae* em condições aeróbicas (AO) e oxigênio limitado (OL). Vias metabólicas destacadas: assimilação de xilose oxidoreductiva (azul), via da pentose fosfato (verde), glicólise (vermelha) e ciclo do ácido tricarboxílico (roxo). As caixas pontilhadas indicam qual destes metabólitos são detectados pelo método HILIC e as caixas sólidas indicam as detectadas pelo método IPC.

A análise por ANOVA reduziu todas as réplicas de cada uma das três espécies de leveduras avaliadas para um valor único de concentração

representativo do estado celular. Desta forma, para a análise metabolômica decidiu-se utilizar apenas o segundo ponto de coleta durante a fase exponencial de crescimento da levedura sob condição microaeróbica.

Os dados obtidos na análise estatística foram validados através da análise de fluxo metabólico (MFA) e utilizados para a construção da distribuição do fluxo intracelular das espécies em estudo.

4.5 Análise de fluxo metabólico (MFA) para leveduras fermentadoras de xilose

A análise de fluxo metabólico (MFA) foi realizada através do *software* OptFlux, uma plataforma de código aberto que permite a visualização *in silico* da distribuição de fluxos de carbono em uma rede metabólica⁶⁷.

A partir dos dados obtidos construiu-se um modelo metabólico baseado em 39 equações estequiométricas e no balanço de massa (material suplementar 04 e 05 anexo C). Nove dessas reações correspondem ao consumo de xilose, biomassa e formação de produtos extracelulares (etanol, CO₂, xilitol, acetato, glicerol, ácido succínico e piruvato). Para solucionar esse sistema de equações utilizou-se um modelo de otimização que utiliza a ferramenta matemática de programação linear. Para isso foi necessário direcionar a otimização definindo uma função objetivo e impondo restrições ao sistema como: inclusão de parâmetros experimentais, imposição de taxas positivas para os produtos do metabolismo, de fluxos maior ou igual a zero para as reações irreversíveis e de pseudo-estado estacionário para os metabólitos intracelulares⁷⁰.

Em seguida as concentrações dos metabólitos intracelulares do ponto central da curva de crescimento exponencial na condição microaeróbica foram adicionados ao modelo estequiométrico a fim de serem validados.

Desta forma os metabólitos quantificados pelo método de UHPLC-MS/MS, xilose e xilitol, não foram incluídos no modelo. Os metabólitos validados foram utilizados para a construção do fluxo metabólicos das leveduras fermentadoras de xilose. No entanto, é necessário validar inicialmente os dados obtidos na análise estatística, e então as distribuições do fluxo intracelular são simuladas adicionando-se a concentração dos metabólitos

intracelulares com seus respectivos tempos de fermentação, assim a distribuição de fluxo experimental foi comparada com os valores teóricos.

Como solução para esse modelo de otimização obteve-se a distribuição dos fluxos metabólicos para as três leveduras fermentadoras de xilose analisadas, *S. stipitis*, *S. passalidarum* e *S. arborariae*. Esses fluxos metabólicos calculados foram transferidos para o mapa de fluxos construído para serem melhor visualizados e utilizados para a MFA.

4.5.1 Validação dos metabólitos intracelulares das leveduras fermentadoras de xilose *S. stipitis*, *S. passalidarum* e *S. arborariae* utilizando MFA

As amostras analisadas de *S. stipitis* e *S. arborariae* apresentaram 13 metabólitos quantificados sob condição microaeróbica. Destes, 10 metabólitos intracelulares foram utilizados para simulação da distribuição do fluxo. Já para a *S. passalidarum*, foram utilizados 11 metabólitos quantificados (ACCOA, DHAP, E4P, F6P, G6P, L-MAL, PEP, PYR, R5P, RU5P, S7P), resultando em onze simulações de distribuição de fluxo. O teste de correlação de Pearson (R^2) foi usado para avaliar a consistência de cada fluxo medido com o calculado (Figuras 31-33). Os valores de R^2 maiores que 0.90 e 0.95 foram considerados satisfatórios para determinar a correlação entre os fluxos medidos e calculados. Para a levedura *S. stipitis*, observou-se que oito de dez metabólitos (80%) apresentaram $R^2 > 0.90$ entre os fluxos medidos e calculados, sendo que os metabólitos E4P, F6P, G6P, MAL e RU5P apresentaram $R^2 > 0.95$ (Figura 31).

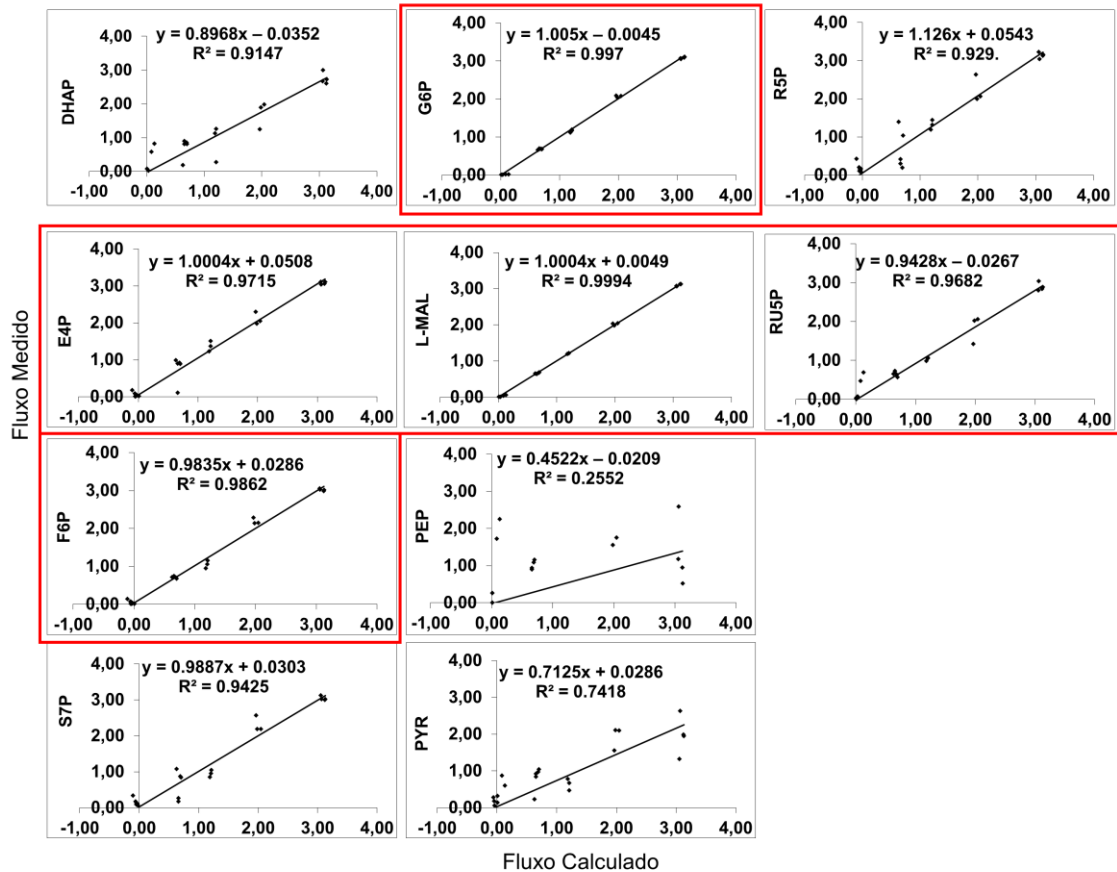


Figura 31. Correlação (R^2) entre fluxos calculados e medidos da levedura *S. stipitis* cujo metabólitos medidos são: DHAP (di-hidroxi-acetona-fosfato), (E4P) eritrose-4-fosfato), F6P (frutose-6-fosfato), G6P (glicose-6-fosfato), L-MAL (ácido málico), PEP (fosfo(enol)piruvato), PYR (piruvato), R5P (ribose-5-fosfato), RU5P (ribulose-5-fosfato), S7P (sedoheptulose-7-fosfato). O eixo X apresenta o fluxo calculado e o eixo Y o fluxo medido em $\text{mmol/gCDW}\cdot\text{h}^{-1}$.

