

Angela Alves dos Santos

**DESENVOLVIMENTO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE COMO PLATAFORMAS DE
ANÁLISE DE ENZIMAS E TRANSPORTADORES
ENVOLVIDOS NA METABOLIZAÇÃO DE XILOSE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Professor Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk.

Florianópolis

2017

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

Santos, Angela Alves dos

DESENVOLVIMENTO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE COMO PLATAFORMAS DE ANÁLISE DE
ENZIMAS E TRANSPORTADORES ENVOLVIDOS NA METABOLIZAÇÃO DE
XILOSE / Angela Alves dos Santos ; orientador, Boris Juan
Carlos Ugarte Stambuk - Florianópolis, SC, 2017.

127 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

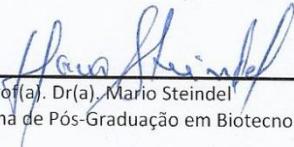
1. Biotecnologia e Biociências. 2. XKS1. . 3. PHO13. .
4. Saccharomyces cerevisiae. . 5. Xilose. I. Stambuk,
Boris Juan Carlos Ugarte . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências. III. Título.

**“Desenvolvimento de linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*
como plataforma de análise de enzimas e transportadores envolvidos na
metabolização de xilose”**

Por

Angela Alves dos Santos

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da
Banca Examinadora (01/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências - UFSC.

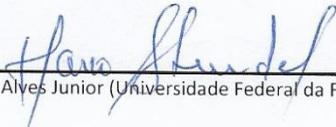


Prof(a). Dr(a). Mario Steindel

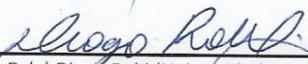
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora: -

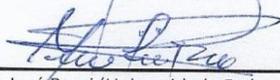

Dr(a) Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk (Universidade Federal da Fronteira Sul)
Orientador(a)



Dr(a) Sérgio Luiz Alves Junior (Universidade Federal da Fronteira Sul)



Dr(a) Diogo Robi (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Márcio José Rossi (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2017.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida.

Ao Prof. Dr. Boris Stambuk pela orientação, pela confiança, pela paciência, por todos os ensinamentos repassados e por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Sérgio A. Júnior por toda a ajuda de sempre e por ter me apresentado à pesquisa ainda na graduação. Foi através de suas aulas e de sua orientação na iniciação científica que tomei gosto pela vida acadêmica e, sobretudo, pela bioquímica de leveduras.

Ao colega e amigo Junior R. Deoti pela parceria desde a iniciação científica até o mestrado. Tenho certeza que ainda vamos trabalhar juntos novamente.

À Dra. Adriane Mouro pelo auxílio em grande parte da minha pesquisa, principalmente no início onde a biologia molecular ainda era novidade para mim.

Aos laboratórios de Defesas Celulares e de Bioquímica de Insetos pelo auxílio no uso de equipamentos e reagentes.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite.

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras Wallace, Marília, Eduardo, Leonardo, Bruna, Cristina, Gabi K., Gabriela e Daniele pela amizade, pelos dias sempre alegres na nossa “salinha” do laboratório, pelos bate-papos nos bares e pelas praias nos fins de semana. Vocês foram essenciais.

A todos os meus amigos, em especial à Jaqueline, à Ana Arins, à Juliana, à Caroline, à Suellen e à Alejandra (querida “paraguaia”) pela amizade sincera e pelo apoio nos momentos difíceis.

À Tainá pelo amor, pela amizade, pelo companheirismo e, principalmente, pela força em todos os momentos.

Às minhas irmãs Angélica e Márcia, aos meus cunhados Renato e Fabiano e às minhas sobrinhas Manuella, Mariana e Nathália pelo amor, pelo carinho, pelo apoio e pela família maravilhosa que são.

Aos meus pais pela educação, pelo amor incondicional, pelo apoio e pelo carinho. Vocês são demais!

Aos meus tios, primos e padrinhos pelo apoio e pelo carinho.

À UFSC e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências pela oportunidade.

Ao CNPq e à CAPES pela bolsa de mestrado e financiamento do projeto.

RESUMO

A produção de etanol de segunda geração depende muito da fermentação da xilose, o segundo açúcar mais abundante nos hidrolisados lignocelulósicos, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Mas essa levedura é incapaz de fermentar essa pentose, uma vez que não dispõe de enzimas e transportadores eficientes para a sua metabolização. Assim, é importante identificar enzimas e transportadores de xilose de diferentes organismos para a expressão em células de *S. cerevisiae*. Contudo, pesquisadores têm demonstrado que essa levedura requer modificações genéticas adicionais para uma efetiva fermentação de xilose; entre elas, a sobre-expressão do gene *XKSI* (que codifica a xilulocinase) e a deleção do gene *PHO13* (que codifica uma fosfatase alcalina) melhoram a fermentação de xilose em linhagens recombinantes. Assim sendo, o presente trabalho se propôs a desenvolver linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes por meio da sobre-expressão do gene *XKSI* e/ou deleção do gene *PHO13*, com o intuito de que essas linhagens possam ser utilizadas como plataformas para a análise de enzimas e transportadores heterólogos envolvidos no metabolismo da xilose. Primeiramente, foi construída a linhagem ASY-1, com a finalidade de servir como plataforma para testes de enzimas heterólogas, já que esta linhagem foi obtida a partir da sobre-expressão do gene *XKSI* na linhagem *wild-type* CEN.PK2-1C. A seguir, foi construída a linhagem ASY-2, a partir da deleção do gene *PHO13* na linhagem ASY-1. As linhagens CEN.PK2-1C, ASY-1 e ASY-2 foram transformadas com plasmídeos contendo genes que codificam as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase provenientes das leveduras *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum*, respectivamente, e a performance fermentativa das linhagens transformantes foi avaliada. Nossos resultados mostram que a sobre-expressão do gene *XKSI* foi necessária para haver consumo de xilose em crescimentos aeróbios e para a produção de etanol a partir dessa pentose em fermentações microaeróbias, indicando que essa sobre-expressão é crucial para o metabolismo da xilose em *S. cerevisiae*. A deleção do gene *PHO13* permitiu um consumo mais rápido e maior da xilose, tanto em crescimentos aeróbios quanto em fermentações microaeróbias, além de ter aumentado a produção de xilitol e alterado a produção de glicerol em todos os ensaios. Ainda, os efeitos vantajosos causados pela deleção do gene *PHO13* no consumo de xilose e na produção de etanol se mostraram mais evidentes em meios contendo alta concentração (100 g.L⁻¹) de xilose. Paralelamente, contruímos também a

linhagem ASY-3, com a finalidade de servir como plataforma para testes de transportadores heterólogos, sendo que esta linhagem foi construída a partir da deleção do gene *PHO13* na linhagem DLG-K1, uma linhagem *hxt*-null (*hxt1-hxt7* e *gal2*) que possui os genes necessários à metabolização de xilose sobre-expressos mas incapaz de transportar monossacarídeos. As linhagens DLG-K1 e ASY-3 foram transformadas com plasmídeos contendo genes que codificam os transportadores Sut4 e Xut1 provenientes das leveduras *Spathaspora arborariae* e *Scheffersomyces stipitis*, respectivamente, e a performance fermentativa das linhagens transformantes foi avaliada. Em ensaios de crescimento aeróbios, nossos resultados mostraram que a deleção do gene *PHO13* permitiu consumo mais rápido e maior da xilose, além de maior produção de etanol. No entanto, em fermentações microaeróbias, não houve diferença no consumo de xilose entre as linhagens contendo ou não o gene *PHO13* e expressando os transportadores heterólogos. A deleção do gene *PHO13* também alterou a produção de glicerol pelas cepas em todos os ensaios fermentativos realizados utilizando transportadores heterólogos. Portanto, as linhagens recombinantes desenvolvidas constituem importantes ferramentas para a clonagem e identificação de novos genes envolvidos no transporte e fermentação de xilose por *S. cerevisiae*.

Palavras-chave: *XKS1*. *PHO13*. *Saccharomyces cerevisiae*. Xilose. Etanol 2G.

ABSTRACT

Second-generation ethanol production depends greatly on the xylose fermentation, the second most abundant sugar in the lignocellulosic hydrolysates, by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. But this yeast is incapable of fermenting this pentose, since it does not have efficient enzymes and transporters for its metabolization. Therefore, it is important to identify xylose enzymes and transporters of different organisms for the expression in *S. cerevisiae* cells. However, researchers have shown that this yeast requires additional genetic modifications for an effective xylose fermentation; among them, *XKS1* gene (which encodes xylulokinase) overexpression and *PHO13* gene (encoding alkaline phosphatase) deletion to improve xylose fermentation in recombinant strains. Thus, the present work aimed to develop recombinant *S. cerevisiae* strains by *XKS1* gene overexpression and/or *PHO13* gene deletion, so that these strains could be used as platforms for the analysis of enzymes and transporters involved in xylose metabolism. Firstly, the ASY-1 lineage was constructed to serve as a platform for heterologous enzyme tests, since this lineage was obtained from the *XKS1* gene overexpression in the wild-type strain CEN.PK2-1C. The ASY-2 yeast was then constructed by *PHO13* gene deletion in the ASY-1 strain. The CEN.PK2-1C, ASY-1 and ASY-2 strains were transformed with plasmids containing genes for xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Spathaspora arborariae* and *Spathaspora passalidarum* yeasts, respectively, and the fermentative performance of transformants was evaluated. Our results show that *XKS1* gene overexpression was required for xylose consumption in aerobic growths and for ethanol production from this pentose in microaerobic fermentations, indicating that this overexpression is crucial for xylose metabolism in *S. cerevisiae*. *PHO13* gene deletion allowed a faster and greater xylose consumption, both in aerobic growth and microaerobic fermentations, in addition to increasing the production of xylitol and altering the production of glycerol in all the assays. Furthermore, the advantageous effects caused by *PHO13* gene deletion on xylose consumption and ethanol production were more evident in media containing high xylose concentrations ($100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). At the same time, we also built the ASY-3 lineage, in order to serve as a platform for heterologous transporter tests. This strain was constructed by the *PHO13* gene deletion in the DLG-K1 strain, a *hxt*-null yeast (*hxt1-hxt7* and *gal2*) which has the genes necessary for xylose metabolization overexpressed, but incapable of transporting monosaccharides. The

DLG-K1 and ASY-3 yeast were transformed with plasmids containing genes encoding the Sut4 and Xut1 transporters from *Spathaspora arborariae* and *Scheffersomyces stipitis* yeasts, respectively, and the fermentative performance of the transformants was evaluated. In aerobic growth assays, our results showed that *PHO13* gene deletion allowed for faster and greater xylose consumption, in addition to higher ethanol production. However, in microaerobic fermentations, there was no difference in xylose consumption between strains containing or not the *PHO13* gene and expressing the heterologous transporters. *PHO13* gene deletion also altered glycerol production by the strains in all fermentative assays performed using heterologous transporters. Thus, the developed recombinant strains are an important tool for cloning and identification of new genes involved in xylose transport and fermentation by *S. cerevisiae*.

Keywords: *XKS1*. *PHO13*. *Saccharomyces cerevisiae*. Xylose. Ethanol
2G

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar..... | 21 |
| Figura 2 – Vias metabólicas iniciais para a utilização da xilose. | 28 |
| Figura 3 – Visão geral da via de assimilação da xilose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante. | 29 |
| Figura 4 – Construção do Módulo de Sobre-expressão..... | 47 |
| Figura 5 – Construção do Módulo de Deleção..... | 48 |
| Figura 6 – Sobre-expressão do gene <i>XKS1</i> | 51 |
| Figura 7 – Deleção do gene <i>PHO13</i> | 52 |
| Figura 8 – Confirmação da construção genômica em gel de agarose: sobre-expressão do gene <i>XKS1</i> na linhagem CEN.PK2-1C. | 61 |
| Figura 9 – Confirmação da construção genômica em gel de agarose: deleção do gene <i>PHO13</i> na linhagem ASY-1. | 64 |
| Figura 10 – Confirmação da construção genômica em gel de agarose: deleção do gene <i>PHO13</i> na linhagem DLG-K1. | 66 |
| Figura 11 – Crescimentos aeróbios das linhagens CEN.PK2-1C-xr-xdh, ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh em meios sintéticos sem uracila e sem histidina contendo 2% de glicose (A, B, C) ou 2% de xilose (D, E, F) como fontes de carbono..... | 72 |
| Figura 12 – Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila e sem histidina contendo 2% de xilose como fonte de carbono pelas linhagens CEN.PK2-1C-xr-xdh, ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh. | 76 |
| Figura 13 – Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila e sem histidina contendo 2% de xilose como fonte de carbono pelas linhagens ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B. | 83 |
| Figura 14 – Co-fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila e sem histidina contendo 2% de xilose e 2% de glicose como fontes de carbono pelas linhagens ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B. | 86 |
| Figura 15 – Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila e sem histidina contendo 10% de xilose como fonte de carbono pelas linhagens ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B. | 90 |
| Figura 16 – Crescimentos aeróbios das linhagens DLG-K1-Sut4, ASY- 3-Sut4, DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1 em meios sintéticos sem uracila contendo 2% de xilose como fonte de carbono. | 93 |
| Figura 17 – Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de glicose como fonte de carbono pelas linhagens DLG- K1-Sut4, ASY-3-Sut4, DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1. | 97 |
| Figura 18 – Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de xilose como fonte de carbono pelas linhagens DLG-K1- Sut4, ASY-3-Sut4, DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1. | 98 |

Figura 19 – Co-fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de glicose e 2% de xilose como fontes de carbono pelas linhagens DLG-K1-Sut4, ASY-3-Sut4, DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1.
..... 103

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 – Linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho..... | 42 |
| Tabela 2 – Oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados neste trabalho.... | 46 |
| Tabela 3 – Plasmídeos utilizados neste trabalho..... | 54 |
| Tabela 4 – Atividade específica da enzima xilulocinase em leveduras.. | 62 |
| Tabela 5 – Atividade específica das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase em leveduras portando os plasmídeos pPGK-XR e pTEF-XDH..... | 69 |
| Tabela 6 – Comparação entre as performances fermentativas de 20 g.L ⁻¹ xilose pelas cepas CEN.PK2-1C-xr-xdh, ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh..... | 77 |
| Tabela 7 – Atividade específica das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase em leveduras portando os plasmídeos pGPD-XR e pPGK-XDH..... | 81 |
| Tabela 8 – Comparação entre as performances fermentativas de 20 g.L ⁻¹ xilose pelas cepas ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B..... | 84 |
| Tabela 9 – Comparação entre as performances fermentativas de 20 g.L ⁻¹ xilose em co-fermentação com 20 g.L ⁻¹ glicose pelas cepas ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B..... | 87 |
| Tabela 10 – Comparação entre as performances fermentativas de 100 g.L ⁻¹ xilose pelas cepas ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B..... | 91 |
| Tabela 11 – Comparação entre as performances fermentativas de 20 g.L ⁻¹ xilose pelas cepas DLG-K1-Sut4, ASY-3-Sut4, DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1..... | 99 |
| Tabela 12 – Comparação entre as performances fermentativas de 20 g.L ⁻¹ xilose em co-fermentação com 20 g.L ⁻¹ de glicose pelas cepas DLG-K1-Sut4, ASY-3-Sut4, DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1..... | 104 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 1.1 O ÁLCOOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL..... | 19 |
| 1.2 A BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E O ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO..... | 22 |
| 1.3 LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE..... | 24 |
| 1.4 VIAS DE METABOLIZAÇÃO DA XILOSE..... | 26 |
| 1.5 TRANSPORTE DE XILOSE..... | 32 |
| 1.6 MODIFICAÇÕES GENÉTICAS ADICIONAIS EM <i>S.</i> <i>CEREVISIAE</i> | 34 |
| 1.7 LINHAGENS DE <i>S. CEREVISIAE</i> PARA MANIPULAÇÃO GENÉTICA..... | 38 |
| 2 OBJETIVOS..... | 40 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 40 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 40 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 41 |
| 3.1 MEIOS DE CULTURA..... | 41 |
| 3.2 LINHAGENS DE LEVEDURAS UTILIZADAS..... | 41 |
| 3.3 TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR..... | 41 |
| 3.3.1 Extração de DNA genômico..... | 43 |
| 3.3.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction)..... | 43 |
| 3.3.3 Eletroforese em Gel de Agarose..... | 44 |
| 3.3.4 Obtenção dos Módulos de Sobre-expressão e de Deleção..... | 45 |
| 3.3.5 Concentração dos fragmentos de DNA amplificados..... | 48 |
| 3.3.6 Modificações genômicas em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>..... | 49 |
| 3.3.6.1 Sobre-expressão do gene <i>XKS1</i> | 50 |
| 3.3.6.2 Deleção do gene <i>PHO13</i> | 51 |
| 3.3.7 Transformação das linhagens recombinantes com plasmídeos de expressão..... | 52 |
| 3.3.8 Clonagem do gene que codifica a enzima XR de <i>S. arborariae</i> no plasmídeo pGPD..... | 54 |
| 3.4 DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS..... | 55 |
| 3.5 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR..... | 57 |
| 3.6 ENSAIO FERMENTATIVO..... | 57 |
| 3.7 DETERMINAÇÃO DOS SUBSTRATOS E PRODUTOS DOS CRESCIMENTOS E FERMENTAÇÕES..... | 58 |

| | |
|---|------------|
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 59 |
| 4.1 MODIFICAÇÕES GENÔMICAS EM LINHAGENS DE <i>S.</i> <i>CEREVISIAE</i> | 59 |
| 4.1.1 Obtenção de linhagens recombinantes para análise de enzimas heterólogos..... | 60 |
| 4.1.2 Obtenção de linhagem recombinante para análise de transportadores heterólogos..... | 64 |
| 4.2 PERFORMANCE FERMENTATIVA DAS LINHAGENS RECOMBINANTES APÓS A EXPRESSÃO DE ENZIMAS E TRANSPORTADORES HETERÓLOGOS..... | 66 |
| 4.2.1 Teste das linhagens como plataformas para a expressão de enzimas heterólogos..... | 67 |
| 4.2.2 Teste das linhagens como plataformas para a expressão de transportadores heterólogos..... | 91 |
| 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 105 |
| 6 REFERÊNCIAS..... | 107 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ÁLCOOL COMBUSTÍVEL NO BRASIL

