

Bruna Scheid

**Clonagem de transportadores de xilose de *Scheffersomyces stipitis*
em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final com nota de 10 pelo Curso de Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk.

Coorientadora: Ma. Belisa Bordin de Sales.

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Scheid, Bruna
Clonagem de transportadores de xilose de
Scheffersomyces stipitidis em *Saccharomyces cerevisiae*
recombinante / Bruna Scheid ; orientador, Boris Juan
Carlos Ugarte Stambuk ; co-orientadora, Belisa Bordin de
Sales. - Florianópolis, SC, 2014.
78 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Biocombustíveis. 3.
Scheffersomyces stipitidis. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. 5.
Xilose. I. Ugarte Stambuk, Boris Juan Carlos. II. Bordin
de Sales, Belisa. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Bruna Scheid

**Clonagem de transportadores de xilose de *Scheffersomyces stipitis*
em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final com nota de 10 pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 21 de Fevereiro de 2014.

Dr. ^a Maria Risoleta Freire Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:

Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, Orientador,
Universidade Federal de Santa Catarina

Ma. Belisa Bordin de Sales, Coorientadora,
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Márcio José Rossi,
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Angelica Francesca Maris,
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Boris U. Stambuk pela sua orientação, apoio e pela substancial contribuição à minha formação e, sobretudo, pela oportunidade a mim concedida de fazer parte de seu grupo de trabalho.

À minha coorientadora Belisa Bordin de Sales, pelos ensinamentos, dedicação, paciência e amizade. Situações complicadas aconteceram no decorrer dos semestres, mas eu sabia que sempre poderia contar com a sua ajuda, muito obrigada! Sua presença e atenção contribuíram em muito com a minha formação acadêmica e crescimento no local de trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório Adriane, Augusto, Davi, Denis, Margareth, Victor, Débora e Gabriela, pelos ensinamentos, conversas e companhia. Agradeço por nunca me negarem ajuda em momentos de necessidade.

Aos meus amados colegas e amigos de graduação Rafaela, Leili, Camille, Gabriela, Mayara, Amanda, Laís e Victor. Sem vocês esta etapa da minha vida não seria tão especial e inesquecível quanto foi. Agradeço pelos momentos de descontração, confidências, comilanças, trabalhos em grupo e companhia nos mais variados momentos.

À minha família, mãe, pai e irmão, pelo apoio. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada pelo apoio financeiro e, sobretudo, emocional no decorrer destes anos, amo muito vocês.

A todas as muitas pessoas que não tiveram os seus nomes citados aqui, que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

Ao CNPq e JICA (Japan International Cooperation Agency) pelo apoio financeiro.

RESUMO

A tendência mundial em reduzir e substituir o uso de combustíveis fósseis por formas mais renováveis de energia intensificou a procura por alternativas mais sustentáveis, como por exemplo, tecnologias que viabilizem a produção do etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos subutilizados na indústria (bagaço, palha e folhas de cana-de-açúcar), convertendo os polissacarídeos contidos nessa biomassa em energia. Esse material lignocelulósico é rico em xilose, uma pentose que não é metabolizada eficientemente pela levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae*. Diferentes abordagens têm sido utilizadas com o objetivo de aperfeiçoar esta levedura para uma metabolização mais eficiente de xilose, dentre elas a expressão heteróloga de proteínas vindas de organismos que naturalmente fermentam esta pentose. A levedura *Scheffersomyces stipitis* possui um metabolismo eficiente para a fermentação de xilose, contudo, não se adequa as condições adversas da indústria para a produção de etanol. Neste trabalho, uma biblioteca genômica de *S. stipitis* foi utilizada para clonar genes envolvidos no transporte de xilose, um passo limitante na fermentação deste açúcar pelas leveduras. Os plasmídeos contendo insertos de DNA de *S. stipitis* foram inseridos em uma linhagem de *S. cerevisiae* recombinante que sobre-expressa as enzimas para a metabolização de xilose, mas não possui transportadores de hexoses (*hxt*-null). Esta linhagem permitiu isolar clones de interesse (contendo genes de transportadores de açúcares) pelo crescimento em meio de cultivo contendo xilose como única fonte de carbono. Dentre as noventa linhagens isoladas inicialmente, duas (BBY-D1Ss24 e BBY-D1Ss37) se destacaram pelo perfil de consumo de açúcares e produção de etanol a partir de hexoses e xilose. Nossos resultados indicam que os transportadores presentes nestes transformantes são capazes de transportar uma variedade de açúcares, incluindo as hexoses glicose e frutose, e a pentose xilose. Embora ambas as linhagens consumam xilose, este açúcar foi apenas fermentado pela linhagem BBY-D1Ss24. Através da análise do mapa de restrição dos insertos de DNA presentes nos plasmídeos, concluímos que a sequência presente no plasmídeo inserido na linhagem BBY-D1Ss24 provavelmente corresponde ao gene *XUT1*, e a expressa na linhagem BBY-D1Ss37 ao gene *QUP2*, ambos genes da família de transportadores de açúcares presentes no genoma de *S. stipitis*. A abordagem experimental utilizada no presente trabalho

permitiu isolar genes de transportadores de xilose, contribuindo para o estudo e otimização da produção de etanol de segunda geração.

Palavras-chave: biocombustíveis, *Scheffersomyces stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, xilose.

ABSTRACT

The global trend to reduce and replace the use of fossil fuels with more renewable forms of energy intensified the search for more sustainable alternatives, such as technologies that enable the production of second-generation ethanol from lignocellulosic wastes underutilized by industry (bagasse, straw and leaves from sugarcane), converting the polysaccharides contained in this biomass into energy. This lignocellulosic material is rich in xylose, a pentose that is not metabolized efficiently by the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Different approaches have been used with the aim of improving this yeast for efficient xylose metabolism, among them the heterologous expression of proteins derived from organisms that naturally ferment this pentose. The yeast *Scheffersomyces stipitis* has an efficient metabolism for xylose fermentation, however, is not suitable for the adverse industrial conditions of ethanol production. In this work, a genomic library of *S. stipitis* was used to clone genes involved in the transport of xylose, a limiting step in the fermentation of this sugar by yeasts. Plasmids containing DNA inserts of *S. stipitis* were inserted into a recombinant *S. cerevisiae* strain overexpressing the enzymes for xylose metabolism, but lacking hexose transporters (*hxt*-null). This strain allowed the isolation of clones of interest (containing sugar transporter genes) by growth in culture medium containing xylose as a sole carbon source. Among the ninety initially isolated strains, two (BBY-D1Ss24 and BBY-D1Ss37) stood out by the sugar consumption profile and ethanol production from xylose and hexoses. Our results indicate that the transporters present in these transformants are capable of carrying a variety of sugars, including the hexoses glucose and fructose, and the pentose xylose. Although both strains consumed xylose, this sugar was only fermented by strain BBY-D1Ss24. Through restriction analysis of the DNA inserts present in the plasmids, the sequence of the one expressed in the strain BBY-D1Ss24 probably corresponds to the *XUT1* gene, and in strain BBY-D1Ss37 probably is the *QUP2* gene, both genes from the family of sugar transporters present in the genome of *S. stipitis*. The experimental approach used in this study allowed us to isolate xylose transporter genes, contributing to the study and optimization of the production of second-generation ethanol.

Keywords: biofuels, *Scheffersomyces stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, xylose.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema simplificado da utilização de xilose por leveduras, envolvendo o transporte e posterior metabolização até etanol. 24
- Figura 2. Microcrescimento em placas de 96 poços de linhagens *S. cerevisiae* transformadas com a biblioteca genômica de *S. stipitis*. As transformantes contendo os plasmídeos indicados foram crescidas em meios contendo 2% das diferentes fontes de carbono. 41
- Figura 3. Consumo de açúcares pelas linhagens BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37, BBY-D1Ss90 e BBY-D1SspPGK inoculadas em meio de cultura SC contendo 2% de maltose (a), xilose (b), glicose (c) ou frutose (d). 42
- Figura 4. Produção de biomassa pelas linhagens BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37, BBY-D1Ss90 e BBY-D1SspPGK inoculadas em meio de cultura SC contendo 2% de maltose (a), xilose (b), glicose (c) ou frutose (d). 44
- Figura 5. Produção de etanol pelas linhagens BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37, BBY-D1Ss90 e BBY-D1SspPGK inoculadas em meio de cultura SC contendo 2% de maltose (a), xilose (b), glicose (c) ou frutose (d). 45
- Figura 6. Curvas de produção de glicerol em meios contendo maltose (a), glicose (b) e frutose (c); e produção de xilitol em meio contendo xilose (d) pelas transformantes BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37, BBY-D1Ss90 e BBY-D1SspPG. 47
- Figura 7. Fermentação em batelada pela linhagem BBY-D1Ss24 em meios contendo 20 g/L de xilose (a), glicose (b), ou glicose mais xilose (c). Os gráficos mostram as curvas de consumo dos açúcares, densidade celular, e produção de etanol, glicerol ou xilitol. 49

Figura 8. Fermentação em batelada pela linhagem BBY-D1Ss37 em meios contendo 20 g/L de xilose (a), glicose (b), ou glicose mais xilose (c). Os gráficos mostram as curvas de consumo dos açúcares, densidade celular, e produção de etanol, glicerol ou xilitol..... 51

Figura 9. Co-fermentação em batelada de 20 g/L maltose e 20 g/L glicose pelas linhagens BBY-D1Ss24 (painéis à esquerda), BBY-D1Ss37 (painéis centrais) e BBY-D1SspPGK (painéis à direita). Nos painéis superiores estão representadas as curvas de consumo dos açúcares, e no painéis inferiores podemos ver as curvas de produção de etanol e glicerol..... 53

Figura 10. Co-fermentação em batelada de 20 g/L maltose e 20 g/L frutose pelas linhagens BBY-D1Ss24 (painéis à esquerda), BBY-D1Ss37 (painéis centrais) e BBY-D1SspPGK (painéis à direita). Nos painéis superiores estão representadas as curvas de consumo dos açúcares, e no painéis inferiores podemos ver as curvas de produção de etanol e glicerol..... 54

Figura 11. Co-fermentação em batelada de 20 g/L maltose e 20 g/L xilose pelas linhagens BBY-D1Ss24 (painéis à esquerda), BBY-D1Ss37 (painéis centrais) e BBY-D1SspPGK (painéis à direita). Nos painéis superiores estão representadas as curvas de consumo dos açúcares, e no painéis inferiores podemos ver as curvas de produção de etanol e glicerol. 56

Figura 12. Imagem da eletroforese em gel de 1% agarose mostrando os fragmentos obtidos por PCR a partir dos plasmídeos pPGK-(BBS-D1Ss24) e pPGK-(BBS-D1Ss37). 59

Figura 13. Imagem da eletroforese em gel de 1% agarose mostrando os produtos da digestão do inserto presente na transformante BBY-D1Ss24 com as enzimas *AccI*, *BmgBI*, *NotI*, *RsaI*, *XbaI* e *XhoI*. Apenas *AccI*, *NotI* e *RsaI* hidrolisaram o fragmento..... 60

Figura 14. Imagem da eletroforese em gel de 1% agarose mostrando os produtos da digestão do inserto presente na transformante BBY-D1Ss37 com as enzimas *RsaI*, *XbaI*, *XhoI*, *AccI*, *BmgBI*, *NotI*, e *NcoI*. Apenas *RsaI*, *AccI* e *NcoI* hidrolisaram o fragmento. 61

Figura 15. Sequência de aminoácidos do gene *XUTI* de *S. stipitis*, que possivelmente corresponde à permease presente na transformante BBY-D1Ss24. A região demarcada evidencia a presença do domínio G-G/F-XXX-G na sequência. 63

Figura 16. Filograma mostrando a relação entre os transportadores possivelmente encontrados nas transformantes BBY-D1Ss24 (*XUTI*) e BBY-D1Ss37 (*Ss37*, ou gene *QUP2*), com outros transportadores de hexoses de *S. stipitis*. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos micro-organismos e plasmídeos utilizados... 30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 CEPAS E PLASMÍDEOS A SEREM UTILIZADOS	29
3.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	31
3.3 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO EM BATELADA	32
3.4 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS	33
3.5 EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEO DE BACTÉRIAS	33
3.6 EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEO DE LEVEDURAS	34
3.7 TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA COM O VETOR DE EXPRESSÃO CONTENDO O GENE DE INTERESSE	34
3.8 AMPLIFICAÇÃO DE GENES POR PCR.....	35
3.9 DIGESTÕES COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	35
3.10 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DOS AÇÚCARES E PRODUÇÃO DE ETANOL, XILITOL E GLICEROL	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 OBTENÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA E SELEÇÃO DOS TRANSFORMANTES	37
4.2 ANÁLISE DAS LEVEDURAS RECOMBINANTES ATRAVÉS DE ENSAIOS DE CRESCIMENTO	38
4.3 ANÁLISE DAS LEVEDURAS RECOMBINANTES ATRAVÉS DE ENSAIOS FERMENTATIVOS EM BATELADA.....	48

4.4 CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DO MAPA DE RESTRIÇÃO DOS GENES CLONADOS	58
5 CONCLUSÕES.....	65
6 REFERÊNCIAS	66
ANEXO A – Sequência nucleotídica referente ao transportador possivelmente inserido no transformante BBY-D1Ss24	75
ANEXO B – Sequência nucleotídica referente ao transportador possivelmente inserido no transformante BBY-D1Ss37	77

1 INTRODUÇÃO

O uso de etanol combustível no Brasil teve início na década de 70, representando uma estratégia do governo brasileiro em resposta à crise mundial do petróleo e aos baixos preços do açúcar no mercado. A fim de manter o crescimento econômico do país e garantir o suprimento de energia (substituindo a gasolina importada por etanol obtido a partir de biomassa), em 1975 foi criado o Proálcool (Programa Nacional do Álcool). Devido ao clima favorável e tradição histórica com o cultivo, a cana-de-açúcar foi o substrato escolhido para a produção de etanol combustível no Brasil. Com a ajuda de subsídios do governo e um grande investimento em pesquisa, teve início a produção de automóveis abastecidos por álcool, juntamente com um aumento no número de destilarias (ROSILLO-CALLE e CORTEZ, 1998; DE HOLLANDA e POOLE, 2001; SOCCOL *et al.*, 2005).

Apesar do futuro promissor dessa nova fonte renovável, a produção de etanol sofreu uma considerável queda nas décadas seguintes. Fatores como a diminuição de subsídios governamentais, mudanças dos preços internacionais do açúcar, estabilização do preço do petróleo e baixos preços do etanol importado convergiram para o declínio da popularidade do álcool (ZANIN *et al.*, 2000).