Os metabólitos produzidos pela levedura *S. arborariae*, obtiveram valores de correlação $R^2 > 0.90$ para sete dos dez compostos quantificados (ou seja, 70%) e destes 50% (ACCOA, F6P, G6P, MAL e RU5P), apresentaram $R^2 > 0.95$ entre fluxos medidos e calculados (Figura 32).

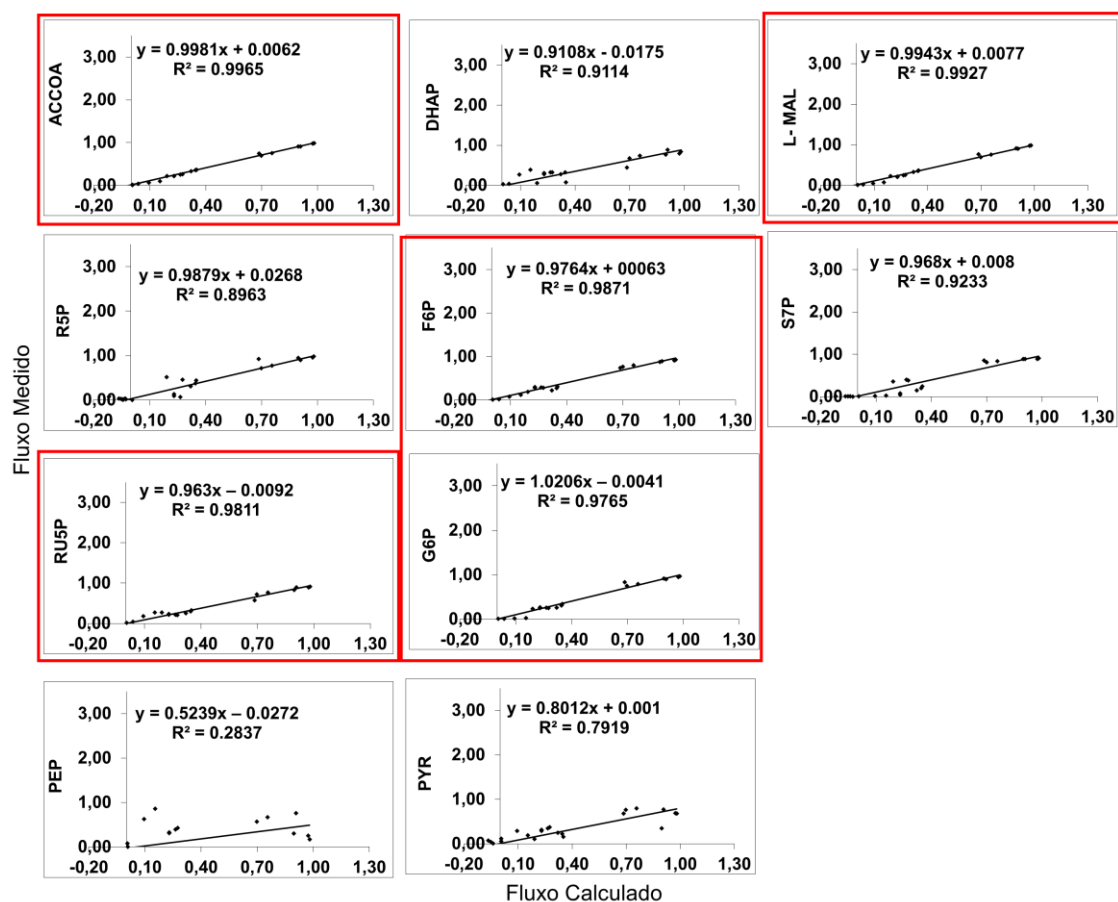


Figura 32. Correlação (R^2) entre fluxos calculados e medidos da levedura *S. arborariae* cujo metabólitos medidos são: ACCOA (acetil co-enzima A), DHAP (di-hidroxi-acetona-fosfato), (E4P) eritrose-4-fosfato), F6P (frutose-6-fosfato), G6P (glicose-6-fosfato), L-MAL (ácido málico), PEP (fosfo(enol)piruvato), PYR (piruvato), R5P (ribose-5-fosfato), RU5P (ribulose-5-fosfato), S7P (sedoheptulose-7-fosfato). O eixo X apresenta o fluxo calculado e o eixo Y o fluxo medido em mmol/gCDW.h⁻¹.

A levedura *S. passalidarum* obteve a maior quantidade de metabólitos com correlação acima de 0.95 comparado com as outras duas leveduras analisadas. Dentre os 11 metabólitos quantificados, nove apresentaram $R^2 > 0.90$ e 54% dos metabólitos (ACCOA, E4P, F6P, G6P, MAL e RU5P) apresentaram $R^2 > 0.95$ (Figura 33).

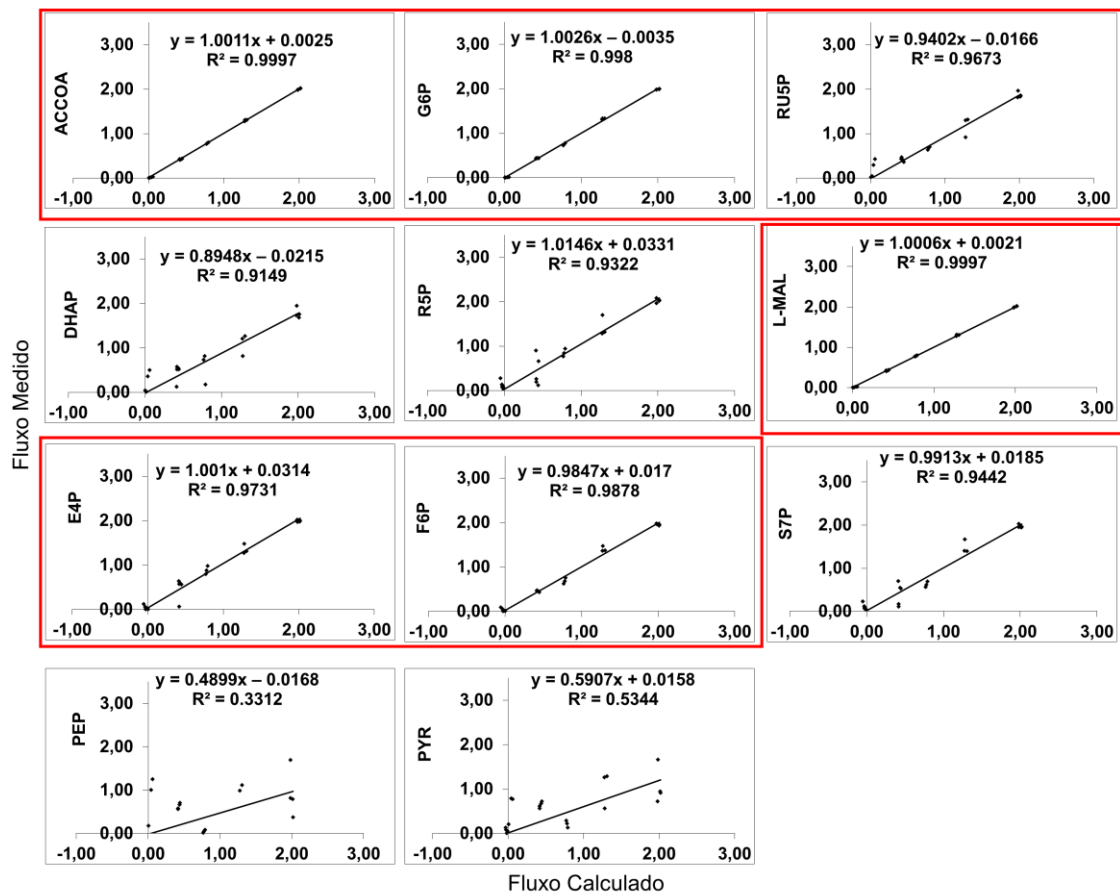


Figura 33. Correlação (R^2) entre fluxos calculados e medidos da levedura *S. passalidarum* cujo metabólitos medidos são: ACCOA (acetil co-enzima A), DHAP (di-hidroxi-acetona-fosfato), (E4P) eritrose-4-fosfato), F6P (frutose-6-fosfato), G6P (glicose-6-fosfato), L-MAL (ácido málico), PEP (fosfo(enol)piruvato), PYR (piruvato), R5P (ribose-5-fosfato), RU5P (ribulose-5-fosfato), S7P (sedoheptulose-7-fosfato). O eixo X apresenta o fluxo calculado e o eixo Y o fluxo medido em mmol/gCDW.h^{-1} .