Desde a revolução industrial, o aumento na utilização de combustíveis fósseis como o carvão e os derivados do petróleo para a geração de energia vem promovendo a liberação de um excesso de carbono na atmosfera. Como consequência, nos últimos anos, os níveis atmosféricos de dióxido de carbono têm aumentado e as reservas de petróleo têm diminuído, o que trouxe a busca da sociedade por substitutos para os combustíveis fósseis (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; FRENCH, 2009). Nesse contexto, os biocombustíveis transformaram-se em potenciais alternativas renováveis, principalmente com vistas a diminuir a dependência do petróleo e pelo compromisso de muitos países na redução das concentrações de dióxido de carbono na atmosfera. Atualmente, os biocombustíveis mais utilizados no mundo são o etanol e o biodiesel (LIEW; HASSIM; NG, 2014).

O etanol é produzido no Brasil em grande escala desde a crise do petróleo da década de 1970. Na época, em meio à alta nos preços nos barris de petróleo e com um extenso cultivo de cana-de-açúcar para a produção de sacarose, o governo brasileiro criou o Programa Nacional do Alcool (Proálcool), buscando incentivar a produção de álcool a partir da cana-de-açúcar e substituir a gasolina utilizada como combustível em veículos leves pelo etanol (GOLDEMBERG, 2006). Com o estímulo do governo e o desenvolvimento de tecnologias, o Brasil ganhou destaque mundial na produção desse biocombustível, tendo o ápice da produção no ano de 1986, quando menos de um terço do total de carros fabricados no país ainda utilizava gasolina como combustível (GOLDEMBERG, 2008). Contudo, nos anos seguintes a produção brasileira de etanol sofreu forte declínio, principalmente devido a problemas apresentados pelos automóveis movidos a álcool e à estabilização do preço do petróleo (ZANIN et al., 2000).

Um novo estímulo para a produção de etanol surgiu em 2003, com o desenvolvimento dos motores bicombustíveis ou flex (os quais podem utilizar etanol e/ou gasolina em seus motores). A chegada dos carros flex aliada à crescente preocupação ambiental causada pelo uso de combustíveis fósseis fez com que a produção de etanol combustível ganhasse novamente força no Brasil (GOLDEMBERG, 2008). De

acordo com dados recentes do “*Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar*”, disponibilizado pela Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2016), na safra 2015/2016, o Brasil bateu recorde na produção de etanol, com um total de 660 milhões de toneladas de cana-de-açúcar processadas e 30,5 bilhões de litros de etanol produzidos, aumento de 6,3% do biocombustível em relação à safra anterior. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos (ANÁLISE DE CONJUNTURA DOS BIOCOMBUSTÍVEIS, 2016).

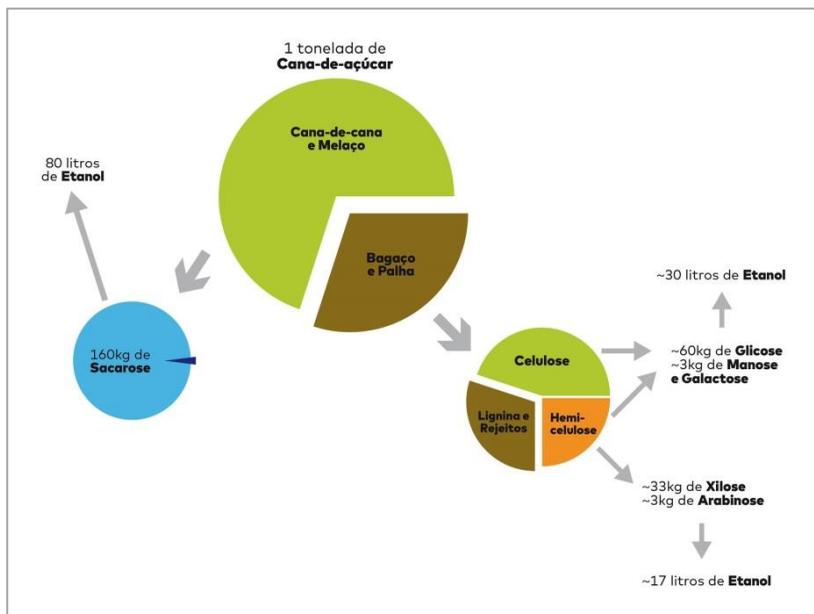
A produção de etanol combustível no país tem como matéria-prima o caldo da cana-de-açúcar, um material fermentável e que possui como principal componente o dissacarídeo sacarose. A estrutura da sacarose permite que esta fonte de carbono seja utilizada prontamente pelo microrganismo do processo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sem a necessidade, portanto, de hidrólise prévia do material (PEREIRA Jr. et al., 2008). Assim, o etanol produzido hoje no Brasil (chamado de etanol de primeira geração) é resultado da fermentação direta da sacarose pela levedura *S. cerevisiae* (DOS SANTOS et al., 2016).

Como consequência da grande produção brasileira de etanol de primeira geração, tem-se a crescente produção de resíduos do setor. Segundo a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA) – (2012), cada tonelada de cana-de-açúcar moída para a fabricação de açúcar e etanol gera, em média, 250 kg de bagaço e 200 kg de palha. Desses resíduos de cana produzidos, a maior parte é queimada para a produção de energia nas usinas (calor e eletricidade) e uma pequena parte é deixada no campo para ser decomposta (CORTEZ et al., 2008). Entretanto, o bagaço e a palha da cana-de-açúcar são constituídos de polissacarídeos fermentáveis que também podem ser utilizados para a produção de etanol, neste caso, chamado de etanol de segunda geração ou etanol 2G (PESSOA Jr. et al., 2005). O Brasil pode ser muito favorecido no desenvolvimento dessa tecnologia, uma vez que a produção pode ser anexada às unidades produtoras de etanol de primeira geração, que são as próprias geradoras do bagaço e da palha de cana-de-açúcar, proporcionando, dessa forma, menos investimento em infraestrutura, energia e logística. Além disso, o etanol de segunda geração pode aumentar a produção do combustível sem aumentar a área de cana-de-açúcar plantada – uma vantagem econômica e também ambiental (SOCCOL et al., 2010).

Através da utilização da biomassa proveniente da cana-de-açúcar pode-se alcançar uma produção bastante alta de etanol de segunda

geração. Se considerarmos uma eficiência na fermentação dos carboidratos presentes nessa biomassa de 90%, o bagaço e a palha podem aumentar em mais de 50% a produção de etanol por tonelada de cana-de-açúcar plantada (ZANIN et al., 2000; STAMBUK et al., 2008). Conforme ilustrado na Figura 1, a partir de uma tonelada de cana-de-açúcar, são gerados aproximadamente 80 litros de etanol de primeira geração. Contudo, com a utilização do bagaço e da palha dessa parcela de cana-de-açúcar, e com a eficiência descrita acima, pode-se chegar a aproximadamente 47 litros a mais de etanol, aumentando o montante final para aproximadamente 127 litros (STAMBUK et al., 2008).

Figura 1 – Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. A tecnologia atual de processamento de cana de açúcar e produção de etanol combustível a partir da sacarose é ilustrada à esquerda na figura, enquanto que os avanços tecnológicos necessários para a produção de etanol a partir de bagaço e palha de cana são ilustrados no lado direito da figura.



Fonte: Adaptado de Stambuk et al., 2008.

A principal vantagem brasileira na produção de etanol de segunda geração é a utilização de um resíduo gerado em grande quantidade no país. Além disso, resíduos da agricultura, como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, são renováveis, abundantes, não demandam de terra separada para produção, não necessitam de maior utilização de água e não competem com a indústria de alimentos (SALKAR et al., 2012). No entanto, mesmo com grandes vantagens provenientes da utilização dos resíduos da cana-de-açúcar para a produção de etanol, a viabilidade industrial desse processo é afetada por custos com operação e condições de processamento (MACRELLI; GALBE; WALLBERG, 2014). Algumas empresas brasileiras de combustível têm trabalhado na busca pela viabilidade e produção industrial do etanol de segunda geração, e, desde 2014, duas usinas de etanol 2G já estão em operação no Brasil (DOS SANTOS et al., 2016).

1.2 A BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E O ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

O etanol de segunda geração a partir da cana-de-açúcar é dependente da fermentação dos carboidratos presentes no bagaço e na palha dessa gramínea. Essa biomassa lignocelulósica está relacionada com a parte da planta que forma a parede celular, sendo composta basicamente por polissacarídeos de celulose (40%-60%) e hemicelulose (20%-40%), que estão associados a uma estrutura macromolecular, a lignina (15-25%) (PEREIRA Jr. et al. 2008).

A celulose, o maior componente da biomassa lignocelulósica, consiste em um polímero longo e linear formado por monômeros de glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (ZHANG et al., 2012). A hemicelulose, o segundo maior componente dessa biomassa, é um polímero heterogêneo e muito ramificado, formado pelas pentoses xilose e arabinose, e pelas hexoses manose, glicose e galactose (SARKAR et al., 2012). Esse heteropolímero geralmente é classificado de acordo com o carboidrato mais abundante em sua cadeia principal, sendo que o mais encontrado em gramíneas como a cana-de-açúcar é a xilana, um polissacarídeo formado por unidades de xiloses unidas por ligações glicosídicas β -1,4, sendo a xilose, portanto, a pentose predominante na biomassa lignocelulósica em questão (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005; GÍRIO et al., 2010). A lignina é um polímero complexo, cuja natureza hidrofóbica e as fortes ligações químicas com a celulose e a com a hemicelulose fazem com que ela desempenhe um papel de

proteção na estrutura da biomassa contra o ataque de microrganismos (SARKAR et al., 2012).

Para que esses carboidratos presentes na biomassa lignocelulósica estejam acessíveis à fermentação, são necessários dois processos. O primeiro consiste no pré-tratamento da lignocelulose e o segundo compreende a hidrólise da celulose e da hemicelulose (GALBE; ZACCHI, 2002). Para o pré-tratamento, os principais processos utilizados incluem o uso de ácidos, agentes alcalinos, solventes orgânicos, água quente e explosão a vapor (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; GÍRIO et al., 2010). O objetivo desse processo é desestruturar a biomassa através da ruptura da matriz lignocelulósica, diminuindo a cristalinidade do material, liberando os carboidratos da ligação com a lignina e, conseqüentemente, preparando a biomassa para a etapa de hidrólise. O pré-tratamento deve, sobretudo, preservar os monossacarídeos que serão posteriormente fermentados, além de evitar a formação de produtos que possam ser inibidores da fermentação, como ácido fórmico, ácido acético, furfural e hidroximetil furfural (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010; SARITHA; ARORA; LATA, 2012).

Após o pré-tratamento, as etapas de hidrólise e fermentação podem ser realizadas separadamente ou por meio da sacarificação e fermentação simultânea (*SSF- Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Uma das características da SSF é que os açúcares liberados pela hidrólise são simultaneamente consumidos, integrando os processos em um único reator, diminuindo a probabilidade de contaminação por outros microrganismos e, também, os custos do processo (GALBE; ZACCHI, 2002; OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008; KOPPRAM; OLSSON, 2014). No entanto, a SSF apresenta também algumas desvantagens: alguns subprodutos gerados com a degradação da lignina podem ser inibidores para a fermentação subsequente, dificultando a utilização, pelas leveduras, dos açúcares provenientes do processo de hidrólise. Além disso, a temperatura ótima para a fermentação é diferente da temperatura ótima de hidrólise, sendo necessário o uso de uma temperatura combinada, o que pode interferir no metabolismo das leveduras (LI; WENG; CHAPPLE, 2008; OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008).

A etapa de hidrólise da celulose e da hemicelulose pode ser realizada com métodos químicos ou através de enzimas como catalisadores. Os métodos químicos normalmente envolvem a utilização de ácidos, o que tem demonstrado corrosão dos equipamentos do

processo e a formação de produtos tóxicos que podem inibir a fermentação posterior (STAMBUK et al., 2008). Devido a isso, o método enzimático possui um potencial de rendimento maior, apresentando a vantagem da especificidade enzimática e a reduzida formação de produtos tóxicos (GALBE; ZACCHI, 2002). Na hidrólise enzimática da celulose, existe a ação sinérgica de enzimas que agem nas ligações β -1,4 da celulose e de resíduos de glicose, liberando glicose como produto principal (LYND et al., 2002). Em relação à hidrólise da hemicelulose, que, como visto, está principalmente sob a forma de xilana na biomassa da cana-de-açúcar, as enzimas envolvidas no processo clivam as ligações β -1,4 da xilana e de xilooligossacarídeos, resultando em monômeros de xilose (GÍRIO et al., 2010). Após o processo de hidrólise, os açúcares devem então ser fermentados para a produção do produto esperado: etanol.

Os hidrolisados resultantes do processo de hidrólise possuem, portanto, dois monossacarídeos majoritariamente: a glicose e a xilose. Estima-se que a xilose pode compor até 25% dos açúcares fermentescíveis totais em alguns hidrolisados (GÍRIO et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2016). Assim, essa pentose configura uma importante parcela dos açúcares provenientes da biomassa da cana-de-açúcar a serem convertidos em etanol de segunda geração. Devido a isso, os esforços iniciais para uma produção de etanol 2G comercialmente viável estão destinados a encontrar e/ou produzir um organismo que fermenta eficientemente não só o monossacarídeo glicose, mas também a xilose (HO et al.; 1999; GRAY, ZHAO, EMPTAGE, 2006; DOS SANTOS et al., 2016).

1.3 LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE

Para uma eficiente produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, são necessárias leveduras capazes de fermentar bem em condições industriais. A levedura *S. cerevisiae*, principal microrganismo utilizado na produção de etanol de primeira geração, possui singularidades que a tornaram a mais utilizada nesse tipo de processo, conseguindo sobreviver e se adaptar às condições adversas do meio fermentativo industrial, tais como elevados níveis de etanol, baixo pH e a pressão osmótica devido à elevada concentração de açúcar – fatores que eliminam outros microrganismos (LANDRY et al., 2006). Além disso, essa levedura se destaca também por estar entre as melhores fermentadoras de glicose, principal componente da biomassa

lignocelulósica, e por fermentar mesmo estando na presença de oxigênio, quando está submetida a concentrações altas de glicose (MÉRICO et al., 2007). Devido a todas essas características, *S. cerevisiae* vem sendo escolhida também para a produção de etanol de segunda geração. No entanto, embora essa levedura seja capaz de fermentar eficientemente a glicose, as células de *S. cerevisiae* são naturalmente incapazes de fermentar a xilose (o segundo açúcar mais abundante na biomassa em questão), devido a uma deficiência das suas enzimas envolvidas na metabolização dessa pentose (PITKÄNEN et al., 2003).