Tendo em vista a problemática ambiental decorrente do uso de combustíveis fósseis e a busca por fontes renováveis de energia, em 2003 a indústria automobilística introduziu ao mercado uma linha de veículos com a tecnologia *flex fuel*, permitindo a utilização de álcool ou gasolina (KAMIMURA e SAUER, 2008). As vendas nacionais de veículos *flex* evoluíram de 48,2 mil unidades, em 2003, para 376,6 mil no ano de 2004.

A produção de etanol teve um crescimento aproximado de 13% ao ano entre 2003 e 2008. Porém, a partir de 2008, o mercado brasileiro apresentou um crescente descompasso entre a oferta efetiva e a demanda potencial por esse produto. Em contraste com os anos anteriores, o período entre 2008 e 2010 teve um aumento de apenas 1,5% ao ano na produção de etanol (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA - EPE, 2011). Tal descompasso pode ter origem na escassez de investimentos do setor sucroenergético na expansão de sua capacidade produtiva; na produção de açúcar em detrimento do combustível; na estabilidade do preço da gasolina e limitação da rentabilidade do etanol; além de

problemas climáticos. Ainda assim, segundo o Ministério de Minas e Energia, em agosto de 2013, as exportações brasileiras de etanol somaram 485,7 milhões de litros, o que representa um volume 55% maior se comparado ao mesmo período do ano anterior. Do total de veículos licenciados no ano de 2013, 88,5% são representados pelos carros *flex fuel* (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2013).

Uma possível solução para aumentar a produtividade do etanol e atender à demanda de um número cada vez maior de veículos *flex* seria o investimento em inovações tecnológicas, capazes de permitir o aproveitamento integral da cana, incluindo o bagaço e a palha. (MILANEZ *et al.*, 2012). O combustível produzido a partir da biomassa lignocelulósica é chamado de etanol de segunda geração.

Há uma tendência mundial em reduzir e substituir o uso de combustíveis fósseis por formas mais renováveis de energia. A procura por alternativas mais sustentáveis tem atraído o interesse de vários países para enfrentar as necessidades de abastecimento de energia e a redução das emissões de carbono. De acordo com um estudo conduzido pela *Bloomberg New Energy Finances* e divulgado no ano de 2012, países como China, Brasil e Estados Unidos são líderes em pesquisas para a obtenção do etanol de segunda geração.

O investimento nesse biocombustível é uma das alternativas para países que desejam elevar os níveis de produção de etanol sem aumentar a área plantada, além de diminuir a competição das terras com o mercado alimentício (FERNANDES *et al.*, 2012). Esta nova tecnologia viabiliza a produção de etanol a partir de resíduos subutilizados na produção do etanol de primeira geração, como por exemplo, o bagaço, palha e folhas de cana-de-açúcar, convertendo os polissacarídeos contidos neste material lignocelulósico em energia. Uma vez que a produção de etanol de segunda geração ainda não é economicamente viável, a produção de etanol no Brasil conta exclusivamente com tecnologias convencionais, amplamente conhecidas e desenvolvidas, baseadas na utilização da sacarose contida na cana-de-açúcar (GOLDENBERG, 2008; SOCCOL *et al.*, 2010; CHANDEL *et al.*, 2011).

O bagaço da cana-de-açúcar consiste em aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY *et al.*, 2000). A hemicelulose é um heteropolímero e sua despolimerização gera monômeros de açúcares, tais como xilose, arabinose, galactose,

glicose e manose. A xilose é uma pentose e o segundo carboidrato mais abundante na natureza. Sua fermentação para etanol poderia representar uma importante alternativa para a obtenção de biocombustível, contudo, a fermentação de pentoses apresenta alguns desafios (JEFFRIES, 2006).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o micro-organismo melhor estabelecido para fermentação alcoólica de hexoses em escala industrial. No entanto, é incapaz de metabolizar eficientemente pentoses como a xilose, embora possua os genes necessários para a sua metabolização (BATT *et al.*, 1986). Os maiores desafios para a conversão de xilose em etanol são fatores como o desbalanço redox intracelular, baixo transporte de xilose para o meio intracelular e baixo fluxo de xilose para a via das pentoses (HECTOR *et al.*, 2008).

Diferentes abordagens têm sido utilizadas com o objetivo de aperfeiçoar cepas desta levedura para uma metabolização mais eficiente de xilose, entre elas está a engenharia metabólica. Deste modo é possível introduzir modificações genéticas específicas capazes de alterar a força de um promotor de certo gene, realizar deleções de genes ou até mesmo introduzir novos genes em um organismo (OSTERGAARD *et al.*, 2000).

Diferentemente de *S. cerevisiae*, espécies de leveduras como *Candida succiphila*, *C. shehatae*, *C. jeffriesii*, *C. intermedia*, *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces stipitis*, *Pachisolen tannophilus*, *Hansenula polymorpha*, *Debaryomyces hansenii*, *Spathaspora passalidarum* e *Spathaspora arborariae* utilizam a xilose e a fermentam com diferentes graus de rendimento de etanol (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 1994; TAVARES *et al.*, 2000; GARDONYI *et al.*, 2003; RYABOVA *et al.*, 2003; STAMBUK *et al.*, 2003; NGUYEN *et al.*, 2006; CADETE *et al.*, 2009). No entanto, tais leveduras não demonstram o mesmo desempenho fermentativo de *S. cerevisiae* em condições industriais, uma vez que as mesmas apresentam baixa tolerância ao etanol e a níveis de pH ácido e requerem, em sua maioria, condições microaeróbias para uma fermentação mais eficiente (JEFFRIES e SHI, 1999; HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2001).

Embora estudos com linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* representem, no momento, a forma mais eficiente para a produção industrial de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, estas leveduras ainda utilizam a glicose consideravelmente mais rápido do que a xilose (HO *et al.*, 1999, 2000). Um dos motivos pode estar relacionado com a

maior eficiência do transportador pela glicose ao invés da xilose (KÖTTER e CIRIACY, 1993), sendo que a captação destes dois açúcares é realizada pelos mesmos transportadores nesta levedura.

Os transportadores de açúcares possuem um papel fundamental em sistemas biológicos, sendo responsáveis por internalizar o carbono necessário para as demais funções celulares. É previsto que a sua estrutura seja composta por 12 α -hélices hidrofóbicas, conectadas entre si por “*loops*” hidrofílicos, atravessando a membrana em zigue-zague (HENDERSON, 1993). Transportadores envolvidos na captação de hexoses (glicose, frutose, galactose) já são conhecidos e amplamente pesquisados em *S. cerevisiae*, contudo, transportadores exclusivos de pentoses ainda precisam de mais estudo. A levedura *S. cerevisiae*, isenta de modificações genéticas, é capaz de transportar pentoses através da membrana celular a partir de uma das várias proteínas transportadoras de hexoses que possuem (Hxt7p, Hxt5p, Hxt4p, Hxt2p, Hxt1p e Gal2p). Contudo, estas proteínas possuem uma afinidade muito mais alta por estas hexoses, o que pode levar a uma inibição por competição em uma co-fermentação de hexoses-pentoses. Transportadores exclusivos para pentoses podem representar uma estratégia interessante no aprimoramento de cepas capazes de utilizar simultaneamente hexoses e pentoses no meio (revisto por YOUNG *et al.*, 2010).

Para diversas leveduras capazes de transportar xilose (*S. stipitis*, *C. shehatae*, *C. succiphila*, *K. marxianus*, *D. hansenii*, *C. intermedia*) são conhecidos transportadores de baixa e alta afinidade para este açúcar. De fato, até o momento, todos os transportadores de baixa afinidade para xilose descobertos transportam também a glicose, com uma maior taxa de afinidade por esta. Além disto, a presença de glicose reprime os sistemas de transportadores com alta afinidade por xilose e deste modo, esta pentose só é utilizada após a depleção da glicose no meio (WEBB e LEE, 1990; SANCHEZ *et al.*, 2002; YABLOCHKOVA *et al.*, 2003).

Uma vez que há o melhoramento da via de utilização da xilose em leveduras recombinantes, o transporte de xilose mostrou possuir um controle significativo nas taxas de utilização deste açúcar (GARDONYI *et al.*, 2003). Deste modo, a etapa de transporte pode ser considerada limitante para uma eficiente fermentação da xilose em etanol.

Diversos trabalhos apontam diferentes micro-organismos para a utilização heteróloga de seus transportadores em cepas de *S. cerevisiae*

modificadas (SALOHEIMO *et al.*, 2007; HECTOR *et al.*, 2008; RUNQUIST *et al.*, 2009; DU e ZHAO, 2010; YOUNG *et al.*, 2012;). Entretanto, nenhum transportador ideal para a utilização na indústria foi caracterizado, fato este que evidencia a necessidade de novas estratégias para a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

A levedura *Scheffersomyces stipitis*, previamente conhecida como *Pichia stipitis* (KURTZMAN e SUZUKI, 2010), é uma das melhores espécies fermentadoras de xilose encontradas na natureza, capaz de produzir altas taxas de etanol a partir deste açúcar (TOIVOLA *et al.*, 1984; DU PREEZ *et al.*, 1986, 1989; NIGAM, 2001). Foi isolada do intestino de besouros digestores de madeira, ambiente rico em pentoses. Degradar biomassa em etanol com rendimentos elevados em relação a outros micro-organismos tornou *S. stipitis* um componente importante das pesquisas com biocombustíveis. Além disto, esta é amplamente utilizada em experimentos que envolvem a expressão heteróloga dos seus genes, ligados ao metabolismo da xilose: *XYL1* e *XYL2*, codificando respectivamente para xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) (DOES e BISSON, 1989; KÖTTER e CIRIACY, 1993; TANTIRUNGKIJ *et al.*, 1993; HO *et al.*, 1998; HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2007).

As enzimas XR e XDH, encontradas em *S. stipitis*, fazem parte do sistema de metabolização da xilose em etanol e são comumente expressas em *S. cerevisiae* para possibilitar a utilização desta pentose. No interior da célula, a xilose é convertida à xilulose através de duas etapas: uma de redução, mediada por XR, em que a xilose é reduzida a xilitol; e outra de oxidação, mediada por XDH, onde o xilitol é oxidado à xilulose. No passo seguinte, a xilulose é fosforilada pela enzima xiluloquinase (XK) para formar xilulose-5-fosfato, que por sua vez entra na via das pentoses fosfato para a formação de etanol (Figura 1) (revisto por YOUNG *et al.*, 2010).

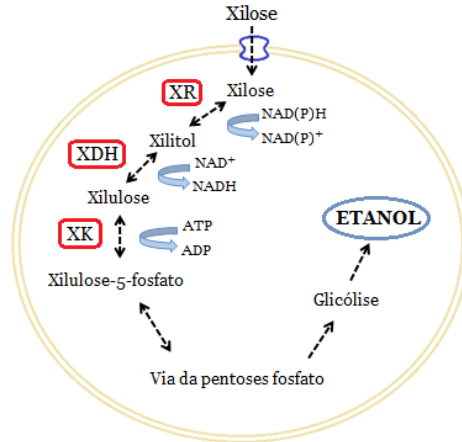


Figura 1. Esquema simplificado da utilização de xilose por leveduras, envolvendo o transporte e posterior metabolização até etanol.

Os sistemas de transporte de baixa afinidade (transporte facilitado) e de alta afinidade (simporte H^+ -xilose) para xilose já foram descritos em *S. stipitis* (KILIAN e VAN UDEN, 1988; DOES e BISSON, 1989), evidenciando que esta levedura apresenta um material genético promissor para a construção de linhagens recombinantes capazes de fermentar xilose. Contudo, até o momento estudos não foram capazes de identificar o sistema de transporte de pentoses altamente eficiente de *S. stipitis*, mesmo esta sendo um organismo fonte para vários genes envolvidos no metabolismo de pentoses (revisto por YOUNG *et al.*, 2010).

Ao analisar seu genoma, Jeffries e colaboradores (2007) descobriram também diferentes genes para a bioconversão de lignocelulose, mostrando o potencial desta levedura para a fermentação de uma ampla variedade de açúcares contidos na biomassa lignocelulósica. Entretanto, *S. stipitis* possui uma baixa tolerância às altas concentrações de açúcar e etanol encontrados na indústria, restringindo assim o seu uso e a produção em larga escala de etanol a partir de xilose.

As propriedades esperadas de uma cepa capaz de fermentar hidrolisados lignocelulósicos são: a eficiente utilização de hexoses e pentoses; velocidades de fermentação mais rápidas; alta produção de

etanol; alta tolerância ao etanol, a inibidores de fermentação, a baixos pHs e a altas temperaturas; e ainda uma alta viabilidade e vitalidade (PASHA *et al.*, 2007). A construção de cepas apropriadas para a indústria pode ser realizada através de diferentes métodos biotecnológicos, capazes de unir a habilidade de *S. stipitis* em fermentar xilose e a robustez da levedura industrial *S. cerevisiae*.

Abordagens como a construção de bibliotecas genômicas podem ser utilizadas para rastrear um fenótipo desejável com a clonagem de genes a partir do material genômico de um organismo. Trabalhos já demonstraram a eficiência da técnica no aprimoramento de leveduras para a captação de xilose e produção de etanol (JIN *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2012).

A construção de uma biblioteca genômica a partir do genoma da levedura *Scheffersomyces stipitis* se torna uma estratégia promissora, permitindo a seleção e clonagem de sequências gênicas até então desconhecidas, relacionadas ao metabolismo da xilose. Uma vez que a captação da xilose para dentro da célula é uma etapa limitante para uma fermentação eficiente, a descoberta de novas proteínas transportadoras de membrana torna-se um alvo em potencial para o melhoramento das taxas de produção de etanol.

O presente trabalho pretende realizar a clonagem de sequências nucleotídicas do genoma de *S. stipitis* e expressão heteróloga destas em leveduras *S. cerevisiae* através da utilização de uma biblioteca genômica. Após a realização das devidas transformações, foram observados os perfis fermentativos das leveduras recombinantes em diferentes fontes de carbono, a fim de identificar eficientes produtoras de etanol a partir de xilose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral a construção de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que transporte eficientemente xilose, visando otimizar a produção de etanol de segunda geração.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar e expressar potenciais transportadores de açúcares a partir de uma biblioteca genômica construída com o DNA da levedura *Scheffersomyces stipitis*;
- Analisar o perfil de crescimento e fermentação de açúcares pelas leveduras *S. cerevisiae* recombinantes contendo os diferentes plasmídeos de interesse;
- Identificar, através da construção de mapas de restrição, quais transportadores foram inseridos nos plasmídeos clonados na levedura *S. cerevisiae* recombinante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CEPAS E PLASMÍDEOS A SEREM UTILIZADOS

Na Tabela 1 são descritas a linhagens de bactéria e leveduras que foram utilizadas neste trabalho, assim como o vetor de expressão escolhido.