Os metabólitos PEP e PYR obtiveram correlação inferior a 0.90 nos fluxos medidos e calculados em todas as leveduras testadas (Figuras 31-33). O piruvato participa de um ponto de ramificação em uma via metabólica entre uma fermentação respiratória e alcoólica, o que pode explicar a baixa correlação para este metabólito.

Os metabólitos analisados nas espécies de leveduras fermentadoras de xilose em estudo, com $R^2 > 0.90$ foram utilizados na distribuição do fluxo de carbono do metabolismo da xilose por espécies de leveduras.

4.5.2 Fluxo metabólico das leveduras fermentadoras de xilose *S. stipitis*, *S. passalidarum* e *S. arborariae*

A distribuição dos metabólitos intracelulares no fluxo metabólico apresentou uma correlação acima de 90% entre os dados medidos e calculados para as três espécies de leveduras *S. stipitis* (Figura 34), *S. arborariae* (Figura 35) e *S. passalidarum* (Figura 36).

Os fluxos calculados mostraram que a assimilação da xilose em *S. stipitis*, *S. arborariae* e *S. passalidarum* é realizada pela enzima XR usando os cofatores NADPH e NADH (R01 e R02)^{61,80}. Como também visto em estudos anteriores^{8,14,84}, duas reações representam esta primeira etapa no modelo do metabolismo da xilose.

A reação de redução da xilose dependente de NADH mostrou maiores taxas de fluxo para *S. stipitis* e *S. passalidarum* (R02 Figura 34 e 35). Desta forma, a levedura *S. arborariae* produziu mais xilitol (Figura 20) do que as outras espécies analisadas (Figura 14 e 17).

A levedura *S. passalidarum* possui duas enzimas XR e uma delas utiliza preferencialmente NADH como cofator⁶⁸. Embora seja observado experimentalmente que a enzima XR das espécies *S. stipitis* e *S. arborariae* usa preferencialmente o co-fator NADPH, a taxa de fluxo calculada foi maior com reações que usam NADH. A diferença entre as atividades enzimáticas e a taxa de fluxo calculada pode ser explicada pelo fato destas determinações ocorrerem em um ambiente controlado, não necessariamente *in vivo*. Um resultado similar foi observado por Wahlbom *et al.* 2001, que avaliaram os fluxos intracelulares utilizando espécies de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas¹².

O mecanismo do metabolismo da xilose na levedura *S. arborariae* é através da regeneração do cofator NADPH na via oxidativa das pentoses fosfato (R10 Figura 35). Sua taxa de fluxo para o consumo da xilose é mais lenta e a taxa de crescimento é menor quando comparada com as outras leveduras em estudo (Figura 35). O baixo crescimento celular, diminui a necessidade da utilização de NADPH causando uma baixa regulação dos fluxos através da via das pentoses fosfato (PPP)^{15,85}. A primeira etapa de conversão da xilose no fluxo metabólico da levedura *S. arborariae* (Figura 35)

utiliza NADPH como cofator (R01). A taxa da primeira reação (R01) bem como a taxa de fluxo para a via oxidativa PPP (R10), responsável pela regeneração do NADPH, são 3 vezes maiores do que as observadas para a levedura *S. passalidarum* (Figura 36). Além disso, a conversão de glicose-6-fosfato em ribulose-5-fosfato para a *S. passalidarum* (R10 Figura 36) foi 3 vezes mais lenta que para as leveduras *S. stipitis* (R10 Figura 34) e *S. arborariae* (R10 Figura 35).

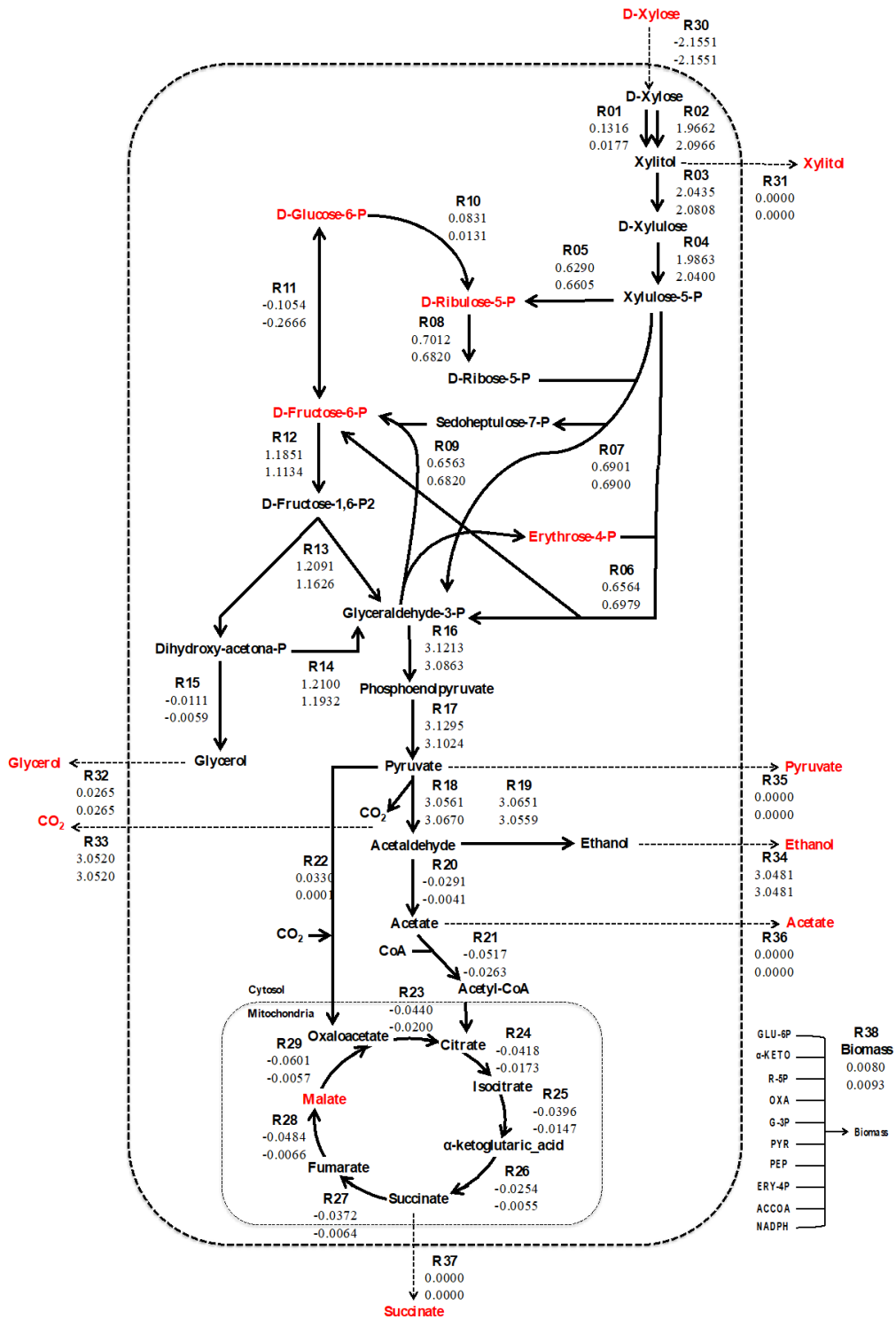


Figura 34. Fluxo metabólico da levedura *S. stipitis*. Comparação da distribuição de carbono entre a taxa de fluxo calculada (linha superior) e medida (linha inferior). Os metabólitos intracelulares destacados em vermelho tiveram a concentração adicionada no modelo e foram validados através da simulação da taxa de fluxo medida. Os metabólitos externos tiveram as taxas de fluxo usadas como restrições.