Em contrapartida, diferentemente de *S. cerevisiae*, existem outros organismos capazes de utilizar a xilose como fonte de carbono, entre bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Leveduras capazes de metabolizar a xilose já foram documentadas entre os gêneros *Candida*, *Pachysolen*, *Debaryomyces*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, entre outros (SCHNEIDER et al., 1981; 1983; JEFFRIES, 1981; DU PREEZ; VAN DER WALT, 1983; HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; TAVARES et al., 2000; DEBUS et al., 1983; GÁRDONYI et al., 2003; STAMBUK et al., 2003; NGUYEN et al., 2006; CADETE et al., 2012; CADETE et al., 2013). Uma das primeiras leveduras fermentadoras de xilose descritas foi *Pachysolen tannophilus* (SCHNEIDER et al., 1981; 1983). Leveduras como *Scheffersomyces shehatae* (antigamente denominada *Candida shehatae*) e *Candida tropicalis* também foram descritas como fermentadoras de xilose ainda nos anos 1980 (JEFFRIES, 1981; DU PREEZ; VAN DER WALT, 1983). Outra levedura capaz de metabolizar a xilose é *Scheffersomyces stipitis*, uma das melhores fermentadoras de xilose já descritas, sendo capaz de produzir níveis altos de etanol a partir dessa pentose (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; AGBOGBO et al., 2008). No entanto, essa levedura apresenta baixa tolerância ao etanol, é incapaz de crescer em ambientes anaeróbios e sua capacidade fermentativa depende da micro-oxigenação do meio – fatores difíceis de controlar em meios fermentativos industriais (SLININGER et al., 2014). Contudo, com seu genoma sequenciado em 2007 (JEFFRIES et al., 2007), *S. stipitis* vem sendo uma das leveduras mais estudadas e mais bem caracterizadas em relação ao metabolismo da xilose.

Na última década, novas leveduras fermentadoras de xilose vêm sendo descritas, sobretudo do gênero *Spathaspora*, como *S. allomyrinae*, *S. roraimanensis*, *S. xylofermentans*, *S. passalidarum*, *S. arborariae* e *S. brasiliensis* (NGUYEN et al., 2006; CADETE et al., 2009; CADETE et al. 2013; WANG et al., 2016). *Spathaspora passalidarum*, uma levedura

isolada do intestino de besouros digestores de madeira (NGUYEN et al., 2006), se mostrou capaz de converter xilose em etanol em anaerobiose com eficiência (HOU, 2012), além de co-utilizar xilose e glicose aerobicamente (LONG et al., 2012). *Spathaspora arborariae*, isolada a partir de madeira em decomposição (CADETE et al., 2009), além de apresentar boa fermentação de xilose, é tolerante à compostos inibidores da fermentação, como furfural e hidroximetilfurfural (CUNHA-PEREIRA et al., 2011). Recentemente, os genomas das leveduras *S. passalidarum* e *S. arborariae* foram sequenciados, o que pode auxiliar na descoberta de novos genes para o metabolismo de xilose (WOHLBACH et al., 2011; LOBO et al., 2014).

Mesmo que leveduras como essas utilizem a xilose como fonte de carbono e algumas produzam etanol a partir desse açúcar, elas não demonstram a mesma performance fermentativa de *S. cerevisiae* diante de processos industriais de fermentação alcoólica. Essas leveduras, de maneira geral, demonstram baixa tolerância ao etanol, à pressão osmótica, à valores baixos de pH e, em sua maioria, requerem condições controladas de oxigenação para uma fermentação eficiente (HAHN-HAGERDAL et al., 2001). No entanto, as leveduras naturalmente fermentadoras de xilose vêm sendo utilizadas em pesquisas para o entendimento de suas vias metabólicas envolvidas na utilização desse monossacarídeo, em busca dos genes responsáveis por esse metabolismo. Muitos pesquisadores têm trabalhado com genes provenientes de algumas dessas leveduras, principalmente de *S. stipitis*, para expressão em *S. cerevisiae* – os genes que codificam as enzimas responsáveis pela fermentação da xilose podem ser amplificados dos seus genomas e inseridos no núcleo das células de *S. cerevisiae* em plasmídeos recombinantes ou diretamente no genoma dessa última, por recombinação homóloga (JIN et al., 2000; WALFRIDSSON, 1997; ELIASSON et al., 2000; MATSUSHIKA et al., 2008; HÁ et al., 2010). Essa estratégia tem se mostrado uma das melhores alternativas para permitir a fermentação de xilose nessa levedura e melhorar a produção de etanol 2G.

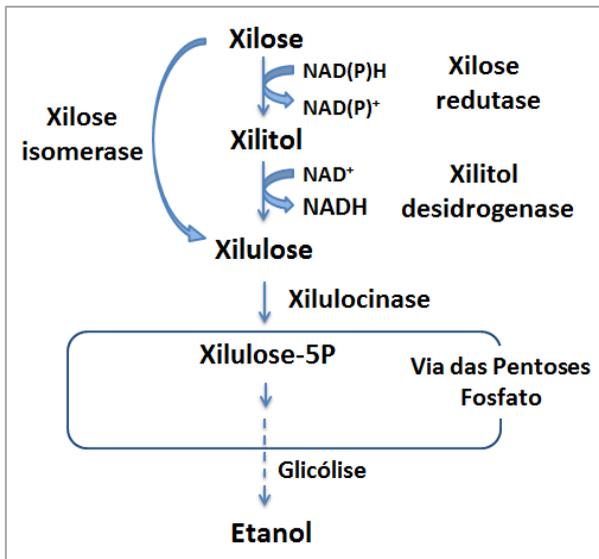
1.4 VIAS DE METABOLIZAÇÃO DA XILOSE

Ao longo das pesquisas envolvendo organismos capazes de metabolizar a xilose, as vias metabólicas para a utilização dessa pentose foram sendo elucidadas. Em algumas leveduras e fungos filamentosos, os passos internos para a metabolização da xilose iniciam-se com duas

reações de oxirredução (Figura 2): ao ser internalizada pela célula, a xilose é reduzida pela enzima xilose redutase (XR) à xilitol, que por sua vez é oxidado pela enzima xilitol desidrogenase (XDH) à xilulose (PITKÄNEN et al., 2003). Alternativamente, em via metabólica encontrada principalmente em bactérias e fungos anaeróbios, a xilose é convertida diretamente em xilulose pela enzima xilose isomerase (XI) (HAHN-HÄGERDAL; KARHUMAA; GORWA-GRAUSLUND, 2007). Em ambas as vias, após a formação da xilulose, esse monossacarídeo é substrato da enzima xilulocinase (XK), que fosforila a xilulose em xilulose-5-fosfato com o consumo de uma molécula de ATP. A xilulose-5-fosfato segue, então, pela Via das Pentoses-Fosfato (VPF) onde, conforme demonstrado a seguir, pode ser direcionada para a formação do etanol (PITKÄNEN et al., 2003).

Na via metabólica da xilose encontrada em leveduras (via que utiliza uma XR e uma XDH), é necessário um balanço entre as reações de oxidação e de redução nas duas primeiras reações da via (Figura 2). A enzima XDH utiliza NAD^+ como co-substrato (que, na reação, é reduzida a NADH), no entanto, a enzima XR pode utilizar tanto NADH quanto NADPH (que, na reação são oxidados a NAD^+ ou a NADP^+) (WATANABE; KODAKI; MAKINO, 2005). Em leveduras que a XR utiliza NADPH, passa a haver um desbalanço que, pela falta da reciclagem do NAD^+ , acaba por interromper a metabolização de xilose, o que ocasiona um acúmulo de xilitol (STAMBUK et al., 2008). Esse desequilíbrio de cofatores é ainda mais afetado em anaerobiose, uma vez que, enquanto o NADPH pode ser produzido na Via das Pentoses-Fosfato, o NADH não pode ser reoxidado na ausência de oxigênio (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994). Quando há oxigênio disponível, o cofator NADH pode ser reoxidado pela cadeia transportadora de elétrons (JIN; JEFFRIES, 2004). Assim, a fermentação de xilose em condições limitadas de oxigênio pode melhorar o fluxo metabólico dessa pentose (VAN MARIS et al., 2007). Contudo, essa condição específica de oxigenação é difícil de ser obtida em ambientes fermentativos industriais, sobretudo na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos (JEFFRIES, 2006). Uma alternativa interessante é a busca por xilose redutases com afinidade por ambos os cofatores (NADH e NADPH) ou com afinidade maior pelo NADH, o que poderia evitar ou diminuir o desbalanço de cofatores (HAHN HÄNGERDAL et al. 1994; JEFFRIES, 2006).

Figura 2 – Vias metabólicas iniciais para a utilização da xilose. Via XR-XDH (xilose redutase e xilitol desidrogenase), encontrada em leveduras e fungos filamentosos. Via XI (xilose isomerase), encontrada principalmente em bactérias.

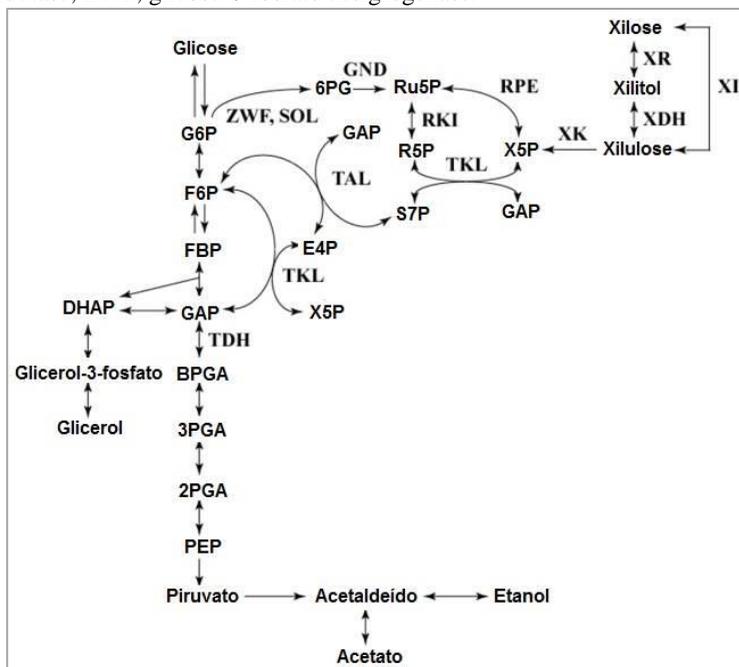


Fonte: Adaptado de Kim et al., 2013.

A Via das Pentoses-Fosfato (VPF) é essencial para o metabolismo da xilose, uma vez que o liga, por meio de metabólitos intermediários, à via glicolítica (MATSUSHIKA et al., 2009). A rota metabólica VPF é sabida por possuir duas fases: uma fase oxidativa e uma fase não oxidativa. Na fase oxidativa são gerados a ribose-5-fosfato, importante para a formação de nucleotídeos e coenzimas, e o NADPH, necessário para a biossíntese de diversos constituintes celulares (KRUGER; VON SCHAEWEN, 2003). Na fase não-oxidativa da via é que a xilulose-5-fosfato (proveniente do metabolismo da xilose) pode entrar nas reações bioquímicas (Figura 3): essa molécula, juntamente com uma molécula de ribose-5-fosfato, é convertida em sedoheptulose-7-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, reação catalisada pela enzima Transcetolase (TKL); após, a enzima Transaldolase (TAL) é responsável por catalisar a conversão de sedoheptulose-7-fosfato, juntamente com o gliceraldeído-3-fosfato, em frutose-6-fosfato e eritrose-4-fosfato; esta última, por fim, é substrato da enzima TKL que a

converte, juntamente com uma molécula de xilulose-5-fosfato, em gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato (NELSON; COX, 2014). Essas duas últimas moléculas podem, então, entrar como intermediários na via glicolítica e serem direcionadas para a produção de etanol (HAHN-HAGERDAL et al., 1994; PITKÄNEN et al., 2003; WOHLBACH, 2011.).

Figura 3 – Visão geral da via de assimilação da xilose em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante. Abreviações: BPGA, 1,3-bifosfoglicerato; DHAP, dihidroxiacetona-fosfato; E4P, eritrose-4-fosfato; FBP, frutose-1,6-bifosfato; F6P, frutose-6-fosfato; GAP, gliceraldeído-3-fosfato; Glycerol3P, glicerol-3-fosfato; G6P, glicose-6-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; 6PG, 6-fosfogluconato; 2PGA, 2-fosfoglicerato; 3PGA, 3-fosfoglicerato; R5P, ribose-5-fosfato; Ru5P, ribulose-5-fosfato; S7P, sedoheptulose-7-fosfato; X5P, xilulose-5-fosfato. Enzimas são indicadas pelo seu símbolo genético atribuído: GND, 6-fosfogluconato desidrogenase; SOL, 6-fosfogluconolactonase; TAL, transaldolase; TDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; TKL, transcetolase; RPE, ribulose-5-fosfato 4-epimerase; RKI, ribose-5-fosfato isomerase; XI, xilose isomerase; XK, xilulocinase; XDH, xilitol desidrogenase; XR, xilose redutase; ZWF, glicose-6-fosfato desidrogenase.



Fonte: Adaptado de Hasunuma et al., 2011.

A levedura *S. cerevisiae* possui em seu genoma os genes necessários para a metabolização da xilose; o gene *GRE3*, que codifica a enzima xilose redutase endógena, e *XYL2*, que codifica a enzima xilitol desidrogenase endógena, estão presentes no genoma dessa levedura (RICHARD, TOIVARI, PENTTILA, 2000). Contudo, a expressão dessas enzimas é extremamente baixa, não suportando o crescimento em xilose (HAHN-HAGERDAL et al. 2007). Alguns trabalhos já realizaram a sobre-expressão desses genes, no entanto, não houve melhora significativa no consumo de xilose pelas leveduras recombinantes (TOIVARI et al., 2004; ATTFIELD; BELL, 2006). Além disso, a XR de *S. cerevisiae* é estritamente dependente do cofator NADPH (KUHN et al., 1995) o que dificulta a produção de etanol ao invés de xilitol. Por outro lado, *S. cerevisiae* é naturalmente capaz de fermentar a xilulose (CHIANG et al., 1981, YU; JEPPSSON; HÄHN-HÄGERDAL, 1995) uma vez que já que possui em seu genoma o gene *XKS1*, que codifica a enzima xilulocinase, que é funcional nessa levedura e que, como demonstrado por Richard, Toivari e Penttila (2000), a torna capaz de crescer em meio contendo xilulose como única fonte de carbono.

A habilidade natural de *S. cerevisiae* em fermentar a xilulose fez com que os esforços iniciais dos pesquisadores fossem voltados à análise de enzimas XR e XDH de diferentes leveduras, em busca dos genes que codificam tais enzimas e de suas características de atividade e cofatores, com vistas à introdução desses genes em *S. cerevisiae*. Algumas espécies de leveduras apresentam xilose redutases que utilizam estritamente o cofator NADPH, como *Candida tropicalis* e *Pachysolen tannophilus* (BOLEN; DETROY, 1985; YOKOYAMA et al., 1995). Contudo, em espécies como *Scheffersomyces shehatae* e *Scheffersomyces stipitis*, a enzima em questão utiliza ambos os cofatores, porém a preferência permanece sendo o cofator NADPH (VERDUYN et al., 1985; HO et al., 1990). No caso de *S. stipitis*, embora essa levedura prefira NADPH como cofator, a enzima exibe boa afinidade pelo NADH (VERDUYN et al., 1985). Em virtude disso e da ótima capacidade de fermentar a xilose dessa levedura, em 1993, dois grupos de pesquisadores independentes demonstraram que a introdução dos genes *XYL1* e *XYL2* (que codificam, respectivamente, XR e XDH) de *S. stipitis* em *S. cerevisiae* permitem esta última utilizar xilose como fonte de carbono (KÖTTER; CIRIACY, 1993; TANTIRUNGKIJ et al., 1993). A partir daí, outros grupos de pesquisas construíram *S. cerevisiae* recombinantes a partir de genes de *S. stipitis*, porém, embora as

leveduras sejam capazes de crescer e consumir a xilose, pouco etanol é gerado, e o produto principal foi o xilitol (WALFRIDSSON, 1997; JIN et al., 1999). A levedura *Spathaspora passalidarum*, por outro lado, apresenta uma xilose redutase com preferência pelo cofator NADH (HOU et al., 2012), o que torna essa levedura de grande interesse para ter seus genes expressos em *S. cerevisiae*.