Tabela 1. Características dos micro-organismos e plasmídeos utilizados.

Descrição e/ou procedência	
<u>Cepas de <i>S. cerevisiae</i></u>	
KY73	<i>hxt1Δ::HIS3:: hxt4Δ hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6Δ hxt5::LEU2 gal2Δ hxt7Δ::HIS3</i> (KRUCKEBERG <i>et al.</i> , 1999).
DLG-K1	Derivada de KY73, contendo o plasmídeo integrativo pAUR-XXXDHXR (este trabalho).
<u>Cepa de <i>S. stipitis</i></u>	
NBRC1687	(WATANABE <i>et al.</i> , 2011).
<u>Cepa de <i>Escherichia coli</i></u>	
DH5α	F ⁷ / <i>endA1hsdR17</i> (rK-mK+) <i>glnV44 thi-1 recA1 gyrA</i> (NaI ^r) <i>relA1Δ</i> (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR</i> (Φ80 <i>dlac</i> Δ (<i>LacZ</i>) M15 (MESELSON e YAN, 1968).
<u>Plasmídeos</u>	
pAUR-XXXDHXR	<i>AURI-C</i> [_{<i>PGK1p</i>} - <i>XKS1</i> - _{<i>PGK1p</i>} _{<i>PGK1p</i>} - <i>XYL2</i> - _{<i>PGK1p</i>} _{<i>PGK1p</i>} - <i>XYL1</i> - _{<i>PGK1p</i>}]
pPGK	Vetor de clonagem, derivado do plasmídeo YIp5 (KANG <i>et al.</i> ,1990).

3.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Para o cultivo da cepa de *E. coli* DH5 α foi utilizado o meio LB (Luria-Bertani) que é composto de 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl, sendo adicionado 100 μ g/mL de Ampicilina quando necessário (o plasmídeo pPGK confere às bactérias resistência à Ampicilina) e o pH ajustado para 7,0 com NaOH. A preparação de meios semi-sólidos foi realizada com a adição de 20 g/L bacto-ágar. Alternativamente, as bactérias foram crescidas em meio SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 25 mM de KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20 mM glicose). O crescimento das bactérias deu-se em uma estufa de cultura mantida a 37°C.

A levedura parental DLG-K1 foi crescida em meio complexo YPM, contendo 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptonas e 20 g/L de maltose. Esta linhagem possui o plasmídeo integrativo pAUR-XKXDHXR (MATSUHIKA *et al.*, 2008), responsável por conferir às leveduras a capacidade de crescimento em meios com Aureobasidina A (Takara Bio, Kioto, Japão). O crescimento desta linhagem se dá exclusivamente em maltose, resultado da deleção dos principais genes (*HXT1* a *HXT2* e *GAL2*) envolvidos com o transporte de hexoses e xilose em *S. cerevisiae*. Para a preparação de meios semi-sólidos foram adicionados 20 g/L de bacto-ágar.

Para o cultivo das leveduras recombinantes foi utilizado o meio sintético SC, contendo 6,7 g/L de base nitrogenada sem aminoácidos, 20 g/L de diferentes fontes de carbono (utilizados individualmente: xilose, glicose, maltose, frutose; ou em combinação: xilose/glicose, maltose/xilose, maltose/glicose, maltose/frutose) e 1,92 g/L de suplemento de aminoácidos e bases nitrogenadas necessárias ao crescimento das células, mas isento de uracila (o plasmídeo pPGK confere às leveduras capacidade de crescimento em meios sem uracila). Para a preparação de meios semi-sólidos foram adicionados 20 g/L de bacto-ágar. O crescimento dos meios semi-sólidos em placas deu-se em uma estufa, mantida a 28 °C.

Os meios para leveduras tiveram seu pH ajustado para 5,0 com HCl. Com exceção dos ensaios de crescimento e fermentação, os meios para leveduras continham 0,5 mg/L de Aureobasidina A. Todos os meios descritos foram esterilizados por autoclave, a 121 °C por 15 min. As células foram crescidas em tubos de ensaio durante 48h, contendo 3

mL do meio líquido sintético SC acrescido de 20 g/L de maltose e 0,5 mg/L de Aureobasidina A. Ao atingirem a fase exponencial, estas células foram centrifugadas (5000 rpm, 5 minutos, 4 °C) e ressuspendidas em 1 ml de água destilada autoclavada. A suspensão celular foi transferida para frascos Erlenmeyer, contendo 1/5 do seu volume com meio líquido sintético, diferindo entre si quanto às fontes de carbono (maltose, xilose, glicose ou frutose). Durante os ensaios de crescimento, os Erlenmeyers foram mantidos sob agitação orbital (Incubator Shaker Innova 44) a 28 °C e 160 rpm. O crescimento celular (produção de biomassa) foi acompanhado por medida da absorbância da amostra, num comprimento de onda de 600 nm e utilizando um espectrofotômetro.

Alternativamente, as células foram inoculadas em placas de 96 poços com 100 µL de meio sintético SC (“microcrescimento”) e 20 g/L da fonte de carbono de interesse (maltose, glicose, xilose, frutose, galactose e manose) por poço, com duplicata. As leveduras foram incubadas a 28 °C com rotação a 160 rpm por até 60 horas em uma leitora multifuncional (Tecan Echisto Infinite M200 PRO), sendo a absorbância medida a 570 nm (Abs_{570nm}) determinada a cada 15 minutos. O crescimento celular foi calculado utilizando a média da absorbância nos dois poços subtraindo o resultado dos poços contendo apenas os meios estéreis.

3.3 ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO EM BATELADA

Nos ensaios de fermentação em batelada, a fim de alcançar uma maior concentração celular, foi realizado um escalonamento, onde gradualmente as células foram transferidas para volumes maiores de meio, assim que atingissem a fase exponencial de crescimento. Primeiramente foi realizado um pré-inóculo das células em tubos de ensaio durante 48h, contendo 3 mL do meio líquido sintético SC acrescido de 20 g/L de maltose e 0,5 mg/L de Aureobasidina A. Em seguida, as células foram transferidas para frascos Erlenmeyer, contendo 50 mL do mesmo meio. Novamente, foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo 1 L do mesmo meio, como forma de alcançar a concentração celular final desejada de 10 g/L para a fermentação. Uma vez atingida esta concentração, as células foram centrifugadas (5000 rpm por 5 minutos, 4 °C), lavadas duas vezes com água destilada autoclavada e mais uma vez suspensas em água, de modo a atingirem a absorbância necessária. Esta suspensão celular foi misturada em frascos

Erlenmeyer com meio líquido sintético, diferindo entre si quanto as fontes de carbono (estas utilizadas individualmente – xilose ou glicose – ou em combinações de dois açúcares – xilose/glicose; maltose/xilose; maltose/glicose; maltose/frutose), e incubadas em agitador orbital como descrito acima para os crescimentos. Em tempos pré-determinados foram removidas alíquotas do meio para posterior processamento, visando determinar o crescimento celular, consumo dos açúcares e produção de xilitol, etanol e glicerol.

3.4 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS

Para a transformação da linhagem de *E.coli* DH5 α foi utilizado o método de eletroporação. As bactérias preparadas foram retiradas do ultracongelador a -80 °C e incubadas em gelo por 10 minutos para descongelamento. Foram adicionados às células 3 μ L do sistema de ligação desejado. Um controle negativo foi realizado, o qual não possuía DNA. Após 5 minutos, cada mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação (previamente esterilizada com luz ultravioleta e refrigerada). Um pulso de 2,5 mV foi aplicado. Após a eletroporação, as células foram recuperadas em 1 ml de meio SOC e incubadas em estufa, a 37 °C, por 1 a 2 horas. Em seguida, as células foram transferidas em meio sólido LB contendo Ampicilina e incubadas em estufa, a 37 °C, por 16-18 horas.

3.5 EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEO DE BACTÉRIAS

A extração de plasmídeo de bactérias foi feita pelo método de “*miniprep*” (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Uma colônia da bactéria contendo o plasmídeo desejado foi inoculada em meio LB líquido contendo Ampicilina, incubada *overnight* a 37 °C e 160 rpm. A cultura foi transferida para microtubos, centrifugada (6000 rpm, 4 minutos), ressuspendida em 100 μ L de solução GTE contendo 50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA e 1 μ L de RNase A (1 mg/mL), e mantida na estufa a 37°C durante 15 minutos. A seguir, foram adicionados 200 μ L de uma solução 0,2 M NaOH, 1% SDS e 150 μ L de Acetato de Potássio 5 M. Após incubação no gelo, essa mistura foi centrifugada (13000 rpm por 10 min, 4°C) e o sobrenadante transferido para um novo tubo estéril, no qual foi acrescentado 800 μ L de álcool 95% e 20 μ L de NaCl. Após refrigeração -20 °C, o DNA foi precipitado por centrifugação (13000 rpm por 20 minutos, 4°C), lavado com álcool

70% e ressuspensionado em água destilada autoclavada. Os plasmídeos foram armazenados sob refrigeração a -20 °C.

3.6 EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEO DE LEVEDURAS

A levedura de interesse foi inoculada em meio apropriado de crescimento e incubada *overnight*. A cultura foi transferida para microtubos e centrifugada (4000 rpm, 3 minutos). Após remoção do sobrenadante adicionou-se 200 µL do tampão de lise (881µL de água destilada, 100 µL NaCl 1M, 10 µL Tris 1M pH 8, 5 µL SDS 20%, 4 µL EDTA 0,25M) e aproximadamente 200 µL de bolinhas de vidro (*glassbeads*) para subsequente agitação em vórtex. Em seguida, foi adicionado 200 µL de fenol clorofórmio isoamil álcool 25:24:1 e os microtubos centrifugados (13000 rpm, 5 minutos). O sobrenadante foi extraído e transferido para novo microtubo com a adição de NaCl e álcool 95% gelado. Após refrigeração de -20 °C, o DNA foi precipitado por centrifugação (13000 rpm por 20 minutos, 4°C), lavado com álcool 70% e ressuspensionado em água destilada autoclavada. Os plasmídeos foram armazenados sob refrigeração a -20 °C.

3.7 TRANSFORMAÇÃO DA LEVEDURA COM O VETOR DE EXPRESSÃO CONTENDO O GENE DE INTERESSE

As transformações foram realizadas utilizando o método descrito por GIETZ & WOOD (2006), com algumas alterações no protocolo. O inóculo é feito em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio YPM, acrescido de Aureobasidina, mantidos em agitação orbital durante 48h e a 28°C. Em um Erlenmeyer contendo 50 µL do mesmo meio é adicionado 1,5 µL do inóculo, continuando o crescimento em agitação até a absorbância atingir $DO_{600}=1,5$. As células são centrifugadas (5000 rpm, 5 minutos) e é feita uma lavagem com 1 mL de LiAc 0,1 M. Novamente as células são ressuspensionadas em LiAc 0,1 M e distribuídas em novos microtubos, acrescidos de 300 µL de PLI (1 mL LiAc 1 M, 1 mL água destilada, 8 mL PEG 3350 50%), 5 µL de SS-DNA e 10 µL do plasmídeo de interesse. Os microtubos são mantidos sob agitação (160 rpm, 28°C) durante 20 minutos e incubados em banho-maria a 42 °C durante 30 minutos. Em seguida, são colocados durante 10 minutos no gelo, centrifugados (5000 rpm, 2 minutos) e cada microtubo é ressuspensionado em 200µL de água destilada autoclavada para o plaqueamento.

A seleção dos clones transformantes é realizada em meio sintético SCX, suplementado com todos os aminoácidos menos a uracila e adição do antibiótico Aureobasidina. As culturas foram incubadas a 28 °C e mantidas até 7 dias na estufa.

3.8 AMPLIFICAÇÃO DE GENES POR PCR

Os fragmentos inseridos no vetor de clonagem pPGK foram amplificados através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) realizada num termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf). Os *primers* utilizados (PGKpseqF: CAGATCATCAAGGAAGTAATTATCT e PGKtseqR: TCTATCGATTTCAATTCAATTCAAT) anelam na região promotora e terminadora do vetor pPGK, e foram sintetizados comercialmente (Integrated DNA Technologies). As reações de amplificação foram realizadas em microtubos de 0,6 ml contendo 2 µl de dNTP; 0,5 µM de cada primer; 20-100 nM de DNA plasmidial; 0,02 U/µl da enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific) com tampão da enzima especificado pelo fabricante, e água destilada estéril para um volume final de 50 µl. Estas amostras foram colocadas no termociclador e submetidas a uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos e, em seguida, a 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 3 minutos; e um passo de extensão final a 72 °C por 5 minutos.

3.9 DIGESTÕES COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As enzimas de restrição utilizadas foram *Bam*HI, *Eco*RI, *Acc*I, *Bmg*BI, *Nco*I, *Not*I, *Rsa*I, *Xba*I e *Xho*I. Em microtubos, foram distribuídas as quantidades necessárias do DNA de interesse, tampão da enzima, água destilada autoclavada e a enzima, totalizando um volume final de 20 µL. A mistura foi incubada durante 2 horas em banho-maria a 37°C. Para a confirmação da digestão foi realizada análise por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

3.10 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DOS AÇÚCARES E PRODUÇÃO DE ETANOL, XILITOL E GLICEROL

O consumo dos açúcares, bem como a produção de etanol, xilitol e glicerol foram determinados através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC da Jasco) nas seguintes condições: coluna HyperREZ XP ácido orgânico (ThermoScientific), fase móvel com 5 mM de ácido sulfúrico, taxa de fluxo de $0,1 \text{ mL min}^{-1}$ durante 90 minutos, temperatura da coluna de $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e detecção do índice de refração (IR -2031 plus, Jasco). As curvas de calibração foram estabelecidas utilizando três concentrações diferentes: na faixa de 5 a 20 g/L para os açúcares glicose, xilose, maltose e frutose; e na faixa de 2,5 a 10 g/L para xilitol, etanol e glicerol.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA E SELEÇÃO DOS TRANSFORMANTES

O presente trabalho visou a construção de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de transportar eficientemente xilose, a fim de otimizar a produção de etanol de segunda geração. Para tal, realizou-se a construção de uma biblioteca genômica, onde o organismo escolhido como doador de DNA foi a levedura fermentadora de xilose *Scheffersomyces stipitis*, cepa NBRC1687 (WATANABE *et al.*, 2011), numa tentativa de clonar os genes que a tornam uma eficiente fermentadora deste açúcar.