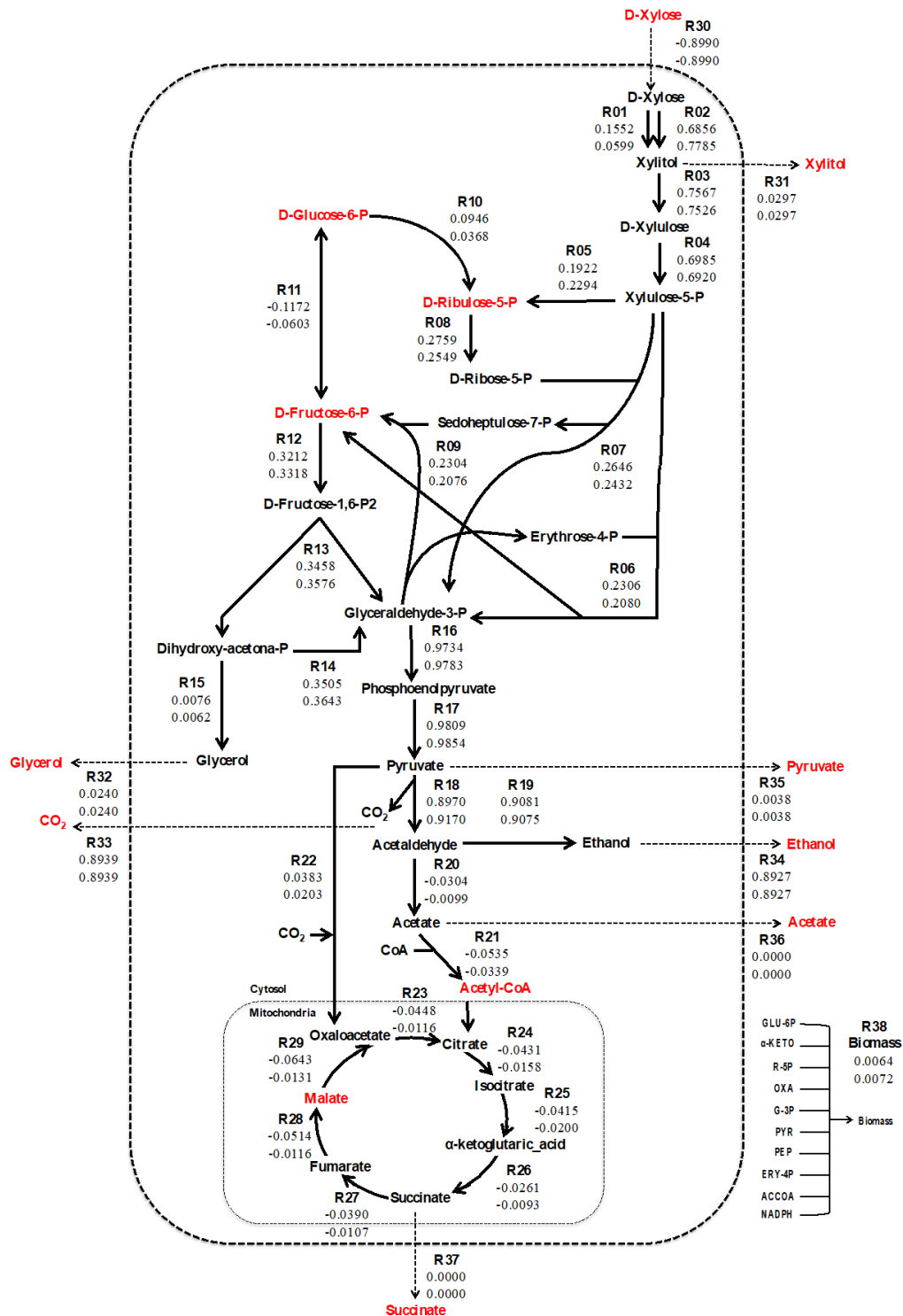


Figura 35. Fluxo metabólico da levedura *S. arborariae*. Comparação da distribuição de carbono entre a taxa de fluxo calculada (linha superior) e medida (linha inferior). Os metabólitos intracelulares destacados em vermelho tiveram a concentração adicionada no modelo e foram validados através da simulação da taxa de fluxo medida. Os metabólitos externos tiveram as taxas de fluxo usadas como restrições.

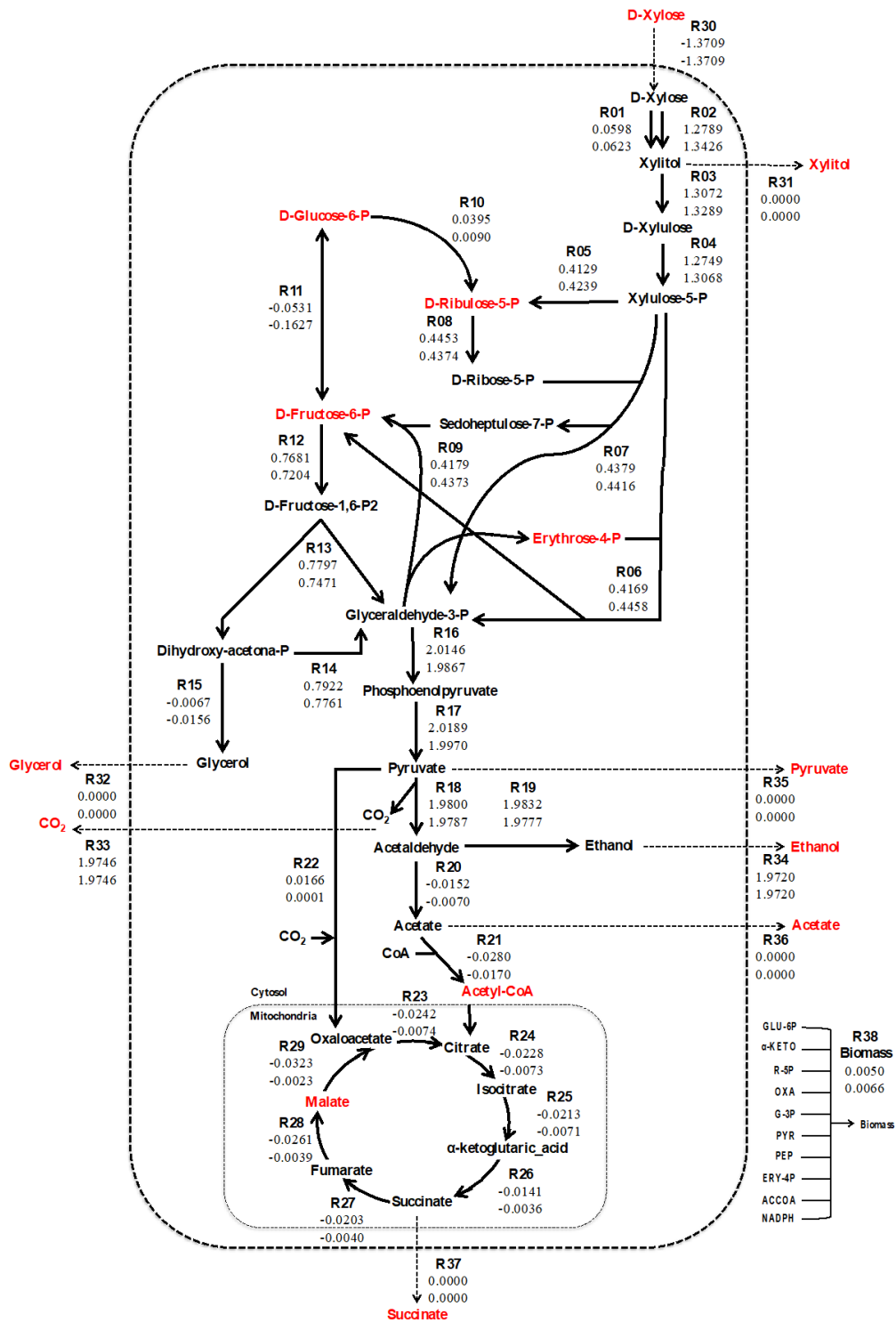


Figura 36. Fluxo metabólico da levedura *S. passalidarum*. Comparação da distribuição de carbono entre a taxa de fluxo calculada (linha superior) e medida (linha inferior). Os metabólitos intracelulares destacados em vermelho tiveram a concentração adicionada no modelo e foram validados através da simulação da taxa de fluxo medida. Os metabólitos externos tiveram as taxas de fluxo usadas como restrições.