O problema do desbalanço de cofatores tem sido também explorado por meio da engenharia de proteínas, através de mutagênese sítio dirigida. Essa técnica já foi empregada para modificar a preferência das enzimas pelos cofatores, tanto da enzima XR, alterando sua preferência para o NADH (BENGTSSON et al., 2009; WATANABE et al., 2007a; 2007b; XIONG; CHEN; BARFORD, 2011); quanto da XDH, alterando sua preferência para o NADP⁺ (WATANABE et al., 2007c; MATSUSHIKA et al., 2008a; 2008b; 2009b). Essas estratégias demonstram maior produção de etanol e menor produção de xilitol pelas linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes portando as enzimas mutantes. Adicionalmente, o nível de expressão das enzimas XR e XDH também tem sido objeto de estudo. Alguns trabalhos já demonstraram que a otimização na razão entre as expressões dessas enzimas minimiza a acumulação de xilitol (ELIASSON et al., 2000; MATSUSHIKA; SAWAYAMA et al., 2008; KIM et al., 2012).

A via alternativa de fermentação da xilose, na qual a xilose é convertida diretamente em xilulose pela enzima xilose isomerase (XI), possui a vantagem de não requerer cofatores em suas reações. Contudo, em muitos casos, quando os genes que codificam xilose isomerases foram expressos em *S. cerevisiae*, não houve atividade das proteínas heterólogas resultantes (HO et al., 1983; AMORE; WILHELM; HOLLENBERG, 1989; MOES; PRETORIUS; VAN ZYL, 1996; GÁRDONYI; HAHN-HÄGERDAL, 2003). Isso tem sido atribuído à modificações pós-traducionais e erros de dobramento das proteínas (VAN MARIS et al., 2007). Alguns trabalhos obtiveram sucesso nessa expressão heteróloga, como é o caso das xiloses isomerases provenientes das bactérias *Thermus thermophilus* e *Clostridium phytofermentans*, e do fungo *Piromyces* sp. E2, cujos genes foram funcionalmente expressos em *S. cerevisiae* (WALFRIDSSON et al., 1997; KUYPER et al., 2003; BRAT; BOLES; WIEDEMANN, 2009; MA; LEWIS LIU; MOON, 2012). Entretanto, a produtividade de etanol pelas células recombinantes ainda permanece baixa com essa estratégia. Além disso, em experimento comparando as duas vias, a via de

metabolização da xilose que utiliza as enzimas XR e XDH resultou em maior produtividade de etanol do que utilizando a via XI, apesar da formação de subprodutos como o xilitol e requerer cofatores nas reações (KARHUMAA et al., 2007a).

1.5 TRANSPORTE DE XILOSE

Um passo essencial no metabolismo da xilose é o seu transporte para o interior das células. Esse transporte ocorre por meio dos transportadores de açúcares, que são proteínas ancoradas na membrana celular (LAGUNAS et al., 1993; MARTIN-GALIANO; FRISHMAN, 2006; HORAK, 2013). O funcionamento dos transportadores pode ocorrer através de um mecanismo de difusão facilitada, sem gasto de energia e pelo qual o açúcar é direcionado para o interior da célula devido ao gradiente de concentração; ou por um sistema de transporte ativo, por cotransporte (simporte) com prótons (H^+) – neste último, ocorre a captação do açúcar juntamente com um próton, cujo gradiente gera a força necessária para esse processo (WEUSTHUIS et al., 1994; HORÁK, 1997; STAMBUK et al., 2008).

Sabe-se que, na levedura *S. cerevisiae*, a xilose é captada pelas células por meio de transportadores de hexoses, como a glicose e a frutose (LEE et al., 2002; SUBTIL; BOLES, 2012). Essa levedura possui uma família de 18 genes (*HXT1-HXT17* e *GAL2*) que codificam transportadores de hexoses que realizam esse transporte por difusão facilitada e possuem diferentes afinidades pela glicose (HAMACHER et al., 2002; GOLÇALVES et al., 2014). Por outro lado, o transporte de xilose por essa família de transportadores é feita com uma afinidade muito baixa em comparação com a glicose (KOTTER; CIRIACY, 1993; SALOHEIMO et al., 2007), e a competição pelo transporte (quando esses dois açúcares estão presentes no meio fermentativo) reduz a captação de xilose (RUNQUIST et al., 2010). Devido a isso, o transporte de xilose limita a utilização desse carboidrato, principalmente quando a via intracelular de fermentação é melhorada por meio da engenharia genética (SUBTIL; BOLES, 2012).

Algumas leveduras naturalmente fermentadoras de xilose, diferentemente de *S. cerevisiae*, exibem sistemas de transporte de alta e baixa afinidade para a captação dessa pentose, que compreendem difusão facilitada e simporte com H^+ (LUCAS; VAN UDEN, 1986; KILIAN; VAN UDEN, 1988; GÁRDONYI et al., 2003; STAMBUK et al., 2003; LEANDRO, FONSECA; GONÇALVES, 2009). Devido a

isso, muitos pesquisadores têm trabalhado na identificação de transportadores de açúcares dessas leveduras e analisado suas propriedades de transporte de xilose, visando à expressão em células de *S. cerevisiae* recombinantes capazes de fermentar esse açúcar. Entre eles, já foram expressos em *S. cerevisiae* os transportadores Sut1, Sut2, Sut3, Sut4, Xut1, Xut3, Xut7 e Rgt2 de *S. stipitis* (WEIERSSTALL et al., 1999, KATAHIRA et al., 2008; RUNQUIST et al., 2010; YOUNG et al., 2011; MOON et al., 2013); o transportador XylHP de *Debaryomyces hansenni* (FERREIRA et al., 2013); e os transportadores Gxs1 e Gxf1 de *Candida intermedia* (LEANDRO; SPENCER-MARTINS; GONÇALVES, 2008). Adicionalmente, alguns transportadores de fungos filamentosos também foram expressos em *S. cerevisiae*, como o transportador An25 de *Neurospora crassa* (DU; ZHAO, 2010) e XtrD de *Aspergillus nidulans* (COLABARDINI et al., 2014). Contudo, a maior parte destes transportadores clonados até agora não são específicos para a xilose, além de também serem transportadores de glicose. Recentemente, em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foram identificados dois novos transportadores de xilose (Hxt2.6 e Qup2), além do já estudado Xut1, na levedura *S. stipitis*, e o transportador Sut1 na levedura *S. passalidarum*. Esses transportadores se mostraram capazes de mediar o transporte de xilose e promover produção de etanol pelas células recombinantes (SALES et al., 2015; SALES, 2015).

Em paralelo, a engenharia evolutiva também tem sido utilizada para melhorar o desempenho do transporte de xilose em leveduras geneticamente modificadas que fermentam essa fonte de carbono. Apel et al. (2016) utilizaram essa metodologia e selecionaram fenótipos desejáveis após gerações de células de *S. cerevisiae* crescidas em meio seletivo com xilose. Nesse trabalho, após o experimento de engenharia evolutiva, os pesquisadores verificaram uma levedura resultante com mutação no transportador Hxt7, responsável por aumentar a velocidade de transporte de xilose. Young et al. 2012 expressaram em *S. cerevisiae* os transportadores Gxf1 de *C. intermedia* e Xut3 de *S. stipitis*, e utilizaram as leveduras resultantes em experimento de engenharia evolutiva. As leveduras, após gerações de células crescidas em xilose, apresentaram aumento na velocidade máxima de transporte de xilose e por consequência na taxa de consumo dessa pentose. Estudos mais detalhados com essas leveduras demonstraram mutações pontuais em aminoácidos dos transportadores, responsáveis pelo aumento da velocidade de transporte.

Tanto a expressão de transportadores heterólogos em *S. cerevisiae* quanto a engenharia evolutiva têm sido apontados como caminhos promissores para a melhora na captação de xilose pelas leveduras. Contudo, ainda é necessário identificar novos transportadores de diferentes organismos que contenham uma alta afinidade pela xilose e que, também, sejam específicos para a pentose em questão (MOYSÉS et al., 2016). Novas leveduras fermentadoras de xilose que foram isoladas recentemente, como as do gênero *Spathaspora*, podem ser analisadas quanto às suas propriedades para o transporte de xilose.

1.6 MODIFICAÇÕES GENÉTICAS ADICIONAIS EM *S. CEREVISIAE*

A introdução de enzimas heterólogas para o metabolismo de xilose permite, de fato, que a levedura *S. cerevisiae* seja capaz de fermentar essa fonte de carbono. Além disso, a expressão de transportadores de xilose heterólogos também se mostra importante para melhorar o fluxo metabólico dessa pentose. Contudo, muitos estudos têm identificado modificações genéticas extras em *S. cerevisiae* que melhoram a produção de etanol a partir de xilose. Essas modificações serão detalhadas a seguir.

Uma das mais importantes modificações genéticas em *S. cerevisiae* para melhorar a fermentação de xilose é a sobre-expressão da enzima xilulocinase (XK) endógena, codificada pelo gene *XKS1*. Embora *S. cerevisiae* possua essa enzima funcional e, como já citado, seja capaz de utilizar a xilulose como fonte de carbono, alguns estudos já demonstraram que a atividade dessa enzima na levedura em questão é muito baixa (YANG; JEFFRIES, 1997; RICHARD, TOIVARI, PENTTILA, 2000). Modelos cinéticos, no entanto, demonstram a necessidade de uma alta atividade de XK para um eficiente fluxo metabólico na fermentação da xilose (PARACHIN et al., 2011). Devido a isso, uma estratégia utilizada tem sido a sobre-expressão desse gene em linhagens recombinantes capazes de consumir a xilose. Pesquisas mostram que a sobre-expressão de XK em linhagem de *S. cerevisiae* recombinante expressando XR e XDH (*XYL1* e *XYL2* de *S. stipitis*) aumentam a taxa de utilização da xilose e a produção de etanol e diminuem a produção de xilitol (HO; CHEN; BRAINARD, 1998; TOIVARI et al., 2001). Da mesma forma, a introdução de XK heteróloga, como a codificada pelo gene *XYL3* de *S. stipitis*, também melhora o crescimento em xilose, haja vista que a atividade específica

da XR dessa levedura é maior do que a codificada pelo gene *XKS1* de *S. cerevisiae* (JIN et al., 2003). Em estudo de Jin et al. (2005), uma biblioteca de fragmentos genômicos de *S. stipitis* foram introduzidos em linhagem de *S. cerevisiae* (por meio de plasmídeos de expressão) com os genes *XYL1* e *XYL2*. Foram, então, selecionados 16 mutantes com alta taxa de crescimento em xilose, dois quais, 10 apresentaram o gene *XYL3* de *S. stipitis* no inserto dos plasmídeos. Adicionalmente, Wahlbom et al. (2003) reportaram uma linhagem mutante com melhorada habilidade de crescer em xilose que continha mutação no gene *XKS1*, responsável por promover uma alta atividade de XK, corroborando com a importância dessa enzima para a utilização de xilose.

Em contrapartida, outros trabalhos têm observado que a sobre-expressão de XK pode afetar negativamente o crescimento em xilose por linhagens recombinantes. Rodriguez-Pena et al. (1998) demonstraram que a sobre-expressão do gene *XKS1* em *S. cerevisiae* inibiu o crescimento em xilulose como única fonte de carbono. Jin et al. (2003) observaram que em linhagem de *S. cerevisiae* expressando *XYL1* e *XYL2* de *S. stipitis*, a sobre-expressão de *XYL3* inibiu o crescimento em xilose, enquanto que a expressão moderada desse gene permitiu o crescimento da levedura recombinante. De maneira similar, Johansson et al. (2001) verificaram que a sobre-expressão de *XKS1* reduziu o consumo de xilose pela metade em linhagem recombinante, contudo, aumentou a produção de etanol e diminuiu a produção de xilitol. A sugestão desses estudos é que esse possível efeito inibitório da sobre-expressão de *XKS1* se deve à descontrolada atividade de fosforilação de XK, acumulação de xilulose-5-fosfato e consequente depleção dos níveis de ATP, necessário para outras atividades da célula. Outros trabalhos, entretanto, não encontraram esse efeito inibitório (RICHARD; TOIVARI; PENTTILÄ, 2000; MATSUSHIKA, SAWAYAMA, 2008).

Em busca de resultados mais promissores na fermentação da xilose, alguns pesquisadores têm realizado experimentos de engenharia evolutiva, selecionando fenótipos desejáveis de linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes fermentadoras de xilose após gerações de células crescidas nessa fonte de carbono. Trabalhos paralelos têm realizado mutagênese em linhagens recombinantes, e os fenótipos selecionados têm sido avaliados. Essas abordagens são importantes uma vez que permitem descobrir novos genes alvo relacionados à melhora no consumo e fermentação da pentose em questão (MOYSÉS et al., 2016).

Dentre os genes alvos descobertos através de engenharia evolutiva e mutagênese, o gene *PHO13* tem sido recentemente relacionado ao metabolismo de xilose. Esse gene, em *S. cerevisiae*, codifica um polipeptídeo de 312 aminoácidos, uma enzima classificada como fosfatase alcalina (KANEKO et al., 1989; GALABOVA et al., 2000). As enzimas classificadas como fosfatases alcalinas são enzimas que removem grupos fosfatos de diversos tipos de moléculas, como nucleotídeos e proteínas; processo, este, conhecido como desfosforilação (NELSON; COX, 2014). Em *S. cerevisiae*, essas proteínas são codificadas por dois genes: *PHO8* e *PHO13*, ambos localizados no cromossomo IV. A expressão de *PHO8* é regulada pela presença ou ausência de fosfato inorgânico (Pi) no meio celular, enquanto que *PHO13*, por outro lado, têm expressão constitutiva (KANEKO; TOH-E; OSHIMA, 1982; KANEKO et al., 1989). Embora a proteína Pho13p exiba atividade de fosfatase, ainda não se conhecem todas as suas funções fisiológicas na célula. No entanto, a deleção do gene *PHO13* têm resultado em fenótipos de grande interesse em linhagens de *S. cerevisiae* capazes de fermentar a xilose (NI; LAPLAZA; JEFFRIES, 2007; VAN VLEET; JEFFRIES; OLSSON, 2008; FUJITOMI et al., 2012; KIM et al., 2013; LEE; JELLISON; ALPER, 2014; LI et al., 2014; KIM et al., 2015; SAKIHAMA et al., 2015; BAMBA; HASUNUMA; KONDO, 2016; XU et al., 2016)

Ni, Laplaza e Jeffries (2007) foram os primeiros a relacionar o gene *PHO13* com o consumo de xilose em linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes. Neste trabalho, uma linhagem de *S. cerevisiae* sobre-expressando as enzimas XR, XDH e XK de *S. stipitis* foi submetida a mutações randômicas com transposons, e os melhores fenótipos resultantes de crescimento em xilose foram selecionados, os quais cresceram muito melhor em xilose do que a linhagem parental, apresentando mutação no gene *PHO13*. Neste mesmo trabalho, um experimento de deleção do gene *PHO13* resultou em um fenótipo similar ao encontrado nas leveduras mutantes: a melhora no consumo da xilose. No ano seguinte, Van Vleet, Jeffries e Olsson (2008) demonstraram que o crescimento celular, o consumo de xilose e a produção de etanol foram marcadamente aumentados em células de *S. cerevisiae* recombinantes *pho13Δ*.

Anos mais tarde, um trabalho utilizando engenharia evolutiva em meio contendo altas concentrações de xilose revelou uma linhagem de *S. cerevisiae* recombinante evoluída que continha uma única mutação no gene *PHO13* (causando a perda de sua função). Essa levedura

mutante apresentou um aumento de cinco vezes na taxa de consumo de xilose (KIM et al., 2013). Estes pesquisadores observaram que a enzima Pho13p tem atividade de desfosforilação sobre a xilulose-5-fosfato, e sugerem que a sobre-expressão da enzima xilulocinase (formando xilulose-5-fosfato) juntamente com a atividade de Pho13p (desfosforilando a xilulose-5-fosfato) pode formar um ciclo fútil de atividade enzimática que leva a depleção nos níveis de ATP e inibição do consumo de xilose. Portanto, mutantes *pho13Δ* parecem ter o efeito inibitório da sobre-expressão de *XKS1* aliviado (KIM et al., 2013). Dall Agnollo (2014) também obteve cepas industriais *pho13Δ* que apresentaram melhora na fermentação de xilose em meios com grandes concentrações desse açúcar, chegando até a 100 g.L⁻¹. Adicionalmente, outros trabalhos relacionaram a deleção do gene *PHO13* com um aumento na tolerância aos compostos inibidores da fermentação formados durante o pré-tratamento da biomassa, como ácido fórmico, ácido acético e furfural (FUJITOMI et al., 2012; LI et al., 2014).