A construção da biblioteca genômica de *S. stipitis* foi realizada pelo AIST (*Nacional Institute of Advanced Industrial Science and Technology*), no Japão. Seu material genômico foi isolado e digerido com a enzima *Bam*HI, afim de gerar fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Os fragmentos aleatórios de DNA obtidos foram clonados no plasmídeo pPGK, vetor das transformações realizadas neste trabalho. Em bactérias ele confere a capacidade de crescimento na presença do antibiótico Ampicilina e em leveduras o crescimento em meios isentos da base nitrogenada uracila. Para atingir uma maior quantidade de cada clone, os plasmídeos foram inseridos primeiramente em bactérias *Escherichia coli*, capazes de uma rápida multiplicação.

Os plasmídeos pPGK contendo os diferentes fragmentos da biblioteca genômica foram extraídos de *E. coli* e inseridos na levedura DLG-K1. Esta levedura é descendente da cepa KY73 (KRUCKEBERG *et al.*, 1999), uma linhagem *hxt*-null deletada dos genes *hxt1*, *hxt2*, *hxt3*, *hxt4*, *hxt5*, *hxt6*, *hxt7* e *gal2*, responsáveis pela codificação de transportadores transmembrana de hexoses. Os genes *HXT1* a *HXT7* correspondem a proteínas transportadoras de hexoses, enquanto *GAL2* codifica uma permease para galactose (mas que também transporta outras hexoses). Esta deleção de genes faz com que a levedura seja incapaz de captar hexoses para dentro da célula, permitindo o seu crescimento exclusivo em maltose, um dissacarídeo de glicose cujo transportador é codificado pelos genes *MAL*, ainda presentes em DLG-K1. Essa característica é essencial, uma vez que possibilita a realização de experimentos onde a inserção de novos genes para transportadores

pode ser observada e avaliada em meios de cultura com diferentes fontes de carbono.

Além da deleção destes genes, a levedura DLG-K1 possui o plasmídeo integrativo pAUR-XKXDHXR (MATSUSHIKA *et al.*, 2008), capaz de se integrar ao cromossomo e conferir à levedura resistência ao antibiótico Aureobasidina A (Takara Bio, Kioto, Japão). Este antibiótico é tóxico contra fungos em baixas concentrações (0,5 µm/mL), incluindo leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* e alguns do gênero *Aspergillus*. O plasmídeo pAUR-XKXDHXR confere ainda à levedura a capacidade de codificar as enzimas XDH e XR (xilitol desidrogenase e xilose redutase, provenientes de *S. stipitis*) e XK (xiluloquinase, endógena de *S. cerevisiae*), importantes na metabolização da xilose em etanol uma vez que esta foi internalizada. De fato, altos níveis de atividade destas 3 enzimas é observado em extratos celulares da linhagem DLG-K1 (dados não mostrados).

Como o crescimento em xilose é uma característica de interesse para o presente trabalho, a seleção das leveduras DLG-K1 contendo os fragmentos aleatórios de *S. stipitis* foi feita em placas de Petri com meio sintético semi-sólido SC contendo xilose como fonte de carbono, com a adição de Aureobasidina A e isenção de uracila. A falta de uracila no meio permite somente o crescimento de colônias que contenham o plasmídeo pPGK, responsável por carregar o inserto proveniente da biblioteca genômica. Nesta seleção foram obtidas 90 colônias. Subentende-se que estas colônias foram capazes de crescer em xilose pois adquiriram alguma característica que possibilitou a elas a internalização deste açúcar, uma vez que esta era a única fonte de carbono do meio e a levedura DLG-K1 é deletada nos principais transportadores de hexoses e xilose.

4.2 ANÁLISE DAS LEVEDURAS RECOMBINANTES ATRAVÉS DE ENSAIOS DE CRESCIMENTO

As 90 colônias tiveram os seus perfis de microcrescimento analisados na presença dos açúcares xilose e glicose (dados não mostrados), e destas, 8 foram selecionadas. Seus perfis destacaram-se no consumo de xilose e glicose, evidenciando características de interesse para a produção de etanol. Estas 8 colônias, denominadas BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37, BBY-D1Ss41, BBY-D1Ss53, BBY-D1Ss80, BBY-D1Ss86 BBY-D1Ss90, foram a seguir avaliadas através

do microcrescimento em placas de 96 poços, desta vez em diversas fontes de carbono presentes na biomassa: xilose, glicose, maltose, frutose, galactose e manose (Figura 2). Justifica-se a análise em tais açúcares, pois, segundo uma revisão realizada por Jeffries (2009), é conhecido que a levedura *S. stipitis*, além da estudada capacidade de utilização de xilose, também é capaz de assimilar açúcares como manose, glicose e galactose. Em adição, também foram testados os açúcares frutose e maltose (este último como controle positivo já que todas as linhagens deveriam crescer nesta fonte de carbono).

Os resultados mostram que nenhuma transformante apresentou crescimento exclusivo em xilose. Por se tratar de um inserto aleatório do material genômico de *S. stipitis*, não podemos afirmar com certeza a natureza de seu produto codificante. Contudo, os experimentos de microcrescimento em diferentes açúcares (Figura 2) nos permitem inferir que os segmentos gênicos inseridos em pPGK, ao serem transcritos e traduzidos, conferem à levedura a capacidade de internalização de açúcares como xilose, glicose, frutose, galactose e manose. Deste modo, encontramos indícios de que as transformantes estejam carregando genes relacionados a transportadores de açúcares encontrados na membrana plasmática, uma vez que a levedura parental é isenta destes. Já nesta etapa foi possível observar que tais transportadores não são específicos para um determinado açúcar. É possível ainda que a realização de futuros ensaios com a adição de diferentes açúcares aponte um espectro mais amplo e mais diversificado de fontes de carbono consumíveis.

As 8 colônias tiveram seus plasmídeos extraídos e inseridos em *E. coli* e então reintroduzidos na DLG-K1. Este procedimento nos assegura de que o fenótipo adquirido pela colônia é proveniente da presença do inserto, e não de alguma possível adaptação natural sofrida pela levedura durante a transformação. Após este procedimento, contudo, somente 4 colônias obtiveram sucesso na reintrodução dos plasmídeos: BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37 e BBY-D1Ss90. Para estas 4 colônias foi realizado um ensaio de crescimento, onde foram utilizados individualmente os açúcares maltose, xilose, glicose e frutose, em uma concentração de 20 g/L, conforme mostrado nas Figuras 3 a 6. Foi incluída também a linhagem DLG-K1 transformada com o plasmídeo pPGK sem nenhum gene inserido como controle negativo (linhagem BBY-D1SpPGK). Como esperado, nessa transformante foi observado somente o crescimento da linhagem em

40

meio de cultura contendo maltose; nos demais açúcares, o crescimento de BBY-D1SspPGK foi nulo.

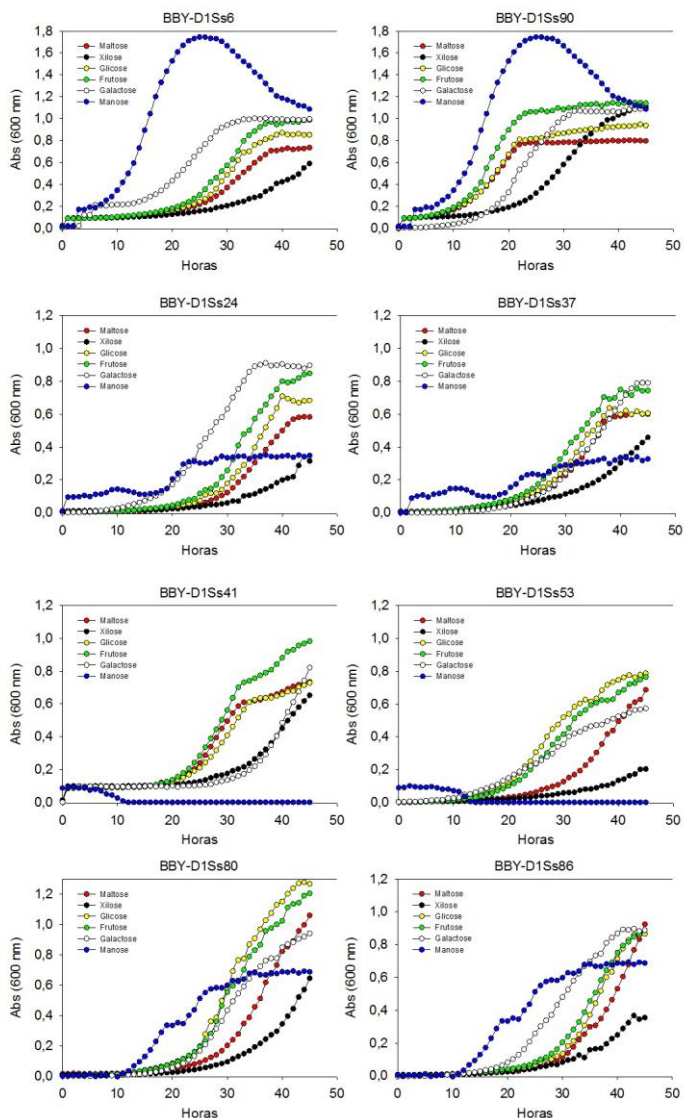


Figura 2. Microcrescimento em placas de 96 poços de linhagens *S. cerevisiae* transformadas com a biblioteca genômica de *S. stipitis*. As transformantes contendo os plasmídeos indicados foram crescidas em meios contendo 2% das diferentes fontes de carbono.

Durante o crescimento em maltose, todas as transformantes consumiram o açúcar em 24 horas (Figura 3a), e a linhagem controle o consumiu em aproximadamente 32 horas. Durante o crescimento em xilose as linhagens contendo os plasmídeos BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss37 e BBY-D1Ss90 apresentaram um perfil de consumo de xilose semelhante, enquanto BBY-D1Ss24 destacou-se ao consumir 89% deste açúcar (Figura 3b). Contudo, ainda é considerado um consumo lento, tendo em vista o perfil de consumo de açúcares das transformantes em maltose, glicose e frutose, já que, em 96 horas a xilose ainda não fora completamente consumida do meio. Durante o crescimento em glicose (Figura 3c) observou-se um perfil muito semelhante entre as transformantes, com a depleção dos açúcares em 24 horas. Porém, BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37 consumiram a glicose mais rapidamente. Em frutose (Figura 3d), BBY-D1Ss24 mostrou-se mais rápida no consumo do açúcar, seguido pelas transformantes BBY-D1Ss37 e BBY-D1Ss90.

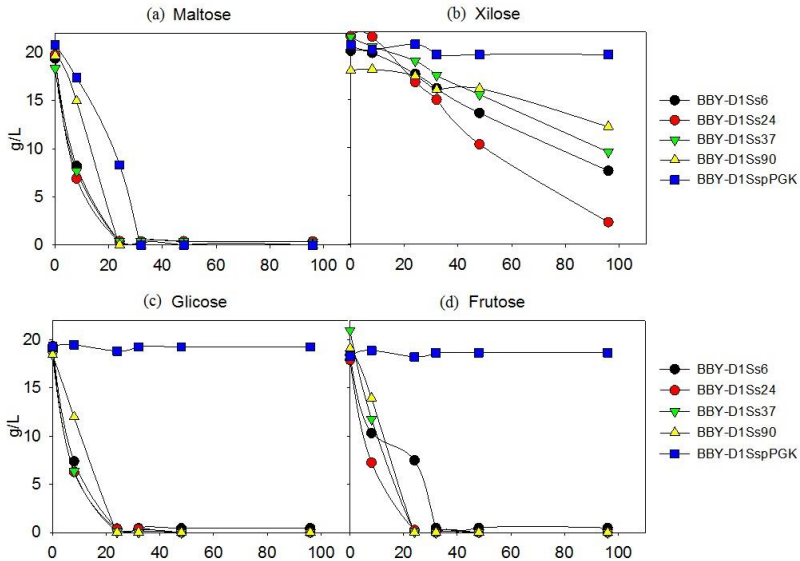


Figura 3. Consumo de açúcares pelas linhagens BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37, BBY-D1Ss90 e BBY-D1SspPGK inoculadas em meio de cultura SC contendo 2% de maltose (a), xilose (b), glicose (c) ou frutose (d).

Jin e colaboradores (2005) realizaram a construção de uma biblioteca genômica utilizando o material genômico de *S. stipitis* e uma cepa parental de *S. cerevisiae* e foram capazes de identificar transformantes que apresentaram uma melhor produção de etanol a partir de xilose. Ao analisar o crescimento com uma concentração inicial de 20 g/L de xilose, estes autores observaram que as leveduras recombinantes consumiram 5 g/L de xilose (transformante YSX3-C) e 13 g/L (transformante YSX3-TAL1M). Já no presente trabalho, o crescimento em 20 g/L de xilose mostrou que as transformantes BBY-D1Ss37 e BBY-D1Ss24 alcançaram um consumo de xilose de aproximadamente 13 g/L e 19 g/L, respectivamente (Figura 3b).

Na Figura 4 estão os dados de formação de biomassa do mesmo ensaio de crescimento. Como é possível observar, todas as linhagens apresentaram crescimento em todas as fontes de carbono, com exceção da linhagem BBY-D1SspPGK (que só cresce em maltose) e a linhagem BBY-D1Ss90 que foi também incapaz de crescer em xilose (Figura 4b), condizente com o fato de ser a levedura que menos consumiu este açúcar (vide Figura 3b).

As curvas de produção de etanol (Figura 5) foram semelhantes durante o crescimento em maltose (Figura 5a), contudo, BBY-D1Ss24 e BBY-D1Ss37 obtiveram uma produção mais rápida de etanol, produzindo aproximadamente 4 g/L em 3 horas. Em 24 horas, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37 e BBY-D1Ss90 atingem o pico da produção, com 6 g/L. Em todos os casos a produção de etanol foi maior e mais rápida do que o controle.

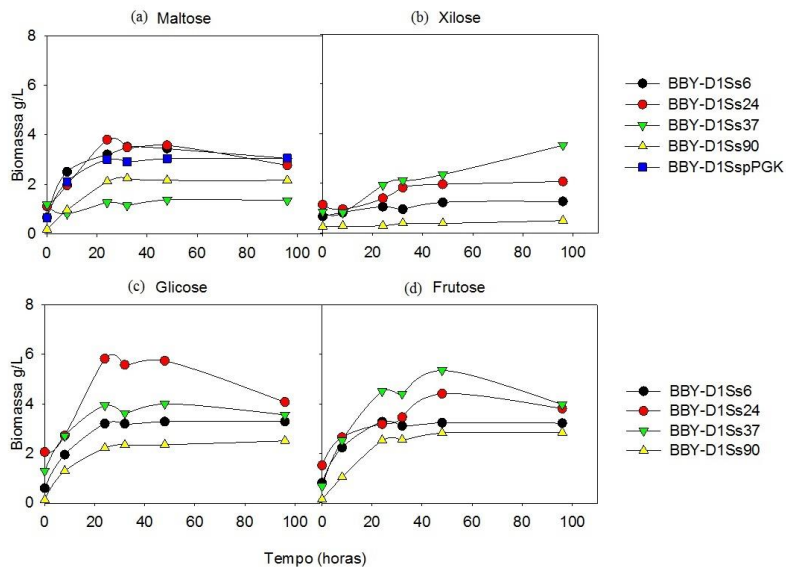


Figura 4. Produção de biomassa pelas linhagens BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37, BBY-D1Ss90 e BBY-D1SspPGK inoculadas em meio de cultura SC contendo 2% de maltose (a), xilose (b), glicose (c) ou frutose (d).