As leveduras aqui avaliadas apresentaram reações de piruvato ao acetaldeído e conseqüentemente à produção de etanol (Figuras 34-36). O piruvato representa um dos pontos de regulação mais importantes no metabolismo do carbono. O carbono pode seguir reações catabólicas (produção de acetaldeído) ou vias anabólicas (produção de oxaloacetato). Em *S. passalidarum* (Figura 36) não foi observada taxa de fluxo para formação de glicerol (R32), esta é outra característica importante na distribuição do fluxo de carbono que se distingue de outras leveduras e pode estar associada a melhor balanço NADH/NAD⁺.

Segundo o conhecimento do grupo, é a primeira vez que é proposto um modelo de fluxo metabólico para as espécies *S. arborariae* e *S. passalidarum*. Além disso, o fluxo metabólico combinado com a concentração de metabólitos intracelulares foi utilizado para melhorar a precisão da análise metabolômica. Tendo em vista que os dados de concentração dos metabólitos aumentam a precisão do estado do metabolismo celular e podem estar ligados à rede de reações metabólicas⁴⁷.

4.6 Comparação do metaboloma das leveduras fermentadoras de xilose *S. stipitis*, *S. passalidarum* e *S. arborariae*

A Figura 37 apresenta um comparativo das concentrações dos onze metabólitos intracelulares, quantificados por UHPLC-MS/MS para as três leveduras fermentadoras de xilose, *S. stipitis*, *S. arborariae* e *S. passalidarum*.

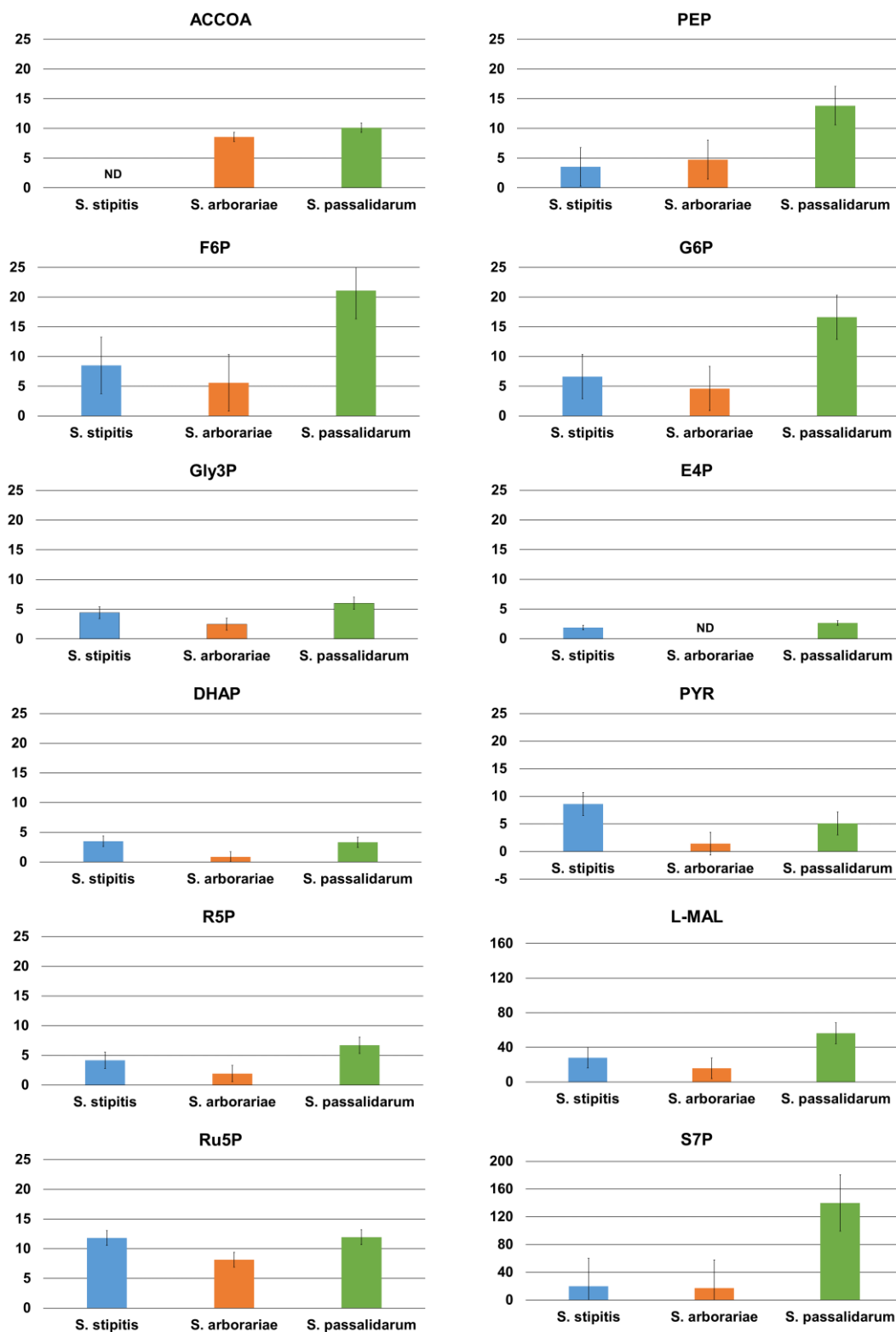


Figura 37. Concentração dos metabólitos intracelulares ($\mu\text{g/mL}$) no ponto central da fase de crescimento exponencial.

Inicialmente é possível observar que a eritrose-4-fosfato (E4P) não pôde ser detectada para a levedura *S. arborariae* (Figura 37), provavelmente porque

a taxa de fluxo nessa levedura para a formação de E4P foi pelo menos 2 vezes mais lenta ($R_{09} = 0.23$) quando comparada a *S. stipitis* e a *S. passalidarum* ($R_{09} = 0.65$ e 0.42). O metabólito sedoheptulose-7-fosfato (S7P) apresentou uma concentração quatro vezes maior para a *S. passalidarum* que nas outras leveduras. E4P e S7P são precursores de aminoácidos importantes que conectam as vias da pentose fosfato (PPP) a via glicolítica, permitindo que a xilose seja convertida a etanol.

A concentração da ribulose-5-fosfato (RU5P) é duas vezes maior que a ribose-5-fosfato (R5P) em *S. stipitis* e *S. passalidarum*. A taxa de fluxo destas leveduras para a formação destes metabólitos é cerca de duas a três vezes maior para estas espécies, *S. stipitis* (0.63 e 0.70) (Figura 34) e *S. passalidarum* (0.41 e 0.44) (Figura 36), do que para *S. arborariae* (0.19 e 0.27) (Figura 35), respectivamente.

A concentração de piruvato (PYR) foi cinco vezes maior em *S. stipitis* quando comparada com *S. arborariae* e *S. passalidarum*. O piruvato participa de um ponto de ramificação em uma via metabólica entre uma fermentação respiratória e alcoólica. A alta concentração de piruvato em *S. stipitis* pode indicar o fluxo direcionado para o acetaldeído que leva a fermentação alcoólica.