Mais recentemente, Kim et al. (2015) demonstraram que a deleção do gene *PHO13* parece ativar um sistema de resposta ao estresse oxidativo, possivelmente através do fator de transcrição Stb5, relacionado a essa resposta celular. Nesse trabalho, uma análise do transcriptoma de leveduras *pho13Δ* revelou um aumento na expressão de genes relacionados à Via das Pentoses-Fosfato e à regeneração do NADPH, além do aumento na expressão do fator de transcrição Stb5. Em outro trabalho recente, Xu et al. (2016), analisando metabólitos produzidos e acumulados por linhagens de *S. cerevisiae* fermentadoras de xilose e *pho13Δ*, verificaram uma diminuição na acumulação de sedoepulose, um intermediário da Via das Pentoses-Fosfato. Nesse estudo, foi visto que as concentrações de sedoepulose-7-fosfato (um dos substratos da enzima transaldolase, codificada pelo gene *TALI*) foram reduzidas nas linhagens *pho13Δ*, o que sugere que a atividade de desfosforilação de Pho13p novamente pode estar causando ciclos de perda de ATP e, conseqüentemente, prejudicando o consumo de xilose (XU et al., 2016). Lee, Jellison e Alper (2014) e Bamba, Hasunuma e Kondo (2016), demonstraram que a deleção de *PHO13* também melhora as taxas de crescimento em xilose por linhagens recombinantes expressando xilose isomerases heterólogas.

Embora o exato mecanismo pelo qual a deleção do gene *PHO13* auxilia na metabolização da xilose ainda não esteja completamente esclarecido, todos esses diferentes grupos de pesquisa citados anteriormente confirmam que a deleção desse gene traz resultados

positivos na utilização da pentose em questão. Além disso, leveduras com o gene *PHO13* deletado não apresentam nenhum problema na esporulação, crescimento ou viabilidade celular (KANEKO et al., 1989), bem como, alguns trabalhos já demonstraram que o seu crescimento e o consumo de glicose não são afetados (VAN VLEET; JEFFRIES; OLSSON, 2008; KIM et al., 2015). Dessa forma, a deleção desse gene parece ser uma estratégia simples e promissora na busca pelo melhoramento da fermentação de xilose.

1.7 LINHAGENS DE *S. CEREVISIAE* PARA MANIPULAÇÃO GENÉTICA

Os estudos que utilizam transformações genéticas em leveduras para a otimização da fermentação de xilose têm sido usualmente realizados utilizando cepas de *S. cerevisiae* laboratoriais. As linhagens de laboratório geralmente são provenientes de trabalhos com engenharia genética pela qual adquiriram um ou mais defeitos em alguma via biossintética essencial – esses defeitos são conhecidos como marcadores auxotróficos (SHERMAN, 2001; AUSUBEL et al., 2003). Uma das cepas amplamente utilizada para estudos de engenharia molecular na área em questão é a CEN.PK2-1C, uma linhagem haploide e mutante auxotrófica incapaz de sintetizar os aminoácidos histidina, leucina e triptofano e a base nitrogenada uracila (ENTIAN; KOTTER, 1998). Essa característica permite a introdução de plasmídeos e/ou DNA linear carregando a sequência gênica desejada a ser expressa e um gene marcador que complementa a marcação auxotrófica, possibilitando a seleção de transformantes em meio de cultura carente do aminoácido ou base em questão (SHERMAN, 2001). Além disso, essa linhagem apresenta crescimento ótimo em várias fontes de carbono e esporula eficientemente (ENTIAN; KOTTER, 1998). Por isso, estudos têm utilizado essa levedura para experimentos de clonagem e expressão de genes que codificam xilose redutases e xilitol desidrogenases, o que têm possibilitado a análise da atividade das enzimas e seu desempenho no catabolismo da xilose (KONISHI et al. 2015; MOURO, 2016).

Existem também cepas de *S. cerevisiae* utilizadas como ferramentas para a análise de transportadores heterólogos. Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma linhagem de *S. cerevisiae* deletada nos principais genes para o transporte de hexoses (*hxt*-null) e com sobre-expressão (através de um plasmídeo integrativo) dos genes *XYL1* e *XYL2* de *S. stipitis* e o *XKS1* endógeno, obtendo uma

cepa com alta atividade de XR, XDH e XK, mas incapaz de transportar monossacarídeos como a xilose (GONÇALVES et al., 2014). Essa linhagem também é haploide e mutante auxotrófica para a base nitrogenada uracila, e está sendo utilizada para analisar novas permeases heterólogas, haja vista a possibilidade de analisar a contribuição específica de cada transportador expresso na fermentação de xilose (GONÇALVES et al., 2014; SALES et al., 2015).

Embora não sejam aplicadas diretamente nas dornas de fermentação para a produção industrial de etanol, as linhagens de *S. cerevisiae* laboratoriais têm sido excelentes ferramentas para identificar novos genes heterólogos, como por exemplo, genes que codificam enzimas e transportadores de xilose. Contudo, como visto anteriormente, pesquisadores têm demonstrado que *S. cerevisiae* requer modificações genéticas adicionais para uma efetiva fermentação de xilose. Assim, é importante que, antes das linhagens de *S. cerevisiae* laboratoriais receberem enzimas ou transportadores de xilose heterólogos, elas já estejam com as modificações genéticas adicionais que auxiliam na eficiente utilização da pentose em questão. Diante disso, o presente projeto se propôs a desenvolver linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* por meio da sobre-expressão do gene *XKSI* e/ou deleção do gene *PHO13* (modificações genéticas que, como visto, são capazes de melhorar a fermentação de xilose em linhagens recombinantes), para que essas linhagens possam ser utilizadas como plataformas para testes de enzimas e transportadores heterólogos envolvidos no metabolismo da xilose. Com isso, espera-se colaborar no aprimoramento da fermentação de xilose e, conseqüentemente, na produção do etanol 2G.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* como plataformas de análise de enzimas e transportadores heterólogos envolvidos na metabolização de xilose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes com o gene *XKSI* sobre-expresso e/ou com o gene *PHO13* deletado, a partir da linhagem laboratorial com múltiplas auxotrofias CEN.PK2-1C;
- Deletar o gene *PHO13* na linhagem de *S. cerevisiae* recombinante DLG-K1, linhagem sobre-expressando os genes necessários à metabolização de xilose (genes *XYL1*, *XYL2* e *XKSI*) e com os principais genes para o transporte de xilose deletados (*hxt*-null);
- Transformar as linhagens recombinantes acima com plasmídeos contendo genes que codificam enzimas ou transportadores de xilose heterólogos, e analisar as suas performances fermentativas em meios contendo xilose como fonte de carbono.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MEIOS DE CULTURA

As leveduras foram cultivadas em meios ricos YP (10 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ de peptona), em meios sintéticos (6,7 g.L⁻¹ de base nitrogenada), em meios sintéticos sem uracila (6,7 g.L⁻¹ de base nitrogenada sem aminoácidos, suplementado com 2 g.L⁻¹ de meio Drop Out sem a base uracila – Sigma Aldrich), ou em meios sintéticos sem uracila e sem histidina (6,7 g.L⁻¹ de base nitrogenada sem aminoácidos, suplementado com 1,4 g.L⁻¹ meio Drop Out sem os aminoácidos leucina, triptofano e histidina e a base uracila – Sigma Aldrich; acrescidos de 400 mg.L⁻¹ de leucina e 320 mg.L⁻¹ de triptofano). Todos os meios foram suplementados com a fonte de carbono de interesse (20 g.L⁻¹ de maltose, glicose ou xilose) e tiveram o pH ajustado para 5,0 com HCl ou NaOH. Para a preparação de meios sólidos foi adicionado 20 g.L⁻¹ de ágar. Quando necessário, os meios foram suplementados com 200 mg.L⁻¹ de Geneticina (G418 - Sigma), ou 500 mg.L⁻¹ de Zeocina (Invivogen) ou 0,5 mg.L⁻¹ de Aureobasidina-A (Takara-Bio), em condições assépticas. Quando utilizada a Zeocina, o pH do meio foi ajustado para 8,0. Todos os meios foram esterilizados por calor umido (autoclave a 120°C por 15 min) ou por filtração com membranas de nitrocelulose com 0,22 µm de porosidade. Para a propagação de plasmídeos, foi utilizada a linhagem DH5a da bactéria *Escherichia coli* crescida em meio Luria Bertani LB (10 g.L⁻¹ triptona, 5 g.L⁻¹ extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ cloreto de sódio) suplementado com 100 mg.L⁻¹ de Ampicilina

3.2 LINHAGENS DE LEVEDURAS UTILIZADAS

As linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho

| Linhagens | Genótipo ou descrição | Fonte |
|-------------------|---|-------------------------|
| CEN.PK2-1C | <i>MATa MAL2-8c ura3-52 his3Δ1 leu2-3/112 trp1-289</i> | Entian; Kotter (1998) |
| DLG-K1 | <i>MATa hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6 hxt5::LEU2 hxt7::HIS3 gal2Δ ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC2 AUR::pAUR-XKXDXHR</i> | Gonçalves et al. (2014) |
| BSY21-34B3 | <i>MATa MAL2-8c his3Δ1 trp1-289 loxP-KanMX-loxP-P_{ADHI}::iSUC2</i> | Muller (2013) |
| GMY08 | Isogênica à CAT-1 (Linhagem industrial, isolada na Usina VO Catanduva, SP, 1998/1999), mas <i>loxP-KanMX-loxP-P_{ADHI}::iSUC2 suc2::LoxP-Ble^r-LoxP P_{GPD}::AGT1</i> | Muller (2013) |
| ASY-1 | Isogênica à CEN.PK2.1C, mas <i>loxP-KanMX-loxP-P_{ADHI}::XKS1</i> | Este trabalho |
| ASY-2 | Isogênica à ASY-1, mas <i>pho13Δ::LoxP-Ble^r-LoxP</i> | Este trabalho |
| ASY-3 | Isogênica à DLG-K1, mas <i>pho13Δ::LoxP-Ble^r-LoxP</i> | Este trabalho |
| CEN.PK2-1C-xr-xdh | Isogênica à CEN.PK2.1C + pPGK-XR + pTEF-XDH | Este trabalho |
| ASY-1-xr-xdh | Isogênica à ASY-1 + pPGK-XR + pTEF-XDH | Mouro (2016) |
| ASY-2-xr-xdh | Isogênica à ASY-2 + pPGK-XR + pTEF-XDH | Este trabalho |
| ASY-1-xr-xdh-B | Isogênica à ASY-1 + pGPD-XR + pPGK-XDH | Este trabalho |
| ASY-2-xr-xdh-B | Isogênica à ASY-2 + pGPD-XR + pPGK-XDH | Este trabalho |

Tabela 1 – Linhagens de leveduras utilizadas neste trabalho (continuação)

| Linhagens | Genótipo ou descrição | Fonte |
|------------------|--------------------------------|-------------------------|
| DLG-K1-Sut4 | Isogênica à DLG-K1 + pGPD-SUT4 | LBMBL-UFSC ^a |
| ASY-3-Sut4 | Isogênica à ASY-3 + pGPD-SUT4 | Este trabalho |
| DLG-K1-Xut1 | Isogênica à DLG-K1 + pPGK-Xut1 | Sales et al. (2015) |
| ASY-3-Xut1 | Isogênica à ASY-3 + pPGK-Xut1 | Este trabalho |

NOTA: ^a Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras – UFSC.

3.3 TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.3.1 Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA das leveduras inicialmente, as células foram pré-crescidas em 3 mL de meio líquido YP contendo 20 g.L⁻¹ de glicose ou maltose como fontes de carbono durante um período de 24 horas a 28°C com agitação de 160 rpm. Logo após, a cultura foi centrifugada (3.000 g, 5 min), o sobrenadante foi descartado e as células foram utilizadas em um kit comercial de extração de DNA de leveduras (YeastStar Genomic DNA Kit™, Zymo Research) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, o DNA genômico foi ressuspenso em 60 µL de água deionizada (MilliQ) autoclavada e a amostra foi armazenada em freezer a -20 °C para utilização posterior.

3.3.2 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*)

No intuito de se obter os módulos de sobre-expressão e de deleção, foram realizadas reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para isso, utilizou-se a enzima de alta fidelidade Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) e o termociclador Mastercycler Gradient® (Eppendorf). As condições utilizadas para as reações de PCR foram as seguintes: 50 ng DNA, Tampão Phusion HF® 5x (F518),

dNTPs 10 mM, 5 μ M de cada iniciador, 1 U da enzima Phusion e água deionizada para completar o volume para 600 μ L. A mistura total foi dividida em 24 tubos Eppendorfs com capacidade para 200 μ L (Eppendorf para PCR) contendo 25 μ L da mistura em cada. As reações de amplificação do módulo de sobre-expressão foram realizadas no termociclador com os seguintes passos: desnaturação inicial de 98 °C por 20 segundos; seguida de 30 ciclos com desnaturação de 98 °C por 10 segundos, anelamento dos iniciadores com temperatura de 50 °C por 20 segundos e mais um passo de extensão das fitas de 72 °C por 15–30 segundos/Kb, além de um passo final de extensão de 72 °C por 7 min. Para a amplificação dos módulos de deleção, foram utilizados os mesmos passos descritos acima, com exceção da temperatura de anelamento dos iniciadores, que foi de 59 °C. Também foram utilizadas reações de PCR para clonagem do gene que codifica a enzima XR de *S. arborariae* no plasmídeo pGPD, conforme será detalhado nas seções abaixo. Para essas reações, também foi utilizada a enzima Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) com os mesmos passos anteriormente descritos, com exceção da temperatura de anelamento, que foi de 51 °C.

Foram utilizadas também reações de PCR para a verificação das construções genômicas. Para as verificações, as reações de PCR foram realizadas utilizando a enzima GoTaq® DNA Polimerase (Promega). As condições utilizadas para estas reações foram as seguintes: 50 ng de DNA, Tampão Green® 5x, dNTPs 200 μ M, 5 μ M de cada iniciador, 0,75 U da enzima GoTaq® e água deionizada para completar o volume total de 50 μ L. As reações de verificação para o módulo de sobre-expressão foram realizadas no termociclador com os seguintes passos: desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos; seguida de 30 ciclos com desnaturação de 95 °C por 1 min, anelamento dos iniciadores com temperatura de 55 °C por 1 min e um passo de extensão das fitas de 72 °C por 30-60 segundos/Kb, com extensão final de 72 °C por 5 min. Para a verificação do módulo de deleção foram utilizados os mesmos passos descritos acima, com exceção da temperatura de anelamento dos iniciadores, que foi de 50 °C.

3.3.3 Eletroforese em Gel de Agarose

A análise dos fragmentos de DNA lineares obtidos por meio das reações de PCR e os plasmídeos utilizados e/ou construídos foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose. Para isso, o gel utilizado consistiu numa mistura de 1% de agarose em tampão TBE (45 mM Tris-

borato, 1 mM EDTA em pH 8,0) contendo $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de brometo de etídio (intercalante de DNA) – este último foi utilizado para observação das bandas em luz ultravioleta. Após a obtenção dos fragmentos desejados, um volume de 10 μL (diluídos em tampão de corrida 6x concentrado) da amostra foi aplicado em poços do gel de agarose, e 6 μL do marcador de peso molecular de 1 kb ladder (BioLabs®) foram corridos conjuntamente em poços paralelos. Em seguida, o gel foi submetido à eletroforese em mesmo Tampão TBE, a 100 V por 60-90 min. Após o término do tempo, o gel foi analisado e fotografado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (BioRad).

3.3.4 Obtenção dos Módulos de Sobre-expressão e de Deleção

Para a obtenção dos módulos de sobre-expressão e de deleção, inicialmente, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores. Para isso, foi utilizada a ferramenta auxiliar para desenho de iniciadores disponibilizada online pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT) (www.idtdna.com) e o banco de dados *Saccharomyces Genome Database* (SGD) (www.yeastgenome.org) – este último foi utilizado para obter as sequências de nucleotídeos das regiões de interesse no genoma das leveduras. Os iniciadores para recombinação homóloga foram desenhados para conter regiões de homologia a uma região do DNA alvo no genoma da levedura (aproximadamente 40 nucleotídeos), seguidos de uma sequência (aproximadamente 20 nucleotídeos) que permitiu amplificar os módulos de sobre-expressão e deleção presentes nos genomas das linhagens BSY21-34B3 e GMY08, respectivamente. Adicionalmente, foram desenhados também iniciadores para a verificação das recombinações realizadas com os módulos de sobre-expressão e de deleção gênica. Todos os iniciadores utilizados e suas sequências estão descritos na Tabela 2. Alguns dos iniciadores utilizados neste trabalho já haviam sido desenhados em outros projetos, conforme referenciados na Tabela 2.