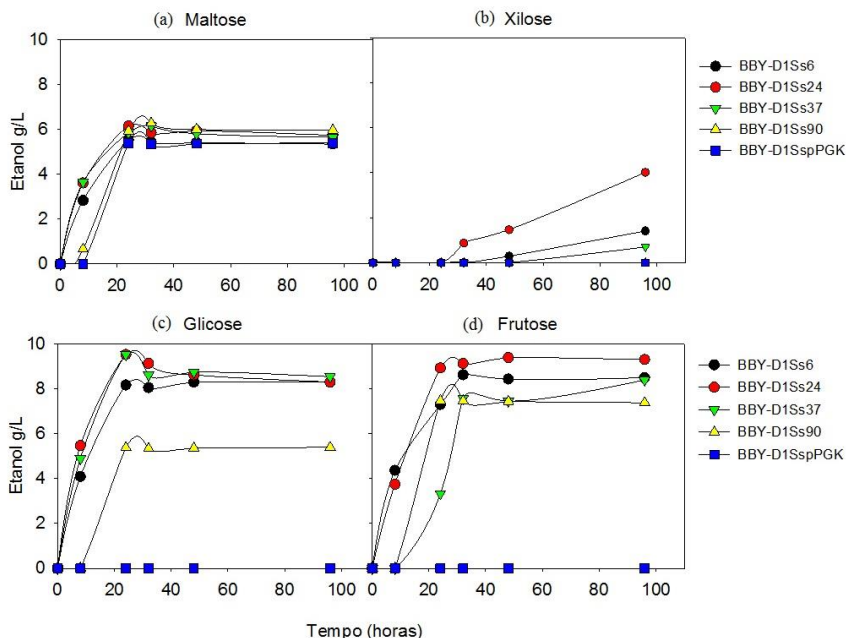


Figura 5. Produção de etanol pelas linhagens BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37, BBY-D1Ss90 e BBY-D1SspPGK inoculadas em meio de cultura SC contendo 2% de maltose (a), xilose (b), glicose (c) ou frutose (d).

Durante o consumo de xilose (Figura 5b) destacou-se a transformante BBY-D1Ss24, que em 96 horas produziu 4 g/L de etanol. Em comparação com os demais açúcares, é considerada uma produção lenta, uma vez que teve início após um tempo de 32 horas. Em glicose (Figura 5c) as transformantes BBY-D1Ss24 e BBY-D1Ss37 traçaram um perfil muito semelhante, alcançando um pico de aproximadamente 10 g/L de etanol em 24 horas. Em frutose (Figura 5d) a linhagem contendo o plasmídeo BBY-D1Ss24 também produziu a maior quantidade de etanol.

Finalmente, a Figura 6 mostra as curvas de produção de glicerol e xilitol, produtos secundários resultantes do crescimento celular. Cabe salientar que a produção de glicerol foi extremamente baixa (<0,5 g/L) e só foi observada durante o crescimento em maltose, glicose e frutose (Figuras 6a-c), enquanto que durante o crescimento em xilose a

produção de xilitol foi significativa, especialmente pela linhagem BBY-D1Ss24 (Figura 6d).

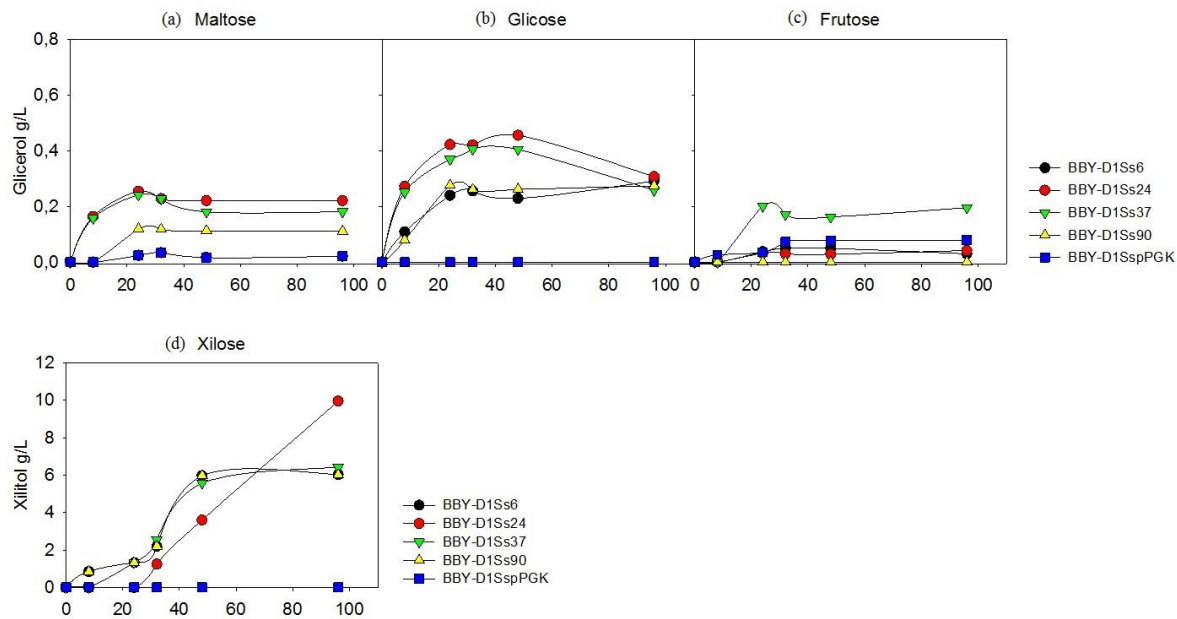


Figura 6. Curvas de produção de glicerol em meios contendo maltose (a), glicose (b) e frutose (c); e produção de xilitol em meio contendo xilose (d) pelas transformantes BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37, BBY-D1Ss90 e BBY-D1SspPG.

Com base nos resultados dos crescimentos, as transformantes BBY-D1Ss24 (que melhor consumiu xilose) e BBY-D1Ss37 (consumo intermediário de xilose) foram escolhidas para a realização de ensaios de fermentação em batelada. Em uma observação geral, BBY-D1Ss24 mostrou-se uma linhagem relativamente mais rápida no consumo dos açúcares e na produção de etanol, liderando também com os maiores picos de produção do mesmo. Teve destaque no consumo de xilose (Figura 3b), despertando o interesse para a realização de um estudo mais detalhado para esta levedura. A transformante BBY-D1Ss37 compartilhou algumas características com BBY-D1Ss24, mas foram as suas divergências com esta que colaboraram para a sua escolha. Comparar linhagens diferentes entre si foi uma estratégia para diminuir o risco de estarmos trabalhando com o mesmo inserto e aumentar as nossas chances de encontrar um transportador diferente, com perfil próprio.

4.3 ANÁLISE DAS LEVEDURAS RECOMBINANTES ATRAVÉS DE ENSAIOS FERMENTATIVOS EM BATELADA

Os ensaios fermentativos seguem os mesmos parâmetros dos ensaios de crescimento, entretanto, contam com uma concentração celular inicial maior. Deste modo, podemos ver o comportamento das leveduras em uma escala de tempo menor, onde as respostas a determinadas fontes de carbono se dão de forma mais rápida. Além disso, as fermentações em batelada com alta concentração de células simulam o processo de produção de álcool combustível atualmente em uso no Brasil (SOCCOL *et al.*, 2005; ZANIN *et al.*, 2000). O primeiro ensaio de fermentação em batelada foi realizado com os açúcares xilose e glicose, individualmente, ou com ambos os açúcares juntos (portanto uma co-fermentação). Os resultados obtidos com a linhagem contendo o plasmídeo BBY-D1Ss24 encontram-se na Figura 7.

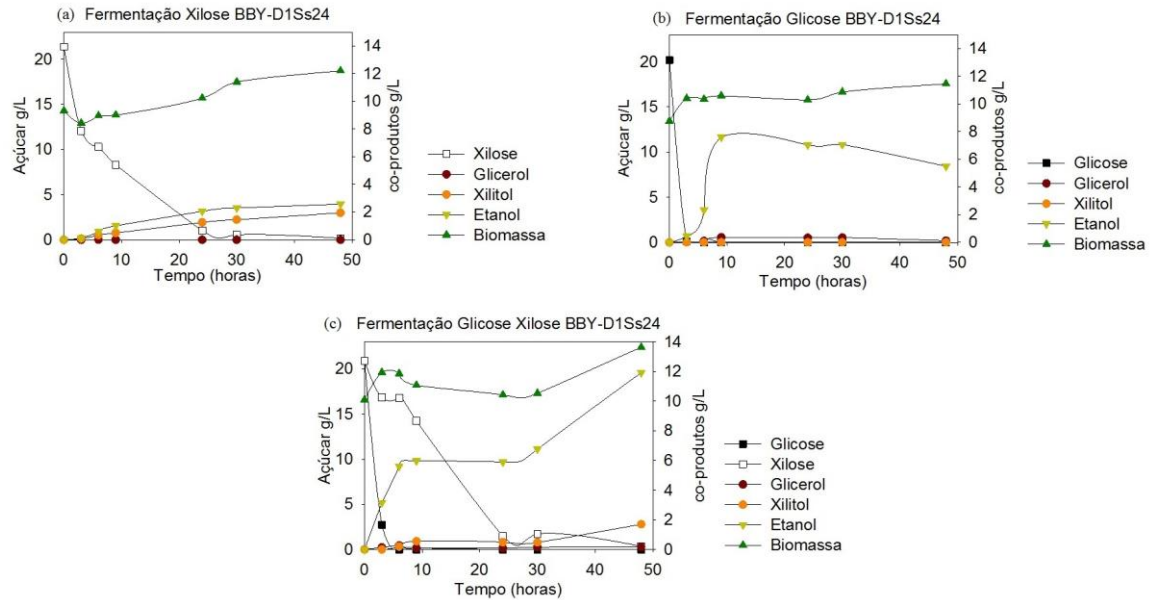


Figura 7. Fermentação em batelada pela linhagem BBY-D1Ss24 em meios contendo 20 g/L de xilose (a), glicose (b), ou glicose mais xilose (c). Os gráficos mostram as curvas de consumo dos açúcares, densidade celular, e produção de etanol, glicerol ou xilitol.

Podemos observar nesta figura que a linhagem BBY-D1Ss24 consome a xilose em aproximadamente 28 horas, produzindo pouco menos de 3 g/L de etanol e 2 g/L xilitol (Figura 7a). Já a fermentação de glicose foi mais rápida (<5 horas), produzindo pouco menos de 8 g/L de etanol (Figura 7b). Quando os dois açúcares são fermentados em conjunto (Figura 7c) a velocidade de consumo dos açúcares não é muito diferente do que o observado para cada um individualmente (Figuras 7a e 7b), mas uma concentração maior de etanol é obtida (12 g/L), indicando que ambos os açúcares estão sendo fermentados. Na Figura 7c é evidente também a formação de dois picos de produção de etanol, o primeiro relativo ao consumo da glicose e o segundo ao consumo da xilose. Tal fato nos permite concluir que a produção de etanol a partir da xilose inicia-se somente quando a glicose já foi consumida do meio.

Os resultados obtidos com a transformante BBY-D1Ss37 podem ser vistos na Figura 8. Esta levedura teve um comportamento distinto uma vez que não produziu etanol a partir da xilose (apenas 5 g/L xilitol, vide Figura 8a), embora consuma este açúcar praticamente no mesmo tempo do que a linhagem BBY-D1Ss24. Durante a co-fermentação de glicose e xilose pela transformante BBY-D1Ss37 verificamos um consumo de xilose mais lento (Figura 8c), sendo que a produção de etanol foi mais lenta e não foi significativamente maior do que a fermentação de apenas glicose (Figura 8b), sendo ainda produzidos 6 g/L de xilitol por esta linhagem, indicando que provavelmente toda a xilose está sendo reduzida a xilitol.

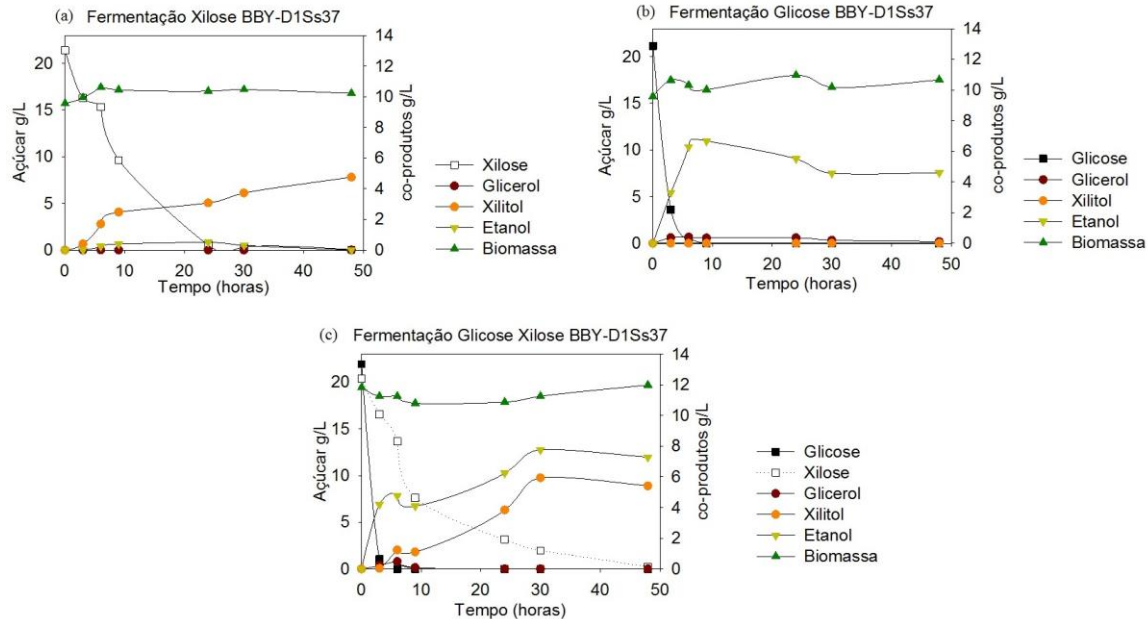


Figura 8. Fermentação em batelada pela linhagem BBY-D1Ss37 em meios contendo 20 g/L de xilose (a), glicose (b), ou glicose mais xilose (c). Os gráficos mostram as curvas de consumo dos açúcares, densidade celular, e produção de etanol, glicerol ou xilitol.