As concentrações dos compostos dihidroxi acetona-fosfato (DHAP), glicose-6-fosfato (G6P), frutose-6-fosfato (F6P), fosfo(enol)piruvato (PEP) e ácido málico (L-MAL) foram maiores para a levedura *S. passalidarum* (Figura 37). Concentrações similares de R5P, RU5P e E4P foram encontrados nas amostras das leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis*. Também apresentam uma concentração intracelular similar com *S. arborariae* para ACCOA e PYR. Em contrapartida, *S. passalidarum* apresentou maiores concentrações para S7P, G6P e F6P em comparação com a *S. arborariae* (Figura 37). Este fato pode indicar que a levedura *S. arborariae* tem maior necessidade de direcionar o fluxo para a via PPP oxidativo para regeneração de NADPH do que a *S. passalidarum*.

A levedura *S. arborariae* apresentou maior concentração de xilitol dentre as leveduras analisadas. O excesso de xilitol pode indicar que o oxigênio disponível não foi suficiente para o equilíbrio redox. Portanto, o acúmulo de xilitol pode ser explicado por um desequilíbrio em cofatores exigidos pelas enzimas XR e XDH para suas respectivas atividades. Essas observações

podem ser explicadas pelo fato da enzima XR na *S. arborariae* utilizar principalmente NADPH como cofator na redução da xilose, enquanto a XDH é estritamente dependente de NAD⁺ ⁸¹.

Apesar dos desempenhos fermentativos similares de *S. stipitis* e *S. passalidarum* sob condição limitada de oxigênio, *S. passalidarum* consumiu mais xilose e produziu mais etanol que *S. stipitis* em condição microaeróbica. (Figuras 14 e 20). Esses resultados estão de acordo com os observados na literatura, em que a espécie *S. passalidarum* mostrou ser mais eficiente na conversão da xilose a etanol sob condição microaeróbica do que a *S. stipitis*⁸⁰.

A análise metabolômica realizada nestas espécies, foi capaz de separar eficientemente os isômeros, glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato, e ribose-5-fosfato e ribulose-5-fosfato. Sendo que em estudos anteriores não houve sucesso na quantificação dos mesmos metabólitos intracelulares^{86,76}.

5 Conclusão

A análise metabolômica embora seja desafiadora pode contribuir grandemente para o entendimento do metabolismo da conversão de xilose por leveduras. O protocolo de metabolômica utilizado neste trabalho mostrou-se eficiente para a análise de 216 amostras de quatro espécies de leveduras: *Scheffersomyces stipitis*, *Candida tenuis*, *Spathaspora passalidarum* e *Spathaspora arborariae*. Dois métodos cromatográficos complementares de UHPLC-MS/MS, utilizando IPC e HILIC, foram capazes de quantificar, de forma rápida, sensível e seletiva, 19 metabólitos alvos presentes no metabolismo do carbono central formado pelas vias da glicólise, pentose fosfato (PPP) e ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Sendo, 13 metabólitos quantificados nas amostras das leveduras *S.stipitis* e *S. arborariae*, 15 metabólitos na levedura *S. passalidarum* e 10 metabólitos na levedura *C. tenuis*, sob condição de crescimento aeróbica. Para a condição microaeróbica foi possível quantificar 14, 13, 13 e 9 metabólitos para as espécies *S. passalidarum*, *S. stipitis*, *S. arborariae*, e *C. tenuis*, respectivamente. No entanto, a levedura *C. tenuis* não foi capaz de produzir etanol em nenhuma das condições de crescimento avaliadas, provavelmente devido a não adaptação das condições

experimentais realizadas para as outras três espécies de leveduras, cultivadas em meio mineral definido ao invés de extrato de levedura, por exemplo.

As análises estatísticas por ANOVA indicaram uma influência significativa nas concentrações dos metabólitos analisados em relação aos níveis de oxigênio testados, aeróbico e microaeróbico, e tempo de coleta, durante a fermentação das espécies de leveduras estudadas. Além de apontar um efeito de interação entre as variáveis condição de crescimento e tempo de coleta. A partir destes dados, foi possível inferir que a concentração dos metabólitos obtida no segundo ponto de coleta ou ponto central de crescimento exponencial da levedura sob condição microaeróbica era a mais indicada para a análise metabolômica. Os dados finais obtidos através do tratamento estatístico foram validados e utilizados para a construção do fluxo metabólico das espécies *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum* e *Spathaspora arborariae*.

Um modelo inédito de reações estequiométricas do metabolismo da xilose até etanol foi utilizado para estimar a distribuição do fluxo metabólico em espécies *Spathaspora*. Com base na análise de fluxo, *S. stipitis* e *S. passalidarum* mostraram ser as leveduras mais promissoras com as melhores taxas de consumo de xilose e conseqüentemente maior produção de etanol. A distribuição de carbono foi dividida de forma semelhante entre as vias PPP e glicólise. A levedura *S. passalidarum* apresentou maior taxa de fluxo para a enzima XR que é dependente de NADH demandando assim, menor regeneração de NADPH. Sendo sua taxa de fluxo para a produção de glicerol inativa, uma vantagem metabólica que permite melhor equilíbrio NADH/NAD⁺, maiores taxas de etanol e baixo acúmulo de xilitol.

O trabalho contendo o protocolo de metabolômica desenvolvido (anexo A)⁵⁶ está publicado em revista científica internacional, além disso um capítulo de livro internacional contendo todo o protocolo de metabolômica desenvolvido para as quatro espécies de leveduras foi publicado pela editora *Springer* (anexo B)⁵⁸. O artigo contendo a análise de fluxo metabólico (MFA) foi submetido para revista científica internacional e está em análise (anexo C).

Por fim, o protocolo aqui apresentado poderá ser aplicado a outras espécies de leveduras e os dados gerados foram fundamentais para o entendimento do metabolismo da xilose por leveduras.

Referências

1. Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. & Negro, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* **101**, 4851–4861 (2010).
2. Dias, M. O. S. *et al.* Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. *Energy* **43**, 246–252 (2012).
3. Ferreira-Leitão, V. *et al.* An approach to the utilisation of CO₂ as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. *Biotechnol. Biofuels* **3**, 7 (2010).
4. Kim, S. R., Park, Y. C., Jin, Y. S. & Seo, J. H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. *Biotechnol. Adv.* **31**, 851–861 (2013).
5. Wohlbach, D. J. *et al.* Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13212–7 (2011).
6. Matsushika, A. & Inoue, H. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains : current state and perspectives. 37–53 (2009). doi:10.1007/s00253-009-2101-x
7. Almeida, J. R. M., Runquist, D., Sánchez Nogué, V., Lidén, G. & Gorwa-Grauslund, M. F. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. J.* **6**, 286–299 (2011).
8. Krahulec, S., Klimacek, M. & Nidetzky, B. Analysis and prediction of the physiological effects of altered coenzyme specificity in xylose reductase and xylitol dehydrogenase during xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **158**, 192–202 (2012).
9. Moysés, D., Reis, V., Almeida, J., Moraes, L. & Torres, F. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 207 (2016).
10. 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*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 939–945 (2008).
11. Bideaux, C., Montheard, J. & Cameleyre, X. Metabolic flux analysis model for optimizing xylose conversion into ethanol by the natural C5-fermenting yeast *Candida shehatae*. 1489–1499 (2016). doi:10.1007/s00253-015-7085-0
12. Wahlbom, C. F. & Eliasson, A. Intracellular Fluxes in a Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Cultivated Anaerobically at Different Dilution Rates and Feed Concentrations. (2001).
13. Quirós, M., Martínez-moreno, R., Albiol, J., Morales, P. & Vázquez-lima, F. Metabolic Flux Analysis during the Exponential Growth Phase of *Saccharomyces cerevisiae* in Wine Fermentations. **8**, 1–14 (2013).
14. Trausinger, G. *et al.* Identification of novel metabolic interactions controlling carbon flux from xylose to ethanol in natural and recombinant yeasts. *Biotechnol. Biofuels* **8**, 157 (2015).
15. Almeida, J. R. M. & Bertilsson, M. Carbon fluxes of xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strains are affected differently by NADH and NADPH usage in HMF reduction. 751–761 (2009). doi:10.1007/s00253-009-2053-1
16. Runquist, D., Hahn-Hägerdal, B. & Rådström, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **3**, 5 (2010).
17. Vargas, L. H. G. *et al.* Metabolomics analysis of oil palm (*Elaeis guineensis*) leaf: evaluation of sample preparation steps using UHPLC–MS/MS. *Metabolomics* **12**, 153 (2016).
18. Brown, M. *et al.* Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. 1322–1332 (2009). doi:10.1039/b901179j
19. Bruheim, P. E. R. The Potential of Metabolomics Tools in Bioremediation Studies. **11**,

305–313 (2007).