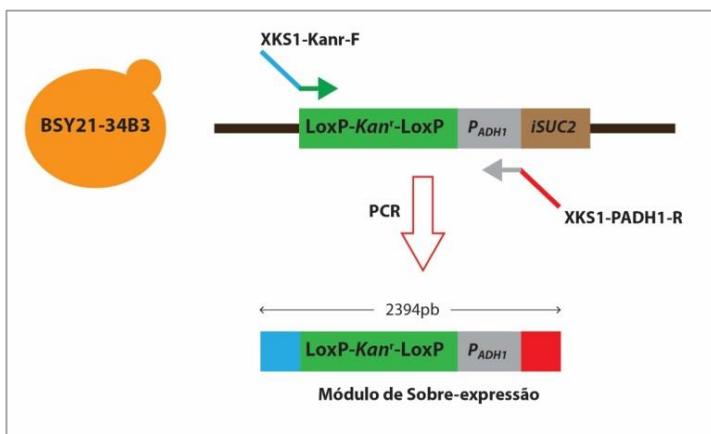
Tabela 2 – Oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados neste trabalho

| Iniciador | Sequência 5'→3' ^b | Referência |
|---------------------|---|--------------------|
| Recombinação | | |
| XKS1-Kanr-F | ATTCGGCCAATGCAATCTCAG <u>GCGGACGAATAAGGGGGCC</u> <u>CAGCTGAAGCTTCGTACGC</u> | Este trabalho |
| XKS1-PADH1-R | AAACCTCTCTTGTCTGTCTCT <u>GAATTACTGAACACAACATTG</u> <u>TATATGAGATAGTTG</u> | Este trabalho |
| DE-PHO13-F1 | CTTATAGCTTGCCCTGACAAA <u>GAATATACAACTCGGGAAACC</u> <u>AGCTGAAGCTTCGTACGC</u> | Dall Agnolo (2014) |
| DE-PHO13-R1 | TTCAAAAAGTAATTCTACCCC <u>TAGATTTTGCATTGCTCCTGC</u> <u>ATAGGCCACTAGTGGATC</u> | Dall Agnolo (2014) |
| Verificação | | |
| V-XKS1-F | CAAGCGACGCAGGGAATAGCC | Este trabalho |
| V-XKS1-R | CTTCGTTCAAGTCTCTGTTGTGA GC | Este trabalho |
| V-kanr-F | CCGGTTGCATTTCGATTCC | Bücker (2014) |
| IE-PHO13-F | GGAAGTAGATTGTTTCGACGC | Dall Agnolo (2014) |
| VE-PHO13-F | GATACGCCGTTTCGATGCAG | Dall Agnolo (2014) |
| V-Bler-F | CCTTCTATGAAAGTTGGGC | Dall Agnolo (2014) |
| Clonagem | | |
| XR forward | ATGAATTCATGGCTACTATTAA ATTATCC | Mouro (2016) |
| XR reverse | TTGGATCCCTTAAACAAAGATTG GAATGTT | Mouro (2016) |

NOTA: ^b Os iniciadores F (forward) são complementares às fitas 3'→5', os iniciadores R (reverse) são complementares as fitas 5'→3'. Nos iniciadores para Recombinação, as sequências sublinhadas permitem a amplificação dos módulos de deleção e sobre-expressão, enquanto que as sequências em negrito são para a recombinação homóloga. Nos iniciadores para Clonagem, as sequências sublinhadas representam sítios para as enzimas de restrição BamH1(GGATCC)e EcoR1 (GAATTC).

Para a obtenção do módulo de sobre-expressão, utilizou-se o DNA extraído da linhagem de levedura recombinante BSY21-34B3 (MULLER, 2013). Essa linhagem possui em seu genoma o gene *iSUC2* (gene que codifica a enzima invertase intracelular) que está sendo controlado pelo promotor forte e constitutivo do gene *ADHI* (P_{ADHI}), gene que codifica a enzima álcool desidrogenase em *S. cerevisiae*, e, imediatamente à montante do promotor P_{ADHI} desta linhagem, está o gene *Kan^r*, que confere resistência ao antibiótico geneticina em leveduras. Com o intuito de amplificar o gene *Kan^r* juntamente com o promotor do gene *ADHI*, realizaram-se reações de PCR utilizando o DNA extraído da levedura BSY21-34B3 e os iniciadores XKS1-Kanr-F e XKS1-PADH1-R (Tabela 2). Os fragmentos de DNA lineares obtidos, com aproximadamente 2394pb e contendo o gene *Kan^r* e o promotor do gene *ADHI*, foram denominados “Módulos de Sobre-expressão” (Figura 4). Esses fragmentos possuem em suas extremidades regiões de homologia à montante (correspondente aos 40 nucleotídeos anteriores ao códon de iniciação) e ao início (correspondente aos 40 nucleotídeos posteriores ao códon de iniciação) do gene *XKS1*.

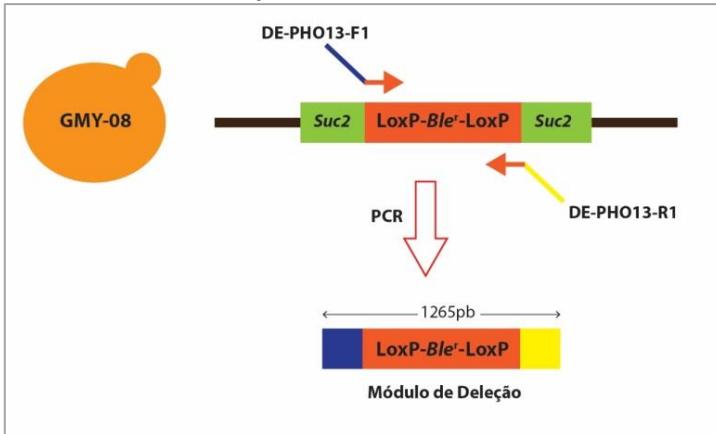
Figura 4 - Construção do Módulo de Sobre-expressão. Iniciadores contendo regiões homólogas à montante (em azul) e no início (em vermelho) do gene *XKS1* e que também possuem regiões complementares ao início do gene *Kan^r* (em verde) e ao fim do promotor do gene *ADHI* (em cinza) produziram, por reação de PCR com o DNA extraído da levedura BSY21-34B3, um fragmento de DNA com aproximadamente 2394pb, denomina Módulo de Sobre-expressão.



Fonte: Este trabalho

Para a obtenção do módulo de deleção, utilizou-se o DNA extraído da linhagem de levedura recombinante GMY08 (MULLER, 2013). Essa linhagem possui em seu genoma o gene *Suc2* (gene que codifica a enzima invertase extracelular) truncado (não funcional) por conter em seu interior o gene *Ble^r*, que confere resistência ao antibiótico zeocina em leveduras. Para amplificar o gene *Ble^r*, realizaram-se reações de PCR utilizando o DNA extraído da levedura GMY08 e os iniciadores DE-PHO13-F1 e DE-PHO13-R1 (Tabela 2). Os fragmentos de DNA lineares obtidos, com aproximadamente 1265pb e contendo o gene *Ble^r*, foram denominados “Módulos de Deleção” (Figura 5). Esses fragmentos possuem em suas extremidades regiões de homologia à montante (correspondente aos 40 primeiros nucleotídeos logo após o códon de iniciação) e a jusante (correspondente aos 40 nucleotídeos anteriores ao códon de terminação) do gene *PHO13*.

Figura 5 - Construção do Módulo de Deleção. Iniciadores contendo regiões homólogas à região no início (em roxo) e no fim (em amarelo) do gene *PHO13* e que também possuem regiões complementares ao início e ao fim do gene *Ble^r* (laranja) produziram, por reação de PCR com o DNA extraído da levedura GMY-08, um fragmento linear de DNA com aproximadamente 1265pb, denominado Módulo de Deleção.



Fonte: Este trabalho

3.3.5 Concentração dos fragmentos de DNA amplificados

Confirmado a obtenção dos módulos de sobre-expressão e de deleção gênica com o tamanho esperado (através de eletroforese em gel

de agarose), os produtos amplificados por PCR em 24 tubos (25 μL cada) foram concentrados em um único Eppendorf através da precipitação do DNA, conforme descrito por Dall Agnolo (2014). Para isso, ao tubo contendo os módulos de deleção adicionou-se 30 μL de solução 3 M de cloreto de sódio e 750 μL de etanol absoluto gelado (etanol 100% a -20°C), e em seguida foi estocado em freezer -20°C por cerca de 16 horas. A seguir, o tubo foi centrifugado (10.000 g, 15 min, 4°C), o sobrenadante desprezado, e o DNA lavado com 1 mL de etanol 70% gelado (a -20°C). Após, foi realizada nova centrifugação (10.000 g, 7 min, 4°C), o sobrenadante foi desprezado e o tubo mantido em capela de fluxo laminar por 30 min para a secagem do etanol remanescente. Finalmente, o DNA precipitado dos 24 tubos de PCR foi ressuspenso em 50 μL de água deionizada estéril, e a solução contendo o módulo de deleção foi mantida a -20°C até sua utilização para transformação das linhagens.

3.3.6 Modificações genômicas em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras foram modificadas através de recombinação homóloga, conforme metodologia descrita por Gietz e Woods (2006). Inicialmente, as linhagens de interesse foram pré-crescidas em meios YP contendo 20 g.L^{-1} de glicose ou maltose como fontes de carbono em um volume de 3 mL a 28°C e 160 rpm. Em seguida, 1,5 mL do pré-cultivo foi transferido para um frasco Erlenmeyer com capacidade para 250 mL com 50 mL de meio YP contendo 20 g.L^{-1} de glicose ou maltose. O meio de cultura foi incubado a 28°C e 160 rpm até atingir absorbância ($\text{ABS}_{600\text{nm}}$) de aproximadamente 1 (fase exponencial de crescimento celular). Então, a cultura foi centrifugada (3.000 g, 5 min), o sobrenadante descartado, e as células foram gentilmente ressuspenso em 1 mL de solução 0,1 M de acetato de lítio estéril. Em seguida, as células foram centrifugadas (3.000 g, 5 min), o sobrenadante descartado e as células foram gentilmente ressuspenso em 400 μL de 0,1 M de acetato de lítio estéril. Logo após, 50 μL dessa suspensão celular foi adicionada a um novo tubo (Eppendorf) e foi acrescentado 300 μL de solução PLI (0,1 M de acetato de lítio, 40% de polietileno glicol - PEG), além de 5 μL de DNA de fita simples (10 g.L^{-1} de DNA de esperma de salmão, previamente incubado em Banho Maria a 100°C por 5 min e resfriado rapidamente em banho de gelo) e 50 μL do DNA do módulo

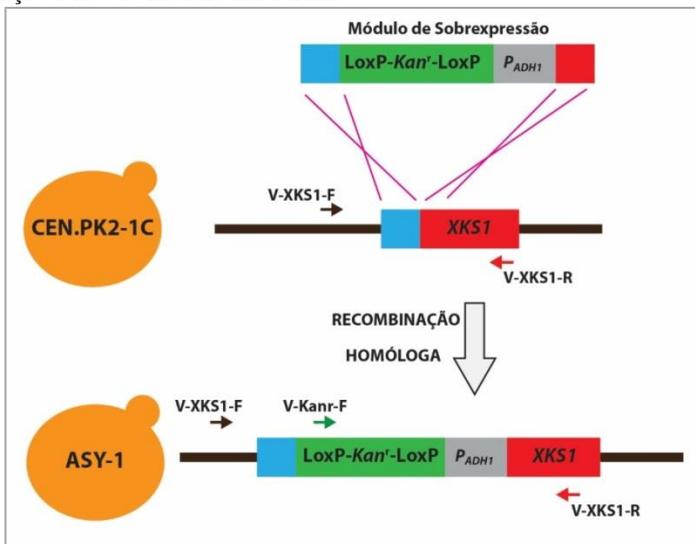
para transformação (módulo de sobre-expressão ou de deleção), ou o mesmo volume de água deionizada estéril nos controles negativos. As suspensões celulares foram gentilmente agitadas e em seguida incubadas em Banho Maria a 42 °C por 40 min (sendo gentilmente agitadas a cada 5 min).

Após a incubação em banho maria, os tubos foram centrifugados (3.000 g, 5 min) e o sobrenadante desprezado. Em seguida, um volume de 1 mL de meio YP contendo 20 g L⁻¹ de glicose ou maltose foi adicionado ao tubo para ressuspender as células (gentilmente). Os tubos foram incubados a 28 °C por 4 h sob agitação orbital de 160 rpm, e então centrifugados (3.000 g, 5 min) e o sobrenadante desprezado. As células foram, então, ressuspensas utilizando 200 µL de água deionizada estéril, e inoculadas na superfície de placas de Petri com meio YP contendo 20 g.L⁻¹ de glicose ou maltose, acrescidos de 200 mg.L⁻¹ de geneticina ou 500 mg.L⁻¹ de zeocina. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C de 3 a 5 dias, até surgirem colônias de células na superfície do meio. As colônias que cresceram foram repicadas para novas placas contendo o mesmo tipo de meio e condições de cultivo utilizado anteriormente. Após o crescimento, as células foram utilizadas para confirmação da inserção das modificações no genoma das linhagens, conforme descrito a seguir.

3.3.6.1 Sobre-expressão do gene *XKS1*

Como detalhado anteriormente, as linhagens foram modificadas através do processo de recombinação homóloga. Utilizando essa metodologia, inicialmente, a linhagem CEN.PK21-C teve a região promotora do gene *XKS1* modificada. Para isso, os fragmentos de DNA lineares chamados “Módulos de Sobre-expressão” (amplificados a partir do genoma da linhagem BSY21-34B3, conforme descrito na seção 3.3.4) foram inseridos a montante do gene *XKS1* na linhagem CEN.PK-1C (Figura 6). Após recombinação homóloga, a linhagem recombinante foi selecionada em placas de Petri com meio de cultivo contendo geneticina, e foi denominada ASY-1. A verificação da transformação foi realizada utilizando reações de PCR com os iniciadores V-XKS1-F, V-XKS1-R e V-Kanr-F (Tabela 2, Figura 6).

Figura 6 - Sobre-expressão do gene *XKS1*. O fragmento de DNA linear “Módulo de Sobre-expressão” contendo regiões de homologia à região a montante (em azul) e no início (em vermelho) do gene *XKS1*, por recombinação homóloga, foi inserido à montante desse gene na linhagem CEN.PK2-1C, originando a linhagem ASY-1. Após a sobre-expressão, os iniciadores V-XKS1-F, V-XKS1-R e V-Kanr-F foram utilizados para a verificação da presença ou não do módulo nas células.

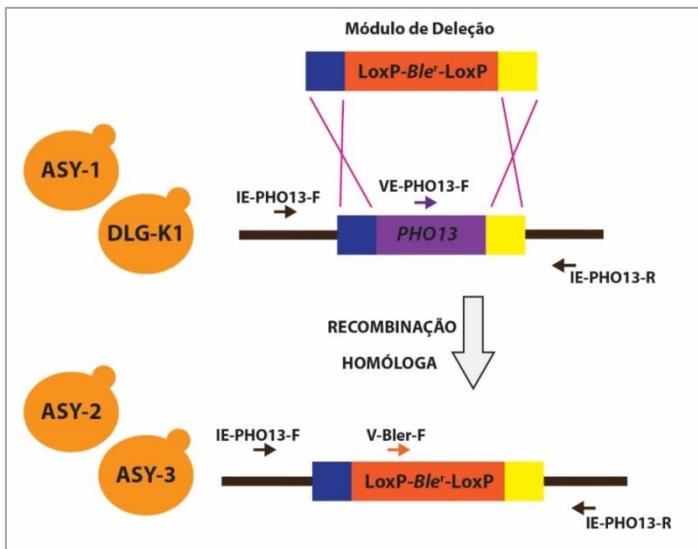


Fonte: Este trabalho

3.3.6.2 Deleção do gene *PHO13*

A linhagem recém construída ASY-1 teve, então, seu gene *PHO13* deletado. Para isso, os fragmentos de DNA lineares chamados “Módulos de Deleção” (amplificados a partir do genoma da linhagem GMY-08, conforme descrito na seção 3.3.4) foram inseridos, por recombinação homóloga, no local do gene *PHO13* na linhagem ASY-1 (Figura 7). Após recombinação homóloga, a linhagem recombinante foi selecionada em placas de Petri com meio de cultivo contendo zeocina, e foi denominada ASY-3. A verificação da transformação foi realizada utilizando reações de PCR com os iniciadores IE-PHO13-R, IE-PHO13-F, VE-PHO13-F e V-Bler-F (Tabela 2). O mesmo procedimento de deleção do gene *PHO13* foi realizado na linhagem DLG-K1, originando, após recombinação homóloga, a linhagem ASY-3 (Figura 7).