A fim de investigar o comportamento das transformantes BBY-D1Ss24 e BBY-D1Ss37 durante co-fermentações em diferentes fontes de carbono, ambas as linhagens foram inoculadas em meios contendo maltose e glicose (Figura 9), maltose e frutose (Figura 10), ou maltose e xilose (Figura 11). A maltose foi utilizada em todos os meios como controle positivo (todas as linhagens fermentam este açúcar), além de este açúcar normalmente não competir com o transporte de monossacarídeos em *S. cerevisiae* (SUBTIL e BOLES, 2012), enquanto que a linhagem BBY-D1pPGK (transformada com o plasmídeo controle pPGK) foi usada como controle negativo, uma vez que esta linhagem fermenta apenas maltose.

As curvas de consumo de glicose e maltose pelas transformantes BBY-D1Ss24 e BBY-D1Ss37 (Figura 9) são muito semelhantes. Ambas foram muito eficientes no consumo dos açúcares e subsequente produção de etanol, atingindo aproximadamente 17 g/L deste produto, enquanto que a linhagem BBY-D1pPGK produziu metade da quantidade de etanol, condizente com a ausência de consumo de glicose por esta linhagem. Resultados semelhantes foram obtidos durante as co-fermentações de maltose e frutose por estas três linhagens (Figura 10). Finalmente, embora as transformantes BBY-D1Ss24 e BBY-D1Ss37 tenham produzido mais etanol durante as co-fermentações de maltose e xilose do que a linhagem BBY-D1pPGK (Figura 11), a quantidade de etanol produzido foi menor (entre 9 e 10 g/L) do que durante as co-fermentações maltose/glicose ou maltose/frutose (vide Figuras 9 e 10). Curiosamente, durante a co-fermentação de maltose/xilose pela linhagem BBY-D1Ss24 houve significativa produção de glicerol (além do etanol e pouco xilitol), e novamente a linhagem BBY-D1Ss37 produziu mais xilitol (Figura 11).

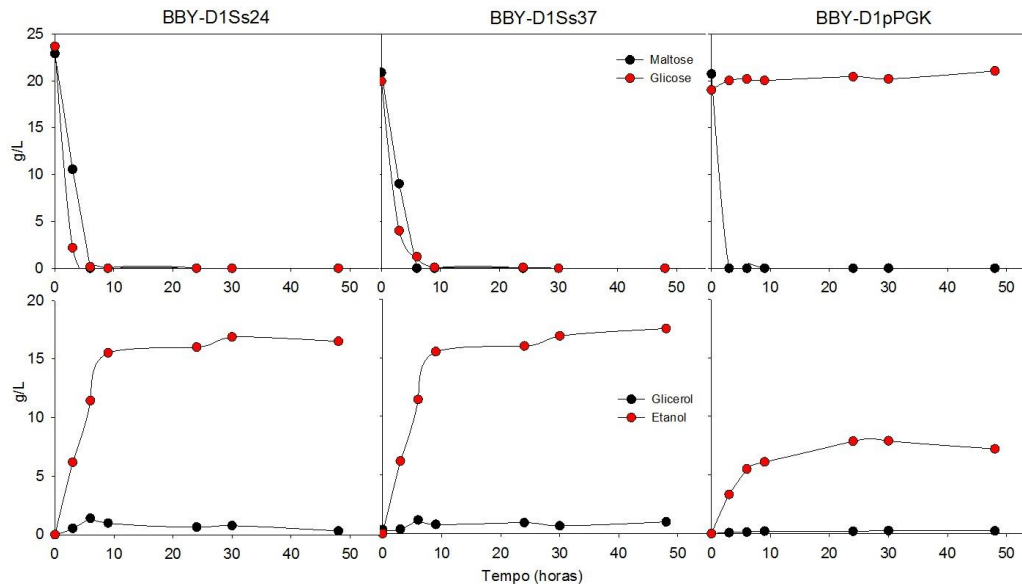


Figura 9. Co-fermentação em batelada de 20 g/L maltose e 20 g/L glicose pelas linhagens BBY-D1Ss24 (painéis à esquerda), BBY-D1Ss37 (painéis centrais) e BBY-D1SspPGK (painéis à direita). Nos painéis superiores estão representadas as curvas de consumo dos açúcares, e no painéis inferiores podemos ver as curvas de produção de etanol e glicerol.

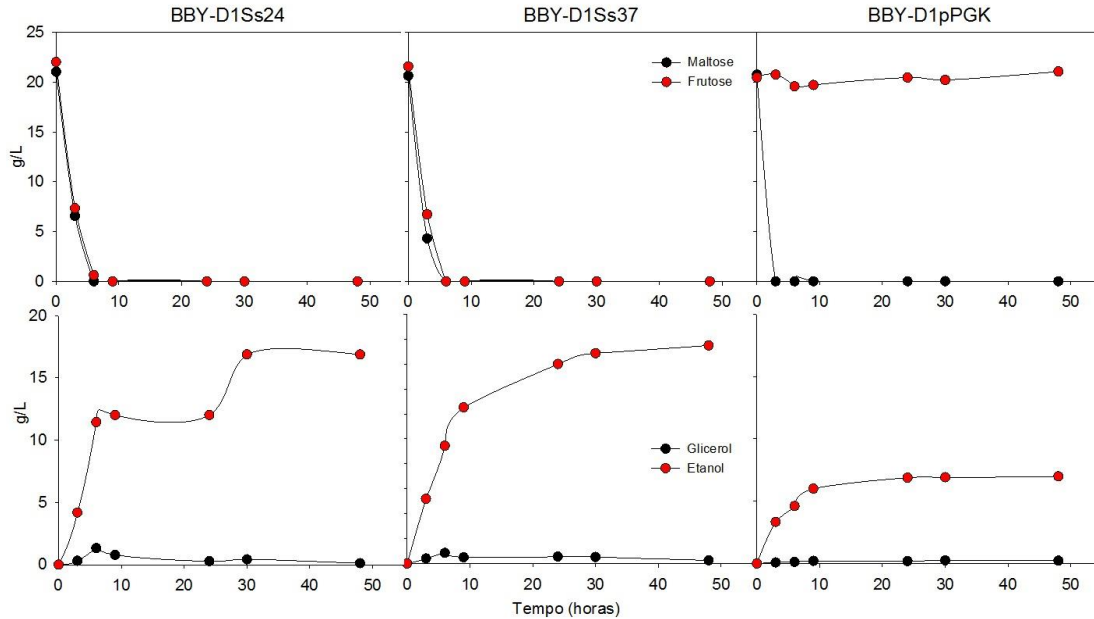


Figura 10. Co-fermentação em batelada de 20 g/L maltose e 20 g/L frutose pelas linhagens BBY-D1Ss24 (painéis à esquerda), BBY-D1Ss37 (painéis centrais) e BBY-D1SpPGK (painéis à direita). Nos painéis superiores estão representadas as curvas de consumo dos açúcares, e no painéis inferiores podemos ver as curvas de produção de etanol e glicerol.

Com a análise dos resultados obtidos no decorrer dos ensaios de fermentação em batelada foi possível observar a preferência de ambas as transformantes pelo consumo da glicose ou frutose. Na presença destes açúcares estas foram capazes de produzir quantidades significativas de etanol, e ainda, a xilose só começou a ser consumida após grande parte da glicose já ter sido retirada do meio. É conhecido da literatura que *S. cerevisiae* recombinantes priorizam a internalização da glicose contida no meio para então iniciarem o consumo da xilose (WEBB e LEE, 1990; SANCHEZ *et al.*, 2002; YABLOCHKOVA *et al.*, 2003). Como um possível motivo para tal, aponta-se uma maior afinidade dos transportadores pela glicose (KÖTTER e CIRIACY, 1993).

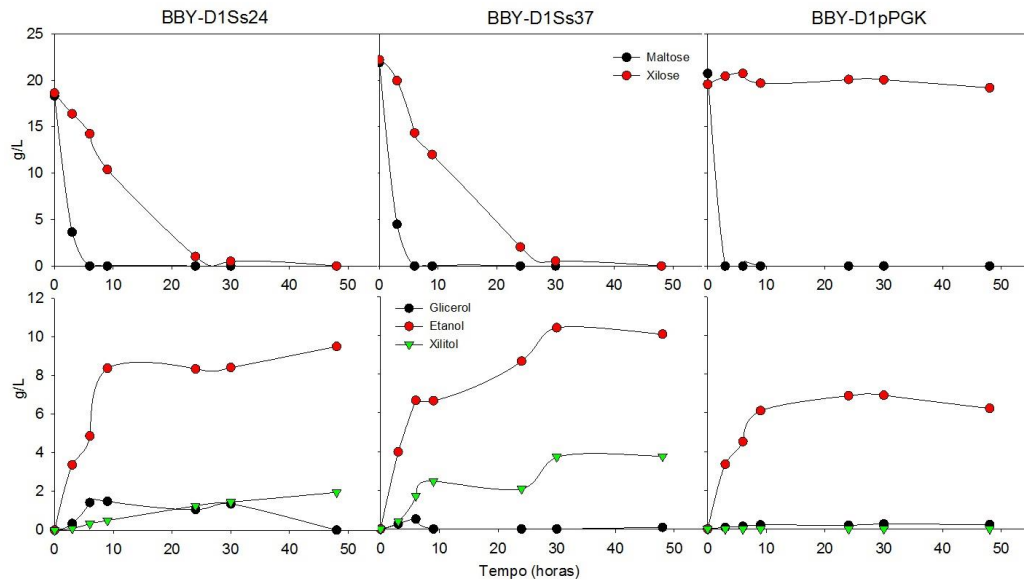


Figura 11. Co-fermentação em batelada de 20 g/L maltose e 20 g/L xilose pelas linhagens BBY-D1Ss24 (painéis à esquerda), BBY-D1Ss37 (painéis centrais) e BBY-D1SpPGK (painéis à direita). Nos painéis superiores estão representadas as curvas de consumo dos açúcares, e no painéis inferiores podemos ver as curvas de produção de etanol e glicerol.

Em um trabalho anterior, Katahira e colaboradores (2008) também realizaram uma co-fermentação de xilose e glicose com transformantes contendo o gene *SUT1* (um transportador de hexoses de difusão facilitada) de *S. stipitis* (WEIERSTALL *et al.*, 1999). Assim como no presente trabalho, seus resultados mostraram uma maior preferência das leveduras recombinantes pela captação da glicose ao invés da xilose. Em outro estudo mais recente, realizado por Young e colaboradores (2011), transformantes com genes provenientes de *S. stipitis* (*XUT1* e *XUT2*) também foram sujeitas a uma co-fermentação de 20 g/L de xilose e 20 g/L de glicose, revelando que estas possuem uma preferência maior pela glicose do que pela xilose. Através destes resultados, Young e colaboradores concluíram que a preferência por glicose e a eficiência do transporte estão ligados, uma vez que em seus experimentos foi possível observar que quanto mais específico é um transportador, mas baixa é sua eficiência. Logo, eficiência e especificidade são inversamente proporcionais, enquanto eficiência e preferência por glicose são diretamente proporcionais. Isso é esperado, uma vez que a ampla eficiência a diferentes substratos é algo evolutivamente vantajoso, tendo em vista que as fontes de carbono disponíveis na natureza são um tanto quanto imprevisíveis. De qualquer forma a glicose é o açúcar mais abundante na natureza e inúmeros organismos preferem este açúcar como fonte de carbono. Evolutivamente é compreensível que os organismos se adaptem à fonte de carbono mais abundante no ambiente e adquiram mecanismos que possibilitem uma metabolização mais eficiente.

Em *S. cerevisiae*, esta preferência pela fermentação de glicose ocasionou inclusive o surgimento do processo conhecido como repressão catabólica por glicose, resultando na *downregulation* de genes responsáveis pelo metabolismo de outros açúcares, incluindo aqueles necessários para utilizar xilose (ROCA *et al.*, 2004). Ainda que *S. stipitis* tenha sido isolada a partir do intestino de besouros digestores de madeira (um ambiente aonde pentoses são abundantes) e possua genes para utilização de xilose (SUH *et al.*, 2005), é possível que parte de seu genoma tenha evoluído para a utilização de glicose (JEFFRIES *et al.*, 2007).

Após a análise dos perfis fermentativos dos transformantes BBY-D1Ss24 e BBY-D1Ss37, objetivou-se a identificação das sequências nucleotídicas inseridas nos plasmídeos clonados na levedura *S. cerevisiae* recombinante. No entanto, por uma série de motivos até a

presente data não foi possível obter uma sequência adequada dos insertos contidos no plasmídeo pPGK destes transformantes. Então, uma forma alternativa de identificar os genes foi realizada: a construção de um mapa de restrição das sequências inseridas nos plasmídeos, e comparação com as sequências do genoma de *S. stipitis* depositadas em banco de dados públicos (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*).

4.4 CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DO MAPA DE RESTRIÇÃO DOS GENES CLONADOS

Para realizar a construção do mapa de restrição, as sequências inseridas nos plasmídeos pPGK-(BBS-D1Ss24) e pPGK-(BBS-D1Ss37) foram amplificadas por PCR como descrito em Materiais e Métodos, gerando (Figura 12) insertos de ~2,5 Kb para o plasmídeo pPGK-(BBS-D1Ss24), e ~3 Kb para pPGK-(BBS-D1Ss37). A seguir estes fragmentos de DNA foram digeridos com uma série de enzimas de restrição (*AccI*, *BmgBI*, *NcoI*, *NotI*, *RsaI*, *XbaI* e *XhoI*), gerando assim diferentes fragmentos cujos tamanhos foram determinados por eletroforese em gel de agarose (Figuras 13 e 14). A seguir, utilizando ferramentas de bioinformática, foi possível realizar uma comparação entre os perfis de corte dos insertos nos plasmídeos das transformantes, e o perfil de corte das sequências de transportadores de açúcares de *S. stipitis* armazenadas no banco de dados.