20. Mathew, A. K. & Padmanaban, V. C. Metabolomics: The apogee of the omics trilogy. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **5**, 45–48 (2013).
21. Krumsiek, J. & Theis, F. J. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data Abstract : Metabolomics is a relatively new high-throughput technology that aims at measuring all endogenous metabolites within a biological sample in an unbiased fashion . The resulting metabolic profiles may be regarded as functional signatures of the physiological state , and have been shown to comprise effects of genetic regulation as well as environmental factors . This potential to connect genotypic to phenotypic information promises new insights and biomarkers for different research fields , including biomedical and pharmaceutical research . In the statistical analysis of metabolomics data , many techniques from other omics fields can be reused . However recently , a number of tools specific for metabolomics data have been developed as well . The focus of this mini review will be on recent advancements in the analysis of metabolomics data especially by utilizing Gaussian graphical models and independent component analysis . (2013).
22. Hooft, J. J. J. Van Der. Updates in metabolomics tools and resources : 2014 – 2015 Keywords : 86–110 (2016). doi:10.1002/elps.201500417
23. Abdelnur, P. V, Caldana, C. & Martins, M. C. M. Metabolomics applied in bioenergy. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* **1**, 1–9 (2014).
24. Angela, B. C. Development of quantitative metabolomics for *Pichia pastoris*. 284–298 (2012). doi:10.1007/s11306-011-0308-1
25. Ser, Z., Liu, X., Nu, N. & Locasale, J. W. Extraction parameters for metabolomics from cultured cells. *Anal. Biochem.* **475**, 22–28 (2015).
26. Soetaert, W. & Heijnen, Æ. J. J. Microbial metabolomics : past , present and future methodologies. 1–16 (2007). doi:10.1007/s10529-006-9218-0
27. Heijnen, J. J. & Gulik, Æ. W. M. Van. Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics. 226–239 (2008). doi:10.1007/s11306-008-0116-4
28. Millard, P., Massou, S., Wittmann, C., Portais, J. C. & Létisse, F. Sampling of intracellular metabolites for stationary and non-stationary ¹³C metabolic flux analysis in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **465**, 38–49 (2014).
29. Canelas, B. *et al.* Quantitative Evaluation of Intracellular Metabolite Extraction Techniques for Yeast Metabolomics. **81**, 7379–7389 (2009).
30. Villas-b, S. G., Smedsgaard, J. & Nielsen, J. Global metabolite analysis of yeast : evaluation of sample preparation methods. 1155–1169 (2005). doi:10.1002/yea.1308
31. Crutchfield, C. A., Lu, W., Melamud, E. & Rabinowitz, J. D. *Mass Spectrometry-Based Metabolomics of Yeast Mass Spectrometry-Based Metabolomics of Yeast. Guide to Yeast Genetics: Functional Genomics, Proteomics, and Other Systems Analysis* **470**, (Elsevier Inc., 2017).
32. Nakanishi, T., Hishiki, T., Morikawa, T., Kajimura, M. & Suematsu, M. Simultaneous Analysis of Primary Metabolites by Triple Quadrupole LC / MS / MS 2 . Primary Metabolites LC / MS / MS Method Package. (2013).
33. Bajad, S. U. *et al.* Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1125**, 76–88 (2006).
34. Pyke, J. S. *et al.* A tandem liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) method for profiling small molecules in complex samples. *Metabolomics* **11**, 1552–1562 (2015).
35. Madji, B., Blasco, H., Emond, P. & Mavel, S. Trends in Analytical Chemistry Liquid chromatography – high-resolution mass spectrometry-based cell metabolomics : Experimental design , recommendations , and applications. **75**, 118–128 (2016).
36. Varvara, A., Monciu, C. M., Aramă, C. & Popescu, C. Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography of ondansetron hydrochloride using sodium

- heptanesulphonate as a counterion. *Farmacia* **57**, 442–451 (2009).
37. Tang, D.-Q., Zou, L., Yin, X.-X. & Ong, C. N. HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS. *Mass Spectrom. Rev.* **35**, 574–600 (2016).
 38. Ren, S. *et al.* Computational and statistical analysis of metabolomics data. *Metabolomics* **11**, 1492–1513 (2015).
 39. Blekherman, G. *et al.* Bioinformatics tools for cancer metabolomics. *Metabolomics* **7**, 329–343 (2011).
 40. Smolinska, A., Blanchet, L., Buydens, L. M. C. & Wijmenga, S. S. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Anal. Chim. Acta* **750**, 82–97 (2012).
 41. Smilde, A. K. *et al.* Dynamic metabolomic data analysis: a tutorial review. 3–17 (2010). doi:10.1007/s11306-009-0191-1
 42. Riter, L. S., Vitek, O., Gooding, K. M., Hodge, B. D. & Julian, R. K. SPECIAL FEATURE: Statistical design of experiments as a tool in mass spectrometry. 565–579 (2005). doi:10.1002/jms.871
 43. Cordova, L. T. & Antoniewicz, M. R. ¹³C metabolic flux analysis of the extremely thermophilic, fast growing, xylose-utilizing *Geobacillus* strain LC300. *Metab. Eng.* **33**, 148–157 (2016).
 44. Skoog, K. & Hahn-hagerdal, B. Effect of Oxygenation Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. **56**, 3389–3394 (1990).
 45. Carreira, R. *et al.* CBFA: phenotype prediction integrating metabolic models with constraints derived from experimental data. 1–10 (2014). doi:10.1186/s12918-014-0123-1
 46. Benjamín J. Sánchez, J. N. Genome scale models of yeast: towards standardized evaluation and consistent omic integration. 846–858 (2015). doi:10.1039/c5ib00083a
 47. Bogaerts, P., Gziri, K. M. & Richelle, A. metabolism in a macroscopic FBA-based dynamical model of cell cultures in bioreactor. *J. Process Control* (2017). doi:10.1016/j.jprocont.2017.06.018
 48. Nielsen, J. The yeast metabolome addressed by electrospray ionization mass spectrometry: Initiation of a mass spectral library and its applications for metabolic footprinting by direct infusion mass spectrometry. 393–405 (2008). doi:10.1007/s11306-008-0132-4
 49. Park, C. *et al.* Determination of the Intracellular Concentrations of Metabolites in *Escherichia coli* Collected during the Exponential and Stationary Growth Phases using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **32**, 524–530 (2011).
 50. Meijer, S. *et al.* Overexpression of isocitrate lyase — glyoxylate bypass influence on metabolism in *Aspergillus niger*. **11**, 107–116 (2009).
 51. Askenazi, M. *et al.* Integrating transcriptional and metabolite profiles to direct the engineering of lovastatin-producing fungal strains. **21**, (2003).
 52. Papini, M., Nookaew, I., Scalcinati, G., Siewers, V. & Nielsen, J. Phosphoglycerate mutase knock-out mutant *Saccharomyces cerevisiae*: Physiological investigation and transcriptome analysis. 1016–1027 (2010). doi:10.1002/biot.201000199
 53. Bro, C., Regenber, B., Fo, J. & Nielsen, J. In silico aided metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved bioethanol production. **8**, 102–111 (2006).
 54. Buchholz, A., Hurlebaus, J., Wandrey, C. & Takors, R. Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. **19**, 5–15 (2002).
 55. Hackett, S. R. *et al.* metabolic flux. **354**, 1–37 (2017).
 56. Campos C.G., de Aquino Ribeiro J.A., de Almeida J.R.M., Quirino B.F., A. P. V. Targeted Metabolomics of Xylose-Fermenting Yeasts Based on Mass Spectrometry. in *Microbial Metabolomics* 155–169 (2019).
 57. CG, C. Desenvolvimento de protocolos analíticos em metabolômica de leveduras fermentadoras de xilose. (UNB, 2015).
 58. Campos, C. G. *et al.* New Protocol Based on UHPLC-MS/MS for Quantitation of