Figura 7 - Deleção do gene *PHO13*. O fragmento de DNA linear “Módulo de Deleção” contendo regiões de homologia à região no início (em roxo) e no fim (em amarelo) do gene *PHO13*, por recombinação homóloga, substituiu esse gene pelo gene *Ble^r* nas linhagens ASY-1 e DLG-K1, originando, respectivamente, as linhagens ASY-2 e ASY-3. Após a deleção, os iniciadores IE-PHO13-R, IE-PHO13-F, VE-PHO13-F e V-Bler-F foram utilizados para a verificação da presença ou não do módulo nas células.



Fonte: Este trabalho

3.3.7 Transformação das linhagens recombinantes com plasmídeos de expressão

As linhagens recombinantes construídas (ASY-1, ASY-2 e ASY-3), bem como as linhagens parentais (CEN.PK.21-C e DLG-K1) foram transformadas com plasmídeos multicópia contendo genes que codificam enzimas ou transportadores heterólogos, por meio de método com acetato de lítio (GIETZ et al., 1992). Para isso, inicialmente, as linhagens de interesse foram pré-cultivadas em meios YP contendo 20 g.L⁻¹ de glicose ou maltose como fontes de carbono em um volume de 3 mL. Em seguida, 1,5 mL do pré-cultivo foi transferido para um frasco YP com 20 g.L⁻¹ de glicose ou maltose. O meio de cultura foi incubado a 28 °C e 160 rpm até atingir ABS_{600nm} de aproximadamente 1. 9 mL da cultura foram centrifugados (3000 g, 5 min), lavados com água destilada estéril, seu sobrenadante descartado, e as células foram gentilmente ressuspensas em 300 µL de solução TE/AcLi (110 µL de solução de 1

mM de EDTA e tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 110 μL acetato de lítio 1 M e 780 μL H₂O miliQ estéril). Aproximadamente 50 μL da suspensão celular formada com TE/AcLi foram adicionados a um novo tubo (Eppendorf) e foram acrescentados 5 μL de DNA de fita simples (10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DNA de esperma de salmão, previamente incubado em Banho Maria a 100 °C por 5 min e resfriado rapidamente em banho de gelo), 20 μL do plasmídeo de interesse (aproximadamente 1-5 ηg de plasmídeo), além de 340 μL de solução PEG/AcLi (125 μL de solução de 1 mM de EDTA e tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 125 μL acetato de lítio 1 M e 1 mL de polietileno glicol – PEG a 50%). Para os controles negativos foram utilizados 20 μL de água destilada estéril ao invés do plasmídeo. Os tubos foram, então, incubados a 30 °C por 30 min com agitação de 160 rpm. Em seguida, foram adicionados aos tubos 40 μL de DMSO (Dimetilsulfóxido), os mesmos foram agitados gentilmente e incubados em Banho Maria a 42°C por 40 min (sendo gentilmente agitados a cada 5 min).

Após a incubação em Banho Maria, os tubos foram centrifugados (3000 g, 2 min) e o sobrenadante desprezado. Em seguida, um volume de 1 mL de meio YP contendo 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose ou maltose foi adicionado aos tubos para ressuspender as células (gentilmente). Os tubos foram incubados a 28 °C por 90 min sob agitação de 160 rpm, e então centrifugados (3000 g, 2 min) e o sobrenadante desprezado. As células foram, então, ressuspensas utilizando 200 μL de água destilada estéril, e inoculadas na superfície de placas de Petri com meios mínimos contendo 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose ou maltose, sem uracila ou sem uracila e sem histidina (dependendo das marcações autoxtróficas presentes nos plasmídeos de interesse). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C de 3 a 5 dias, até surgirem colônias de células na superfície do meio. As colônias que cresceram foram repicadas para novas placas contendo o mesmo tipo de meio e condições de cultivo utilizado anteriormente. Após o crescimento, as células foram utilizadas para confirmação da inserção dos plasmídeos. Todos os plasmídeos utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Plasmídeos utilizados neste trabalho

| Plasmídeo | Genótipo relevante | Fonte ou referência |
|-----------|---|-------------------------|
| pPGK | <i>URA3</i> PGK1p-PGK1t | Watanabe et al. (2007c) |
| pPGK-XR | PGK1p-XR(<i>S. arborariae</i> 19.1a)-PGK1t | Mouro (2016) |
| pPGK-XDH | PGKp-XDH(<i>S. passalidarum</i> H.M.D.-16.2)-PGK1t | Mouro (2016) |
| pTEF-423 | <i>HIS3</i> TEFp-CYC1t | ATCC® |
| pTEF-XDH | TEFp-XDH(<i>S. passalidarum</i> H.M.D.-16.2)-CYC1t | Mouro (2016) |
| pGPD-423 | <i>HIS3</i> GPDp-CYC1t | ATCC® |
| pGPD-XR | GPDp-XR(<i>S. arborariae</i> 19.1a)-GPDt | Este trabalho |
| pGPD-SUT4 | GPDp-SUT4(<i>S. arborariae</i> 19.1a)-CYC1t | LBMML-UFSC ^a |
| pPGK-XUT1 | PGK1p-XUT1(<i>S. Stipitis</i> NBRC1687)-PGK1t | Sales et al. (2015) |

NOTA: ^aLaboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras – UFSC

3.3.8 Clonagem do gene que codifica a enzima XR de *S. arborariae* no plasmídeo pGPD.

Foi realizada também a clonagem do gene que codifica a enzima XR de *S. arborariae* no plasmídeo pGPD. Para isso, inicialmente, foi amplificado o gene que codifica a enzima XR de interesse utilizando DNA extraído da linhagem *S. arborariae* 19.1a e reações de PCR (vide seção 3.1.2) com os iniciadores XR forward e XR reverse (Tabela 2) contendo, em suas extremidades, sítios de restrição para as enzimas EcoRI e BamHI. Após, foi verificada a correta amplificação do fragmento de ≈1000pb através de eletroforese em gel de agarose. Posteriormente, os fragmentos de DNA amplificados foram purificados utilizando o kit GFX PCR DNA and Gel Band purification (GE Healthcare) e foram, então, digeridos com as enzimas de restrição

EcoRI e BamHI por 1 hora a 37 °C. Conjuntamente, foi também digerido com as mesmas enzimas de restrição o plasmídeo pGPD. Em seguida, o plasmídeo pGPD e os fragmentos de DNA previamente digeridos foram ligados com a enzima T4 ligase (Thermo Scientific) por 3 horas à 22 °C. Os plasmídeos com seus respectivos fragmentos foram inseridos em *E. coli* DH5 α , através do método de cloreto de cálcio (AUSUBEL et al., 2003). Para isso, 1-5 μ g de plasmídeo foi adicionado a 80 μ L de células de *E. coli* DH5 α competentes (previamente tratadas com 60 mM CaCl₂ contendo 15% glicerol em tampão 10 mM Pipes, pH 7,0) e mantidas no gelo por 10 min. Em seguida, as células foram incubadas a 42°C por 2 min, resfriadas em gelo por 1 min, adicionado 500 μ L de meio LB e incubados a 37°C por 1 hora a 160 rpm. Após a incubação, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 200 μ L de meio LB. Após, a suspensão celular foi plaqueada em placas de meio LB sólido contendo 100 mg.L⁻¹ de ampicilina. Os plasmídeos foram extraídos das bactérias por protocolo de lise alcalina (AUSUBEL et al., 2003), e foram denominados pGPD-XR (Tabela 3).

3.4 DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS

Para determinação da atividade das enzimas xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulocinase (XK), foi utilizado o extrato celular das linhagens de *S. cerevisiae* de interesse. Para obtenção do extrato celular foi utilizado protocolo descrito por Mouro (2016). Para isso, as linhagens foram, inicialmente, crescidas em 5 ml de meio YP, ou de meios mínimos sem uracila e sem histidina contendo 2% de glicose ou maltose como fontes de carbono, por 24 h à 30°C. Então, as células foram centrifugadas e lavadas com água destilada a 4 °C e ressuspensas em água destilada de modo a atingirem a concentração de 20 g.L⁻¹. Uma alíquota de 100 μ L da suspensão celular foi centrifugada (3.000 g, 5 min) e lavada com 500 μ L do tampão A (100 mM Mops-NaOH pH 6,8). Logo após, as células foram novamente centrifugadas (3.000 g, 5 min) e ressuspensas em 200 μ L de tampão B (100 mM MOPS pH 6,8, contendo 20% glicerol, 0,5mM EDTA, 0,5M DTT) e foi adicionado à suspensão celular 200 μ L de bolinhas de vidro (425-600 μ m lavadas em ácido - Sigma Aldrich). A mistura foi vortexada para lisar as células e, então, foi centrifugada (12.000 g, 5 min), e o

sobrenadante utilizado para as dosagens de atividade enzimática da XR, XDH e XK.

As concentrações protéicas nos extratos celulares foram determinadas pelo método de Bradford (1976), em que 25 μL de amostra foi incubada com 225 μl de reagente Bradford por 15 min a 37° C. Em seguida, a mistura foi lida em placas de 96 poços a 595 e 465 nm no equipamento TECAN Infinite M2000. A razão das absorbâncias (595/465 nm) foi utilizada para os cálculos posteriores. A concentração de proteína foi determinada pela correlação das absorbâncias das amostras com a equação da reta obtida através de uma curva padrão construída com soluções padrão de albumina entre 0 e 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Para a determinação da atividade da enzima XR, foi monitorada a oxidação dos cofatores NADPH ou NADH a 340 nm e 30°C em espectrofotômetro, conforme metodologia descrita por Smiley e Bolen (1982) e Walfridsson et al. (1997). O tampão utilizado para essa análise foi o seguinte: 45 mM de tampão Fosfato de Potássio (pH 6,0), 200 mM de xilose, 0,15 mM de NADPH ou NADH e 10 μL de extrato enzimático. O volume final das reações foi de 1 mL.

Para a determinação da atividade da enzima XDH, foi monitorada a redução do cofator NAD^+ a 340 nm e 35°C, conforme metodologia descrita por Smiley e Bolen (1982) e Walfridsson et al. (1997). O tampão utilizado para essa análise foi o seguinte: 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM de MgCl_2 , 300 mM de xilitol, 1 mM de NAD^+ e 10 μL de extrato enzimático. O volume final das reações foi de 1 mL.

Para a determinação da atividade da enzima XK, foi utilizado um protocolo que envolve uma série de reações acopladas, conforme descrito por Eliasson et al. (2000). Nessas reações, adenosina difosfato (ADP) liberado pela atividade da enzima XK é utilizado pela enzima piruvato cinase (PK) para a síntese de piruvato, que é, então, reduzido a lactato pela enzima lactato-desidrogenase (LDH), com produção de NAD^+ e utilização do cofator NADH – a utilização deste último é, então, quantificada em espectrofotômetro a 340 nm. O tampão utilizado para essa análise foi o seguinte: 100 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,0), 2 mM de MgCl_2 , 8 mM de NaF, 2 mM de adenosina trifosfato (ATP), 0,2 mM de fosfoenol piruvato, 3 mM de glutatona reduzida, 10 U de PK, 10 U de LDH, 0,2 mM de NADH, 8,5 mM de D-xilulose, e 10 μL de extrato enzimático. O volume final das reações foi de 1 mL. Para todas as análises enzimáticas, o resultado foi expresso em $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à

quantidade de enzima capaz de reduzir ou oxidar 1 μmol de NAD^+ ou NAD(P)H por minuto.

3.5 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

As linhagens de *S. cerevisiae* parentais e as recombinantes (com sobre-expressão do gene *XKSI* e/ou deleção do gene *PHO13*), após serem transformadas com plasmídeos de expressão contendo os genes de interesse, foram submetidas à análise dos perfis de crescimento celular, consumo de glicose e/ou xilose e produção de metabólitos. Para isso, as leveduras foram, primeiramente, pré-cultivadas por 48 h em meios sintéticos sem uracila ou sem uracila e sem histidina contendo 2% de glicose, xilose ou maltose como fontes de carbono. Em seguida, as leveduras do pré-cultivo foram inoculadas em novos frascos Erlenmeyer com meios sintéticos sem uracila ou sem uracila e sem histidina contendo 2% de glicose e/ou xilose como fontes de carbono e com 1/5 do volume do frasco preenchido com meio de cultura. Todas as culturas foram incubadas a 28°C e 160 rpm. Em tempos pré-determinados, amostras foram retiradas desses meios para determinação do crescimento celular por densidade óptica $\text{ABS}_{600\text{nm}}$ em espectrofotômetro e, ainda, outras amostras foram retiradas, centrifugadas e seus sobrenadantes armazenados em microtubos para posterior determinação do consumo dos açúcares e produção metabólitos.

3.6 ENSAIO FERMENTATIVO

Para o ensaio de fermentação em batelada, as leveduras foram cultivadas em 100 mL (em frasco Erlenmeyer com capacidade para 500 mL) de meios sintéticos sem uracila ou sem uracila e sem histidina contendo 2% de glicose, xilose ou maltose como fontes de carbono. Após aproximadamente 30 horas, as células foram lavadas com água destilada estéril a 4 °C e ressuspensas em água destilada estéril até atingir uma concentração de 20 g.L^{-1} . Uma alíquota de 10 mL da suspensão celular foi adicionada a 10 mL de meio sintético sem uracila ou sem uracila e sem histidina contendo 2% de glicose e/ou xilose como fontes de carbono, porém duas vezes concentrado, em frascos de 20mL

com tampa fechada. A concentração inicial de células para a fermentação foi, então, de 10 g.L^{-1} . O frasco foi incubado sob agitação com barra magnética a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, conferindo condição microaeróbia. Em tempos pré-determinados, amostras foram retiradas desses meios para determinação do crescimento celular por densidade óptica $\text{ABS}_{600\text{nm}}$ em espectrofotômetro e, ainda, outras amostras foram retiradas, centrifugadas e seus sobrenadantes armazenados em microtubos para posterior determinação do consumo dos açúcares e produção de metabólitos. Para as fermentações em batelada, quando necessário, o valor de absorvância (ABS) medido em espectrofotômetro à 600nm foi convertido em biomassa seca em g.L^{-1} , por meio da multiplicação do valor de $\text{ABS}_{600\text{nm}}$ pelo fator de conversão 0,27 para *S. cerevisiae* (DÁRIO, 2012).

Para as fermentações, o consumo de xilose e a produção de etanol foram transformadas em velocidades de consumo (V_s) ou velocidade de produto formado (V_e), por meio do cálculo da velocidade média. Para esse cálculo, utilizou-se o total máximo consumido e/ou produzido, em g.L^{-1} , dividido pela total de horas de incubação.

3.7 DETERMINAÇÃO DOS SUBSTRATOS E PRODUTOS DOS CRESCIMENTOS E FERMENTAÇÕES

A partir das amostras retiradas durante os cultivos, foram efetuadas as dosagens de glicose, xilose, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), nas seguintes condições: coluna HyperREZ XP ácido orgânico (Thermo Scientific), fase móvel com ácido sulfúrico 5 mM, fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ durante 30 min, temperatura da coluna de 50°C e detecção por índice de refração (IR-2031 plus, Jasco). As curvas de calibração foram estabelecidas utilizando quatro concentrações diferentes de glicose, xilose, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MODIFICAÇÕES GENÔMICAS EM LINHAGENS DE *S. CEREVISIAE*

Nos últimos anos, melhorar a capacidade de *S. cerevisiae* em metabolizar a xilose tem sido um dos grandes desafios na busca pela produção em grande escala do etanol 2G. Nesse sentido, ainda existem gargalos que precisam ser eliminados, tais como melhorar o transporte de xilose e a busca por enzimas eficientes para o metabolismo intracelular dessa pentose (MOYSES et al., 2016). Entretanto, como abordado na introdução deste trabalho, pesquisadores têm demonstrado que *S. cerevisiae* requer modificações genéticas endógenas adicionais para uma efetiva fermentação de xilose; entre elas, a sobre-expressão do gene *XKSI* (que codifica a enzima xilulocinase) e a deleção do gene *PHO13* (que codifica uma fosfatase alcalina) estão sendo demonstradas como modificações capazes de melhorar a utilização de xilose em linhagens recombinantes (HO; CHEN; BRAINARD, 1998; TOIVARI et al., 2001; NI; LAPLAZA; JEFFRIES, 2007; VAN VLEET; JEFFRIES; OLSSON, 2008; FUJITOMI et al., 2012; KIM et al., 2013; LEE; JELLISON; ALPER, 2014; LI et al., 2014; KIM et al., 2015; SAKIHAMA et al., 2015; BAMBA; HASUNUMA; KONDO, 2016; XU et al., 2016)

No presente trabalho, foram desenvolvidas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* por meio da sobre-expressão do gene *XKSI* e/ou deleção do gene *PHO13* nas linhagens de laboratório CEN.PK2-1C e DLG-K1; com o intuito de melhorar a metabolização intracelular da xilose nessas linhagens para que elas possam, após as modificações propostas, ser utilizadas como plataformas biológicas para testes de enzimas e transportadores heterólogos envolvidos no metabolismo da xilose. Ademais, as leveduras recombinantes construídas também foram testadas inserindo enzimas e transportadores de xilose heretólogos clonados em plasmídeos de expressão, onde foi avaliado o desempenho fermentativo das linhagens transformantes expressando os genes heterólogos.