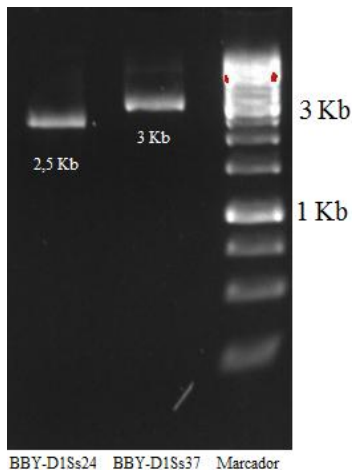


Figura 12. Imagem da eletroforese em gel de 1% agarose mostrando os fragmentos obtidos por PCR a partir dos plasmídeos pPGK-(BBS-D1Ss24) e pPGK-(BBS-D1Ss37).

Através do mapa de restrição, foi possível chegar a uma sequência possível para a permease presente no transformante BBY-D1Ss24 (ANEXO A), relativa a um transportador de açúcar de alta afinidade denominado XUT1 (localizado no cromossomo 6 de *S. stipitis*), conhecido como um eficiente transportador de xilose, embora não exclusivo para este açúcar (JEFFRIES et al., 2007). O gene em questão foi analisado por Young e colaboradores (2011), e a sua expressão em uma *S. cerevisiae* recombinante foi capaz de conferir crescimento em xilose, glicose, frutose, manose e galactose, de acordo com os resultados de microcrescimento apresentados no presente trabalho (Figura 2). Ainda em concordância com a pesquisa de Young e colaboradores (2011), os dados aqui analisados também indicam que na levedura recombinante que apresenta o gene XUT1 a glicose é preferencialmente consumida em relação à xilose. No entanto, estes autores não analisaram a contribuição deste transportador XUT1 para fermentação de xilose por *S. cerevisiae* recombinante.

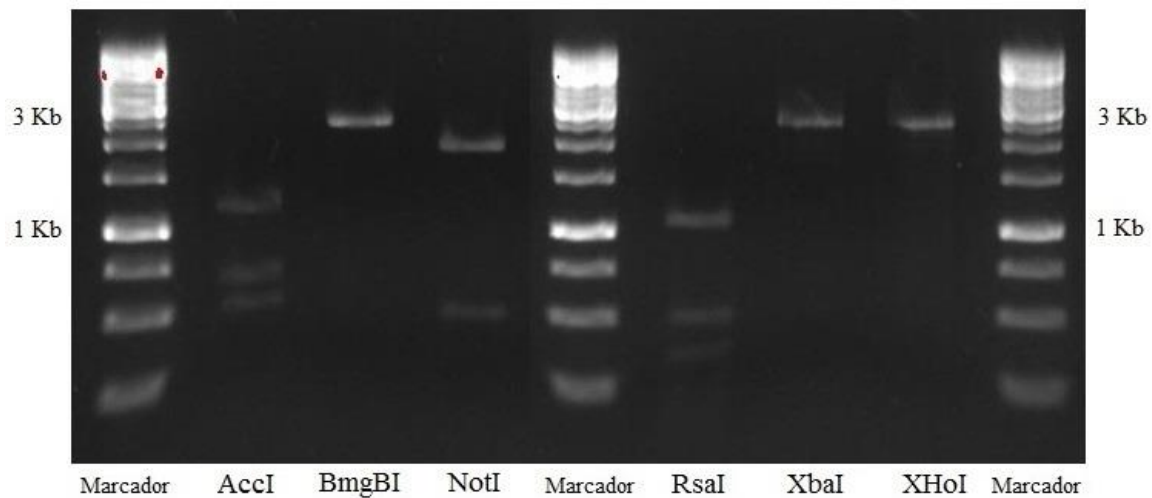


Figura 13. Imagem da eletroforese em gel de 1% agarose mostrando os produtos da digestão do inserto presente na transformante BBY-D1Ss24 com as enzimas *AccI*, *BmgBI*, *NotI*, *RsaI*, *XbaI* e *XhoI*. Apenas *AccI*, *NotI* e *RsaI* hidrolisaram o fragmento.

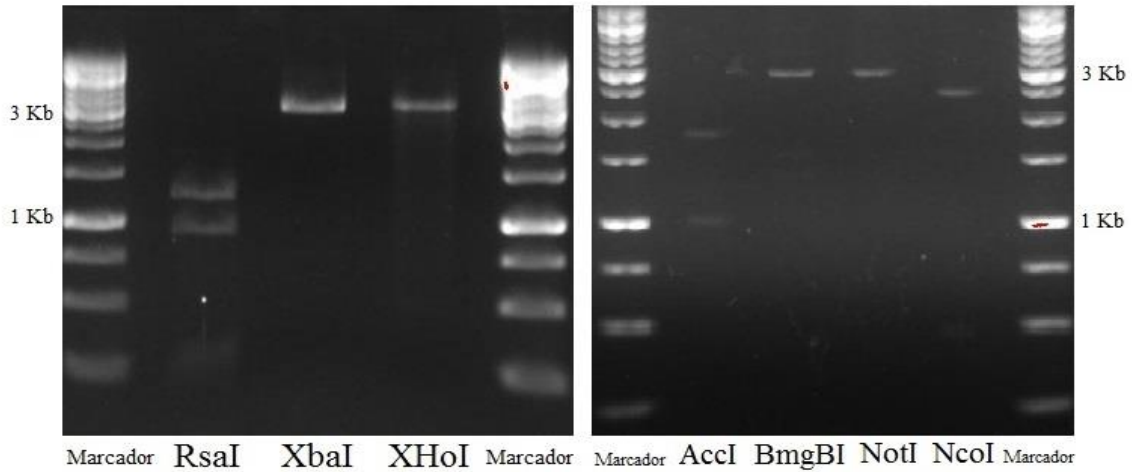


Figura 14. Imagem da eletroforese em gel de 1% agarose mostrando os produtos da digestão do inserto presente na transformante BBY-D1Ss37 com as enzimas *RsaI*, *XbaI*, *XhoI*, *AccI*, *BmgBI*, *NotI*, e *NcoI*. Apenas *RsaI*, *AccI* e *NcoI* hidrolisaram o fragmento.

Através do mapa de restrição, para a transformante BBY-D1Ss37 foi possível chegar a uma sequência possível (ANEXO B), depositada no NCBI como transportador de hexose de alta afinidade (gene chamado *QUP2*), localizado no cromossomo 7 de *S. stipitis* (JEFFRIES *et al.*, 2007). Ao que tudo indica esta foi a primeira vez que este gene foi expresso funcionalmente em *S. cerevisiae*, tendo sido anotada através de análises de similaridade com outros transportadores conhecidos, principalmente de *Debaromyces hansenii*. Embora não seja possível afirmar com certeza a natureza do transportador, nossos dados suportam a ideia de que este é um transportador eficiente para as hexoses glicose e frutose, e capaz de permitir o transporte (mas não fermentação) de xilose. Cabe ressaltar que esperamos em breve confirmar a sequência destes dois genes presentes nos plasmídeos pPGK-(BBS-D1Ss24) e pPGK-(BBS-D1Ss37).

Em outro trabalho recente, Young e colaboradores (2014) foram capazes de identificar um domínio específico presente em transportadores de xilose. Este domínio, caracterizado com a forma genérica de aminoácidos: G-G/F-XXX-G (Glicina-Glicina/Fenilalanina-XXX-Glicina) é capaz de exercer controle sobre a eficiência e seletividade no transporte deste açúcar. Com base nas sequências encontradas no banco de dados para BBY-D1Ss24 e BBY-D1Ss37, e utilizando uma ferramenta de bioinformática capaz de construir modelos virtuais para visualização da provável estrutura transmembrana do transportador (TUSNÁDY e SIMON, 2001), observamos que a estrutura transmembrana encontrada para BBY-D1Ss24 apresentou similaridades com aquela encontrada por Young e colaboradores (2014) como responsável por um transporte eficiente de xilose (Figura 15). A presença deste domínio nesta transformante justificaria a maior eficiência desta no consumo da xilose, quando comparada com BBY-D1Ss37, que aparentemente não exhibe este domínio (dados não mostrados).

MHGGGDGNDI	TEIIAARLQ	IAGKSGVAGL	VANSRSFFIA	VFASL	GGLVY	50
GYNQGMFGQI	SGMYSFSKAI	GVEKIQDNPT	LQGLLSILE	LGAWVGVLMN		100
GYIADRLGRK	KSVVVGVFFF	FIGVIVQAVA	RGGNYDYILG	GRFVVGIGVG		150
ILSMVVPLYN	AEVSPPEIRG	SLVALQQLAI	TFGIMISYWI	TYGTNYIGGT		200
GSGQSKASWL	VPICIQLVPA	LLLGVGIFFM	PESPRWLMNE	DREDECLSVL		250
SNLRSLSKED	TLVQMEFLEM	KAQKLFEREL	SAKYFPHLQD	GSAKSNFLIG		300
FNQYKSMITH	YPTFKRVAVA	CLIMTFQQWT	GVNFILYYAP	FIFSSLGLSG		350
NTISLLASGV	VGIVMFLATI	PAVLWVDRLG	RKPVLISGAI	IMGICHFVVA		400
AILQFGGNF	VNHSGAGWVA	VVFWWIFAIG	FGYSWGPCAW	VLVAEVFPLG		450
LRAKGVSIGA	SSNWLNNFAV	AMSTPDFVAK	AKFGAYIFLG	LMCIFGAAYV		500
QFFCPETKGR	TLEEIDELFG	DTSGTSKMEK	EIHEQKLKEV	GLLQLLGEEN		550
ASESENSKAD	VYHVEK					566

Figura 15. Sequência de aminoácidos do gene *XUT1* de *S. stipitis*, que possivelmente corresponde à permease presente na transformante BBY-D1Ss24. A região demarcada evidencia a presença do domínio G-G/F-XXX-G na sequência.

A Figura 16 mostra um filograma dos transportadores possivelmente inseridos em BBY-D1Ss24 e BBY-D1Ss37, junto com outros transportadores de hexoses presentes no genoma de *S. stipitis*. O programa utilizado para a montagem deste filograma foi o Clustal Omega do EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute*), como descrito por SIEVERS e colaboradores (2011). É possível verificar que o gene *XUT1*, permease que permite uma fermentação mais eficiente de xilose, encontra-se relativamente distante do gene possivelmente inserido no plasmídeo pPGK-(BBY-D1Ss37), bem como de outras permeases (*SUT1-SUT4*) já caracterizadas como transportadores de hexoses nesta levedura (WEIERSTALL *et al.*, 1999).

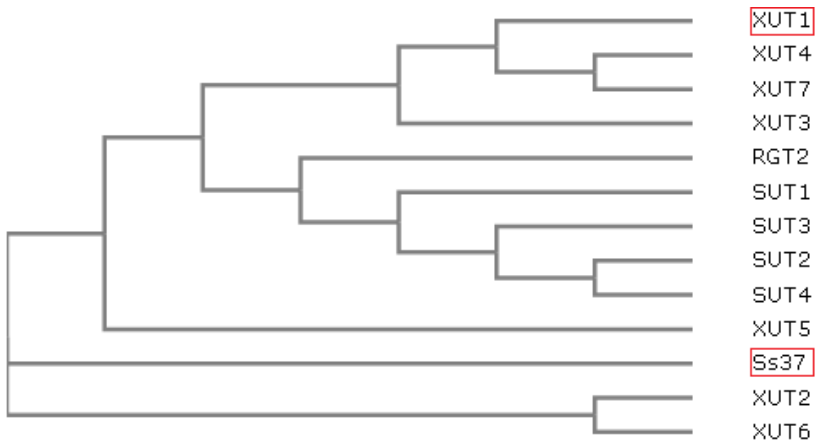


Figura 16. Filograma mostrando a relação entre os transportadores possivelmente encontrados nas transformantes BBY-D1Ss24 (*XUT1*) e BBY-D1Ss37 (*Ss37*, ou gene *QUP2*), com outros transportadores de hexoses de *S. stipitis*.

5 CONCLUSÕES

- A utilização de uma biblioteca genômica foi uma alternativa válida para o rastreamento de um fenótipo desejável (fermentação de xilose) em leveduras *S. cerevisiae* recombinantes. Embora a intenção inicial de encontrar uma cepa capaz de internalizar somente a xilose não foi atingida, foi possível identificar transportadores com afinidade para diversos açúcares, característica que pode ser mais explorada em outras linhas de pesquisa.
- As possíveis sequências encontradas no banco de dados para os insertos das leveduras recombinantes revelaram a possibilidade de estarmos trabalhando com o já conhecido transportador de açúcar de alta afinidade, codificado por XUT1 (transformante BBY-D1Ss24), e um suposto transportador de hexoses de alta afinidade (QUP2) presente na transformante BBY-D1Ss37. Os dados obtidos nos ensaios de crescimento e fermentação suportam esta hipótese.
- A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante mais eficiente na fermentação da xilose foi BBY-D1Ss24. Métodos de bioinformática foram capazes de traçar uma similaridade entre a estrutura transmembrana do transportador de BBY-D1Ss24 e a estrutura de eficientes transportadores de xilose recentemente descritos na literatura.

6 REFERÊNCIAS

BATT, C.A.; CARVALLO, S; EASSON, D.D; AKEDO, M; SINSKEY, A.J. Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, n. 4, p. 549–553, 1986.

BLOOMBERG NEW ENERGY FINANCE. Moving Towards a Next-Generation Ethanol Economy. Disponível: <<https://cleanenergysolutions.org/content/moving-towards-next-generation-ethanol-economy>> Acesso em julho de 2012.

CADETE, R.M.; SANTOS, R.O.; MELO, M.A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D.L.; STAMBUK, B.U.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 1-5, 2009.

CHANDEL, A.K; CHANDRASEKHAR, G.; RADHIKA, K.; RAVINDER, R.; RAVINDRA, P. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: a review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. 1, p. 8-20, 2011.

DE HOLLANDA, B. J.; POOLE, A. D. Sugar cane as an energy source in Brazil. Rio de Janeiro, Brazil: **Instituto Nacional de Eficiência Energética (INEE)**, 2001.

DOES, A.L.; BISSON L.F. Characterization of xylose uptake in the yeasts *Pichia heudie* and *Pichia stipitis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 159-164, 1989.

DU PREEZ, J.C.; BOSCH, M.; PRIOR, B.A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 6, p. 360-364, 1986.

DU PREEZ, J.C.; VAN DRIESSEL, B.; PRIOR, B.A. Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at

controlled low dissolved oxygen levels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 53-58, 1989.

DU, J.; LI, S.; ZHAO, H. Discovery and characterization of novel D-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitsi*. **Molecular Biosystems**, v. 6, n. 11, p. 2150–2156, 2010.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA - EPE. **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis**, 2011. Disponível em: <
<http://www.epe.gov.br/Petroleo/Paginas/PaineldeBiocombust%C3%ADveis%E2%80%93Boletinsdean%C3%A1lisedeconjuntura.aspx?CategoriaID=>> Acesso em setembro de 2012.