- Metabolites in Xylose-Fermenting Yeasts. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28**, (2017).
59. Dijken, J. P. V. A. N. Effect of Benzoic Acid on Metabolic Fluxes in Yeasts : A Continuous-Culture Study on the Regulation of Respiration and Alcoholic Fermentation. **8**, (1992).
 60. Petersson, A. *et al.* A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast* **23**, 455–464 (2006).
 61. César, H., Veras, T., Parachin, N. S., Ricardo, J. & Almeida, M. Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose - consuming yeasts. *Microb. Cell Fact.* 1–8 (2017). doi:10.1186/s12934-017-0766-x
 62. Koning, W. de & Dam, K. van. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal. Biochem.* **204**, 118–123 (1992).
 63. Gonzalez, B., François, J. & Renaud, M. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* **13**, 1347–1356 (1997).
 64. Shabir, G. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. *J Chromatogr A* **987**, 57–66 (2003).
 65. Rushing, Heath; Karl, Andrew; Wisnowski, J. *Design and Analysis of Experiments by Douglas Montgomery: A Supplement for Using JMP(R)*. (2013).
 66. Liang, M., Damiani, A., He, Q. P. & Wang, J. Elucidating Xylose Metabolism of *Scheffersomyces stipitis* for Lignocellulosic Ethanol Production. (2014).
 67. Rocha, I. *et al.* OptFlux: an open-source software platform for in silico metabolic engineering. *BMC Syst. Biol.* **4**, 45 (2010).
 68. Cadete, R. M. *et al.* Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 167 (2016).
 69. Kurtzman, C. P. & Suzuki, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella* , *Meyerozyma* , 2–14 (2010). doi:10.1007/s10267-009-0011-5
 70. Liu, T., Zou, W., Liu, L. & Chen, J. A constraint-based model of *Scheffersomyces stipitis* for improved ethanol production. 1–11 (2012).
 71. Krahulec, S., Kratzer, R., Longus, K. & Nidetzky, B. Comparison of *Scheffersomyces stipitis* strains CBS 5773 and CBS 6054 with regard to their xylose metabolism: implications for xylose fermentation. (2012). doi:10.1002/mbo3.5
 72. Kwak, S. & Jin, Y. S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. *Microb. Cell Fact.* 1–15 (2017). doi:10.1186/s12934-017-0694-9
 73. Hou, X. & Yao, S. Improved inhibitor tolerance in xylose-fermenting yeast *Spathaspora passalidarum* by mutagenesis and protoplast fusion. 2591–2601 (2012). doi:10.1007/s00253-011-3693-5
 74. Cadete, R. M. *et al.* *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *FEMS Yeast Res.* **9**, 1338–1342 (2009).
 75. Baumann, K. *et al.* A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. *BMC Syst. Biol.* **4**, 141 (2010).
 76. Han, T. L., Cannon, R. D. & Villas-Boas, S. G. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Metabolomics* **8**, 1204–1217 (2012).
 77. Koek, M. M., Jellema, R. H., van der Greef, J., Tas, A. C. & Hankemeier, T. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: Status and perspectives. *Metabolomics* **7**, 307–328 (2011).
 78. Koek, M. M., Muilwijk, B., Werf, J. Van Der & Hankemeier, T. Microbial Metabolomics with

- Gas Chromatography / Mass Spectrometry. **78**, 1272–1281 (2006).
79. Long, T. M. *et al.* Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **78**, 5492–5500 (2012).
 80. Hou, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. 205–214 (2012). doi:10.1007/s00253-011-3694-4
 81. Bergdahl, B., Heer, D., Sauer, U., Hahn-hägerdal, B. & Niel, E. W. J. Van. Dynamic metabolomics differentiates between carbon and energy starvation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* fermenting xylose. 1–19 (2012). doi:10.1186/1754-6834-5-34
 82. Karhumaa, K., Hahn-Hägerdal, B. & Gorwa-Grauslund, M. F. Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering. *Yeast* **22**, 359–368 (2005).
 83. Österlund, T., Nookaew, I., Bordel, S. & Nielsen, J. Mapping condition-dependent regulation of metabolism in yeast through genome-scale modeling. (2013).
 84. Verduyn, C. *et al.* Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochem. J.* **226**, 669–677 (1985).
 85. Gregorich, E. G., Liang, B. C., Drury, C. F., Mackenzie, A. F. & McGill, W. B. Elucidation of the source and turnover of water soluble and microbial biomass carbon in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* **32**, 581–587 (2000).
 86. Kato, H., Izumi, Y., Hasunuma, T., Matsuda, F. & Kondo, A. Targeted metabolic profiling analysis of yeast central metabolites. *JBIOSEC* **113**, 665–673 (2012).
 87. Su, Y., Willis, L. B. & Jeffries, T. W. Effects of Aeration on Growth , Ethanol and Polyol Accumulation by Effects of Aeration on Growth , Ethanol and Polyol Accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. (2014). doi:10.1002/bit.25445
 88. Ricci-silva M, Vaz B, Vasconcelos G, Romão W, Aricetti J, Caldana C, A. P. *Analytical Techniques and Methods for Biomass. Mass Spectrometry for Metabolomics and Biomass Composition Analyses* (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-41414-0
 89. Krastanov, A. Metabolomics — The State of Art METABOLOMICS – THE STATE OF ART. **2818**, (2016).
 90. Zakhartsev, M., Vielhauer, O., Horn, T., Yang, X. & Reuss, M. Fast sampling for quantitative microbial metabolomics: new aspects on cold methanol quenching: metabolite co-precipitation. 286–301 (2015). doi:10.1007/s11306-014-0700-8
 91. Putri, S. P., Yamamoto, S., Tsugawa, H. & Fukusaki, E. Current metabolomics: Technological advances. *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 9–16 (2013).
 92. Wamelink, M. M. C. *et al.* Quantification of sugar phosphate intermediates of the pentose phosphate pathway by LC – MS / MS: application to two new inherited defects of metabolism. **823**, 18–25 (2005).
 93. Calderón-Santiago, M., Fernández-Peralbo, M. a., Priego-Capote, F. & Luque de Castro, M. D. MSCombine: a tool for merging untargeted metabolomic data from high-resolution mass spectrometry in the positive and negative ionization modes. *Metabolomics* **12**, 43 (2016).
 94. Smedsgaard, J. & Nielsen, J. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. 1155–1169 (2005). doi:10.1002/yea.1308
 95. Buescher, J. M., Moco, S., Sauer, U. & Zamboni, N. Ultrahigh Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry Method for Fast and Robust Quantification of Anionic and Aromatic Metabolites. *Anal. Chem.* **82**, 4403–4412 (2010).
 96. Seifar, R. M. *et al.* Quantitative analysis of intracellular coenzymes in *Saccharomyces cerevisiae* using ion pair reversed phase ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1311**, 115–120 (2013).
 97. Nováková, L., Havlíková, L. & Vlcková, H. Hydrophilic interaction chromatography of polar and ionizable compounds by UHPLC. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **63**, 55–64 (2014).

98. Kawachi, Y. *et al.* Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency. *J. Chromatogr. A* **1218**, 5903–5919 (2011).