FERNANDES, D.L.A.; PEREIRA, S.R.; SERAFIM, L.S.; EVTUGUIN, D.V.; XAVIER, A.M.R.B. Second Generation Bioethanol from Lignocellulosics: Processing of Hardwood Sulphite Spent Liquor. **Bioethanol**, cap.6, 2012.

GARDONYI, M.; JEPPSSON, M.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Control of xylose consumption by xylose transport in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 7, p. 818-824, 2003.

GIETZ, R.D.; WOODS, R.A. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Methods in Molecular Biology**, v. 313, p. 107–120, 2006.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 6, p. 1-7, 2008.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOGG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n. 11, p. 933-943, 1994.

HAHN-HÄGERDAL, B.; WAHLBOM, C.F.; GARDONYI, M. van ZYL, W.H.; OTERO, R.R.C.; JONSSON, L.J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 73, p. 53-84, 2001.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.

HECTOR R.E.; QURESHI, N.; HUGHES, S.R.; COTTA, M.A. Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 4, p. 675-684, 2008.

HENDERSON, P.J.F. The 12-transmembrane-helix transporters. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 5, n. 4, p. 708-721, 1993.

HO, N.W.Y.; CHEN, Z.; BRAINARD, A. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective co-fermentation of both glucose and xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1852-1859, 1998.

HO, N.W.Y.; CHEN, Z.; BRAINARD, A.P.; SEDLAK, M. Successful design and development of genetically engineered *Saccharomyces* yeast for effective co-fermentation of glucose and xylose from cellulosic biomass to fuel ethanol. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 65, p. 163-192, 1999.

HO, N.W.Y.; CHEN, Z.; BRAINARD, A.P.; SEDLAK, M. Genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* yeasts for conversion of cellulosic biomass to environmentally friendly transportation fuel ethanol. ACS Symposium Series 767. **Am. Chem. Soc.**: New York; p. 142-159, 2000.

JEFFRIES, T.W.; SHI, N.Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 65, p. 117-161, 1999.

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

JEFFRIES, T.W.; GIRGORIEV, I.V.; GREENWOOD, J.; LAPLAZA, J.M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.;

DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y.S.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 319-326, 2007.

JEFFRIES, T.W.; VAN FLEET, J. R.H. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 6, p. 793-807, 2009.

JIN, Y.S; ALPER, H; YANG Y.T; STEPHANOPOULOS, G. Improvement of xylose uptake and ethanol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through an inverse metabolic engineering approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 8249-8256, 2005.

KAMIMURA, A.; SAUER, I. L. The effect of flex fuel vehicles in the Brazilian light road transportation, **Energy Policy**, v. 36, p. 1574-1576, 2008.

KANG, Y.S.; KANE, J.; KURJAN, J.; STADEL, J.M.; TIPPER, D.J. Effects of expression of mammalian G alpha and hybrid mammalian-yeast G alpha proteins on the yeast pheromone response signal transduction pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 6, p. 2582-2590, 1990.

KATAHIRA, S.; ITO, M.; TAKEMA, H.; FUJITA, T.; TANINO, T.; TANAKA, T.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter Sut1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 115–119, 2008.

KILIAN, S.G.; VAN UDEN, N. Transport of xylose and glucose in the xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biothechnology**, v. 27, p. 545-548, 1988.

KIM, S.R.; HA, S.J.; KONG, I.I.; JIN, Y.S. High expression of XYL2 coding for xylitol dehydrogenase is necessary for efficient xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 4, p. 336-343, 2012.

KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 776-783, 1993.

KRUCKEBERG, A.L.; YE, L.; BERDEN, J.A.; van DAM, K. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. **Biochemistry Journal**, v. 399, p. 299-307, 1999.

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

MATSUSHIKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Expression of protein engineered NADP+-dependent xylitol dehydrogenase increase ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 1, p. 243–255, 2008.

MESELSON, M.; YAN, R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. **Nature**, v. 217, p. 1110-1114, 1968.

MILANEZ, A. Y.; NYKO, D.; GARCIA, J.L.F.; REIS, B.L.S. O déficit de produção de etanol no Brasil entre 2012 e 2015: determinantes, consequências e sugestões de política. **BNDES Setorial**, v.35, p. 277-302, 2012.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA; **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**. Ed. 68, Setembro/2013.

NGUYEN, N.H.; SUH, S.O.; MARSHALL, C.J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p. 1232-1241, 2006.

NIGAM, J.N. Ethanol production from wheat straw hemicelluloses by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17-27, 2001.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 34–50, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PASHA, C.; KUHAD, R.C.; VENKATESWAR, L.R. Strain improvement of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3 strain for better utilization of lignocellulosic substrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1480-1489, 2007.

ROCA, C.; HAACK, M.B.; OLSSON, L. Engineering of carbon catabolite repression in recombinant xilose fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p.578-583, 2004.

ROSILLO-CALLE, F., CORTEZ L.A.B. Towards ProAlcool II - A review of the Brazilian bioethanol programme. **Biomass and Bioenergy**, v.14, n. 2, p. 115-124, 1998.

RUNQUIST, D.; FONSECA, C.; RADSTROM, P.; SPENCER-MARTINS, I.; HAHN-HAGERDÄL, B. Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 123-130, 2009.

RUNQUIST, D.; HAHN-HAGERDÄL, B.; RADSTROM, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 5, 2010.

RYABOVA, O.B.; CHMIL, O.M.; SIBIRNY, A.A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic

yeast *Hansenula polymorpha*. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 157–164, 2003.

SALOHEIMO, A.; RAUTA, J.; STASYK, O.V.; SIBIRNY, A.A.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 1041–1052, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press. 2001.

SANCHEZ, S.; BRAVO, V.; CASTRO, E.; MOYA, A.J.; CAMACHO, F. The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 641–648, 2002.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.G.; GIBSON, T.J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAN, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n.1, 2011.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; COSTA, B.; WOICEICHOWSK, A.L.; CARVALHO, J.C.; MEDEIROS, A.B.P.; FRANCISCO, A.M.; BONOMI, L.J. Brazilian biofuel program: an overview. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, p. 897-904, 2005.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.S.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRAR, M.A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v.101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

STAMBUK, B.U.; FRANDEN, M.A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*.

Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 105-108, p. 255-263, 2003.

SUBTIL, T.; BOLES, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 14, p. 1-12, 2012.

SUH S-O.; McHUGH, J. V.; POLLOCK, D. D.; BLACKWELL, M. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycology Research**, v. 109, p. 261-265, 2005.

TANTIRUNGKIJ, M.; NAKASHIMA, N.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 83-88, 1993.

TAVARES, J.N.; DUARTE, L.C.; AMARAL-COLLAÇO, M.T.; GÍRIO, F.M. The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9-10, p. 743-747, 2000.

TOIVOLA, A.; YARROW, D.; VAN DEN BOSCH, E.; VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1221-1223, 1984.

TUSNÁDY G.E.; SIMON, I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. **Bioinformatics**, v. 17, n. 9, p. 849-850, 2001.

WATANABE, T.; WATANABE, I.; YAMAMOTO, Y.; ANDO, A.; NAKAMURA, T. A UV-induce mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1844-1848, 2011.

WEBB, S.R.; LEE, H. Regulation of the D-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. **Biotechnology Advances**, v. 8, n. 4, p. 685-697, 1990.

WEIERSTALL, T.; HOLLENBERG, C.P.; BOLES, E. Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. **Molecular Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 871-883, 1999.

YABLOCHKOVA, E.N.; BOLOTNIKOVA, O.I.; MIKHAILOVA, N.P.; GINAK, A.I. Specific features of fermentation of D-Xylose and D-Glucose by xylose-assimilating yeasts. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 302-306, 2003.

YOUNG, M.E.; LEE, S.M; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biothecnology for Biofuels**, v.3, n.4, p.24, 2010.

YOUNG, M.E.; COMER, A.D.; HUANG, H.; ALPER, H.S. A molecular transporter engineering approach to improving xylose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, p. 401-411, 2012.

YOUNG, M.E; TONG, A.; BUI, H.; SPOFFORD, C.; ALPER, H. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unites States of America**, v. 111, n. 1, p. 131-136, 2014.

ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BON E.P.S.; GIORDANO, R.C.L.; DE MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; CARVALHO NETO, C.C.; MACEDO, I.C.; FO, D.L.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 1147-1161, 2000.

ANEXO A – Sequência nucleotídica referente ao transportador possivelmente inserido no transformante BBY-D1Ss24

XUT1 sugar transporter, high affinity, putative [*Scheffersomyces stipitis* CBS 6054]

NCBI Reference Sequence: XM_001385546.1

1 atgcacggtg gtggtagcgg taacgatata acagaaatta ttgcagccag acgtctccag
 61 atcgctgga agtctgggtg ggctggttta gtcgcaaact caagatcttt cttcatcgca
 121 gtctttgcat ctctgggtgg attggtctac ggttacaate aaggtatgt cggtcaaatt
 181 tccggtatgt atcattctc caaagctatt ggtgttgaaa agattcaaga caatcctact
 241 ttgcaaggtt tgtgacttc tattctttaa ctggtgcct gggttggtgt ctgatgaac
 301 ggttacattg ctgatagatt gggtcgtaag aagtcagttg ttgctgggtg tttctcttc
 361 ttcatcggtg tcattgtaca agctgttgct cgtgggtgta actacgacta catcttaggt
 421 ggtagatttg tcgtcgggat tgggtgggtt attcttctta tggttgtgcc atgtacaat
 481 gctgaagttt cccaccaga aattcgtggt tcttgggtg ctttgaaca attggctatt
 541 acttccgga ttatgatttc tttactggat acctaccgga ccaactacat tgggtgact
 601 ggcctcggtc aaagtaaagc ttctgggtg gttcctattt gttaccaatt ggtccagct
 661 ttgctcttgg gtgttggtat cttctcatg cctgagtctc caagatgggt gatgaacgaa
 721 gacagagaag acgaatggtt gtccgttctt tccaactgac gttccttgag taaggaagat
 781 actctgttc aaatggaatt cttgaaatg aaggcacaaa agttgttcca aagagaactt
 841 tctgcaaagt acttccctca cctccaagac ggttctgcca agagcaactt ctgattggt
 901 tcaaccaat acaagtccat gattactcac tacccaacct tcaagcgtgt tgcagttgcc
 961 tgtttaatta tgacctcca acaatggact ggtgttaact tcactctgta ctatgctcca
 1021 ttactctca gttcttagg tttgtctgga aacaccattt ctcttttagc ttctgggtt
 1081 gtcggtatcg tcatttctct tgctaccatt ccagctgttc ttgggtcga cagacttgg
 1141 agaaagccag ttttgatttc cggtgccatt atcatgggta tttgctactt tgttgggt
 1201 gcaatcttag gtcagttcgg tggtaacttt gtaaccact ccggtgctgg ttgggtgct
 1261 gttgtcttcg ttggatttt cgtatcgggt ttcggttact ctgggggtcc atgtcttgg
 1321 gtcttgttg ccgaagtctt cccattgggt ttgcgtgcta aggggttttc tatcggtgcc
 1381 tcttctaact ggttgaacaa ctctcgtgct gccatgtcta cccagattt tgttctgaag

1441 gctaagttcg gtgcttacat ttcttaggt ttgatgtga tttcgggtc cgcatacgt
1501 caattctct gtccagaac taagggtcgt accttgaag aaattgatga actttcgg
1561 gacacctctg gtactccaa gatggaaaag gaaatccatg agcaaaagct
taaggaagt
1621 ggtttgctc aattgctcgg tgaagaaat gcttctgaat ccgaaaacag caaggctgat
1681 gtctaccag ttgaaaata a

ANEXO B – Sequência nucleotídica referente ao transportador possivelmente inserido no transformante BBY-D1Ss37

QUP-2 high-affinity hexose (glucose) transporter [*Scheffersomyces stipitis* CBS 6054]

NCBI Reference Sequence: XM_001386049.1

1 atggttggtg tagcacttac agctgcggtt gcagccgta ttattggcta tgatgctgga
 61 tttgttgag gtacagtgc ttggagtct tccaggacg agtcaacat gccagcatg
 121 actgcgaaag aaaggtccaa tataagtgcg aatgtagtct ctgtattca agctggtgcc
 181 ttctgggggtg ccatttttt ctaccctatc ggagagctcc ttggctgtaa gattggattg
 241 tgtttgtctg ggtcttttt gacttttgg gcagccattt cactctactc caagagctcg
 301 actggtttgg gtgcaattta cgcaggtaga gtcttgacag gcattggaat tgggtgatg
 361 tccggttag cgcctatcta cattagtga agttctccag cattgattag aggaaaattg
 421 gtaggaatgt gggaaatgc gtggcaagta ggtggagtcg taggctactg gatcaattat
 481 ggagtgttac aaaacatccc tgattccaga aaacaatgac taattccttt tgccatacag
 541 ttggttcctt caggtatggt ttggccgga tcttcttga tceccagtc acctcgatt
 601 ttggttcaca ggggacaaat ggagcaggca agaagaacc ttctttcct tagaatcctc
 661 cctgtagatc accttattc catacacgaa atggaaaaca tagtcaagga tatcaacgac
 721 aaaaaggcca agctcgggag cgatggattc ttgctccat tcaagaaggt ttgagttcc
 781 aagaaaattc tctaccgtt gctttgacg acctcccttt tcccatgca aaatgggtct
 841 ggtatcaatg ccataacgta ttacttcca actgtattca aatcttttgg tategacgca
 901 accaaagctg gtttgcaatc tacaggggctc ttggcttgc ttaaggcttt tgcttctttg
 961 gtctggttat tcctgtcgt cgacagatc ggcagaaga cggccttgt gtggggatc
 1021 gttccgtget ctctttgat gtggtatatt ggtgcttatg taaaattgc caacctcgg
 1081 cagagagtgg ccaatggtaa cactaccaa gatgctggtg gaaaggcagc
 tcaagccatg
 1141 ttgtacatct ggacgttgt ttaccggact tcttgaacg gtactccctg ggtgttcaac
 1201 tcagaagtat ttcccagga agtgagaact ttgactcaag ctatcaatgc ttctgctaac
 1261 tggttctggg ccttcgttat gggcagatgg tcaggccaag cattggatgc aattggatac

1321 aaattctact tcattttgc tacatgatg atagtattcc ctgttgtaat tctctgttg
1381 taccctgaga ctaaggagg tccattggaa gccattgact acttgttga agtcccgc
1441 tggagagcaa gaaagcatgc catggagcaa tacagaatcg aatacga
tggtccaag
1501 gtaaacgaga tgttgccat tgattcggat tctcagaaa aggagcgggg gcgttctga
1561 gaagaatcaa atgagtag