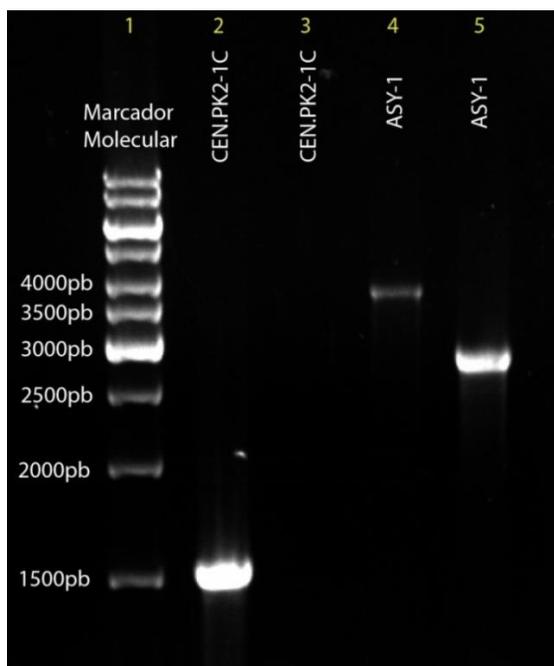
4.1.1 Obtenção de linhagens recombinantes para análise de enzimas heterólogas

Para a obtenção das linhagens plataforma para testes de enzimas heterólogas envolvidas no metabolismo da xilose, este trabalho propôs modificar geneticamente a linhagem CEN.PK2-1C, por meio da sobre-expressão do gene *XKS1* e deleção do gene *PHO13*. Inicialmente, a linhagem de laboratório CEN.PK2-1C teve a região promotora do gene *XKS1* modificada, com o intuito de sobre-expressar esse gene. Para isso, fragmentos de DNA lineares, chamados “Módulos de Sobre-expressão”, foram confeccionados a partir de sua amplificação por PCR utilizando DNA genômico extraído da linhagem de laboratório BSY21-34B3. Os módulos resultantes dessas reações de PCR apresentavam ≈ 2.394 pb de comprimento e possuíam o gene de resistência *kan^r* e o promotor *P_{ADHI}* na porção central, e nas extremidades, sequências homólogas às regiões cromossômicas imediatamente a montante (≈ 40 pb) e no início (≈ 40 pb) do gene *XKS1*. Utilizando os módulos confeccionados e a linhagem CEN.PK21-C, após recombinação homóloga (vide item 3.3.6.1), deu-se origem à linhagem ASY-1.

A confirmação da modificação genética realizada foi feita através de reações de PCR com o DNA extraído da linhagem ASY-1 (recombinante). Para fins comparativos, o DNA extraído da levedura CEN.PK2-1C (parental) também foi utilizado nas reações de PCR. A verificação da construção pode ser observada no gel de agarose apresentado na Figura 8. Observando a Figura 8, vê-se que, utilizando os iniciadores V-XKS1-F e V-XKS1-R (que hibridizam a montante e no fim do gene *XKS1*, respectivamente, vide Figura 6) em reações de PCR com o DNA da levedura CEN.PK2-1C (parental), foi possível amplificar um fragmento linear de 1557pb (linha 2), compatível com a presença do gene *XKS1* no genoma dessa linhagem; por outro lado, quando utilizados os mesmos iniciadores e o DNA da linhagem ASY-1 (recombinante), foi verificada a amplificação de um fragmento de 3871pb (linha 4), demonstrando a correta integração do módulo de sobre-expressão no genoma da levedura recombinante. Adicionalmente, foi utilizado também o par de iniciadores V-Kanr-F e V-XKS1-R (que hibridizam dentro do gene de resistência *Kan^r* e no fim do gene *XKS1*, vide Figura 6). Em reações de PCR utilizando esse par de iniciadores e o DNA da levedura CEN.PK2-1C (parental), não houve amplificação (linha 3), o que comprova a ausência do módulo de sobre-expressão no genoma da levedura parental; em contrapartida, os mesmos iniciadores amplificaram um fragmento de 2889pb a partir da linhagem ASY-1

(linha 5), confirmando a presença do módulo no genoma dessa linhagem.

Figura 8 - Confirmação da construção genômica em gel de agarose: sobre-expressão do gene *XKS1* na linhagem CEN.PK2-1C. O evento de recombinação homóloga inseriu o módulo de sobre-expressão na região promotora do gene *XKS1* da linhagem CEN.PK2-1C, originando a linhagem ASY-1. No gel de agarose: linha 1 (marcador molecular 1kb Fermentas); linhas 2 e 4 (iniciadores V-XKS1-F e V-XKS1-R); linhas 3 e 5 (iniciadores V-Kanr-F e V-XKS1-R).



Fonte: Este trabalho

A fim de avaliar se de fato o gene *XKS1* estava sendo sobre-expresso na linhagem recombinante ASY-1 após a modificação na região promotora desse gene, foi verificada a atividade da enzima xilulocinase (enzima codificada pelo gene *XKS1*), conforme descrito na seção Material e Métodos. Adicionalmente, essa atividade foi avaliada também na linhagem CEN.PK2.1-C (linhagem parental onde o gene não

está sendo sobre-expresso). Para comparação, também foi avaliada a atividade de XK na linhagem DLG-K1 (linhagem modificada geneticamente, conforme já citado, que já possui esse gene sendo controlado por um promotor forte e constitutivo P_{PGK}). Os resultados das análises enzimáticas podem ser visualizados na Tabela 4.

A partir da Tabela 4 pode-se verificar que a linhagem recombinante ASY-1 apresentou atividade XK $\approx 3,7$ vezes maior do que na linhagem parental CEN.PK2.1C, demonstrando o aumento na atividade específica da enzima XK quando sua expressão é controlada pelo promotor forte e constitutivo P_{ADHI} . A atividade mínima de XK apresentada pela cepa CEN.PK2.1C corresponde provavelmente à atividade dessa enzima quando sua expressão é controlada pelo seu próprio promotor nativo (RICHARD et al., 2000). Matsushika et al. (2008), que sobre-expressaram a enzima XK utilizando um plasmídeo integrativo e sob o controle do promotor forte e constitutivo P_{PGK} , obtiveram atividade enzimática cerca de 2,5 vezes maior do que as linhagens parentais, e apresentaram valores similares ao encontrado pelo presente trabalho. De forma semelhante, a linhagem DLG-K1 também apresentou atividade de XK maior do que a linhagem CEN.PK2-1C, visto que a primeira já possui o gene *XKS1* sobre-expresso em seu genoma (Tabela 4).

Tabela 4 - Atividade específica da enzima xilulocinase em leveduras

| Levedura | Característica genotípica relevante para o gene <i>XKS1</i> | Atividade específica |
|------------|---|---|
| | | Xilulocinase (U.mg ⁻¹ proteína) |
| CEN.PK2-1C | <i>wild-type</i> | 0,04 ± 0,01 |
| ASY-1 | $P_{ADHI}::XKS1$ | 0,15 ± 0,04 |
| DLG-K1 | $P_{PGK1}::XKS1$ | 0,12 ± 0,03 |

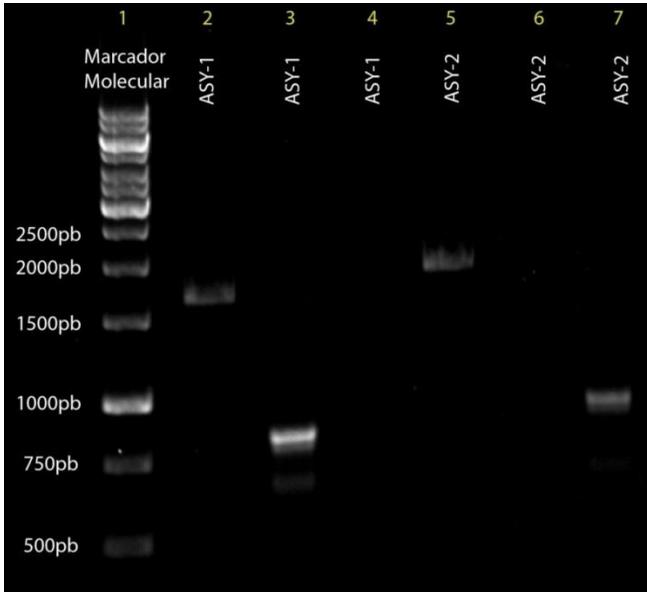
NOTA: Os valores são a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes.

Após a construção da linhagem ASY-1 (com o gene *XKS1* sobre-expresso), essa linhagem foi submetida a um novo evento de recombinação homóloga, a fim de que seu gene *PHO13* fosse deletado. Para isso, fragmentos de DNA lineares, chamados "Módulos de Deleção", foram confeccionados a partir de sua amplificação por PCR utilizando o DNA extraído da linhagem de laboratório GMY08 (conforme detalhado na seção Material e Métodos, item 3.3.4). Os

módulos resultantes dessas reações de PCR apresentavam ≈ 1265 pb de comprimento e possuíam o gene *Ble^r* em sua porção central, e nas extremidades, sequências homólogas às regiões cromossômicas correspondente aos primeiros nucleotídeos logo após o códon de iniciação (≈ 40 pb) e aos nucleotídeos anteriores ao códon de terminação do gene *PHO13* (≈ 40 pb). Utilizando os módulos confeccionados e a linhagem ASY-1, após recombinação homóloga (vide item 3.3.6.2), deu-se origem à linhagem ASY-2.

A confirmação da deleção gênica pode ser observada no gel apresentado na Figura 9. Essa verificação foi realizada por meio de reações de PCR utilizando o DNA extraído da levedura ASY-2 e da linhagem parental (neste caso, a linhagem parental é a ASY-1) para comparação. Observando a Figura 9, vê-se que, utilizando os iniciadores IE-PHO13-F e IE-PHO13-R (que hibridizam à montante e a jusante do gene *PHO13*, respectivamente, vide Figura 7) em reações de PCR com o DNA da levedura ASY-1 (parental), houve a amplificação de um fragmento de 1654pb (linha 2), demonstrando a presença do gene *PHO13* no genoma dessa linhagem; por outro lado, os mesmos iniciadores amplificaram um fragmento maior (1900pb) quando utilizado o DNA extraído da levedura recombinante ASY-2 (linha 5), indicando a presença do gene *Ble^r* no local antes ocupado pelo gene *PHO13*. Além disso, quando utilizado o par de iniciadores VE-PHO13-F e IE-PHO13-R (que hibridizam dentro do gene *PHO13* e posterior ao mesmo, respectivamente, vide Figura 7) houve amplificação de um fragmento de 827pb (linha 3) a partir da linhagem parental, e não houve amplificação a partir da linhagem transformante ASY-2 (linha 6), confirmando a não existência do gene *PHO13* no genoma desta última linhagem. Por fim, utilizando outro par de iniciadores, V-BLE-F e IE-PHO13-R (que anelam dentro do gene de resistência *Ble^r* e posterior ao gene *PHO13*, respectivamente, vide Figura 7), não houve amplificado a partir da levedura parental ASY-1 (linha 4); por outro lado, foi possível amplificar um fragmento de 985pb a partir da linhagem transformante ASY-2 (linha 7), confirmando, assim, a presença do módulo de deleção no genoma dessa levedura.

Figura 9 - Confirmação da construção genômica em gel de agarose: deleção do gene *PHO13* na linhagem ASY-1. O evento de recombinação homóloga inseriu o módulo de deleção na linhagem ASY-1, originando a linhagem ASY-2. No gel de agarose: linha 1 (marcador molecular 1kb Fermentas); linhas 2 e 5 (iniciadores IE-PHO13-F e IE-PHO13-R); linhas 3 e 6 (iniciadores VE-PHO13-F e IE-PHO13-R); linhas 4 e 7 (iniciadores V-BLE-F e IE-PHO13-R).



Fonte: Este trabalho

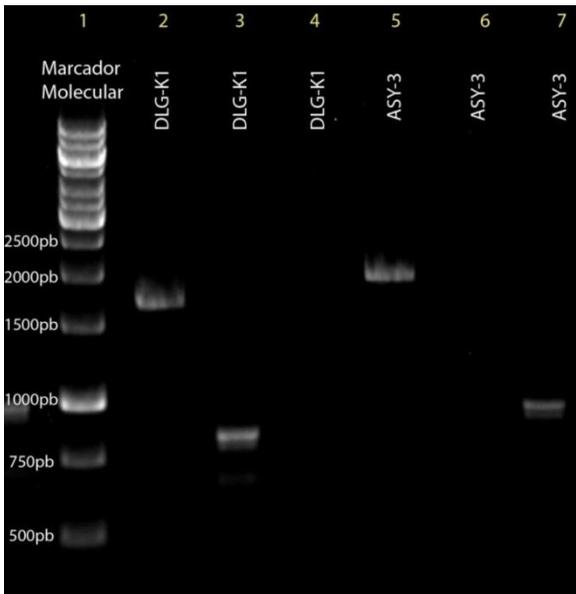
4.1.2 Obtenção de linhagem recombinante para análise de transportadores heterólogos

Para a obtenção da linhagem plataforma para testes de transportadores envolvidos no metabolismo da xilose, a linhagem DLG-K1 (linhagem sobre-expressando as enzimas para o metabolismo da xilose e deletada nos principais transportadores de monossacarídeos) teve o gene *PHO13* deletado. Para isso, assim como realizado anteriormente, fragmentos de DNA lineares, chamados “Módulos de Deleção”, foram confeccionados a partir de sua amplificação por PCR utilizando o DNA extraído da linhagem de laboratório GMY08 (conforme detalhado na seção Material e Métodos, item 3.3.4). Os

módulos resultantes dessas reações de PCR apresentavam aproximadamente ≈ 1265 pb de comprimento e possuíam o gene *Ble^r* em sua porção central, e nas extremidades, sequências homólogas às regiões cromossômicas correspondente aos ≈ 40 primeiros nucleotídeos logo após o códon de iniciação e aos ≈ 40 nucleotídeos anteriores ao códon de terminação do gene *PHO13*. Utilizando os módulos confeccionados e a linhagem DLG-K1, após recombinação homóloga (vide item 3.3.6.2), deu-se origem à linhagem ASY-3.

A confirmação dessa deleção pode ser observada no gel apresentado na Figura 10. A verificação foi realizada por meio de reações de PCR utilizando o DNA extraído da levedura recombinante ASY-3 e da linhagem parental DLG-K1 para comparação. Observando a Figura 10, é possível notar que, utilizando os iniciadores IE-PHO13-F e IE-PHO13-R (que hibridizam à montante e a jusante do gene *PHO13*, respectivamente, vide Figura 7) em reações de PCR com o DNA da levedura DLG-K1, foi possível amplificar de um fragmento de 1654pb (linha 2), demonstrando a presença do gene *PHO13* no genoma dessa linhagem; por outro lado, os mesmos iniciadores amplificaram um fragmento maior (1900pb) quando utilizado o DNA da levedura transformada ASY-3 (linha 5), indicando a presença do gene *Ble^r*. Além disso, quando utilizado o par de iniciadores VE-PHO13-F e IE-PHO13-R (que hibridizam dentro do gene *PHO13* e posterior ao mesmo, respectivamente, vide Figura 7) houve amplificação de um fragmento de 827pb (linha 3) a partir da linhagem parental, e não houve amplificação a partir da linhagem transformante ASY-3 (linha 6), confirmando a não existência do gene *PHO13* no genoma da linhagem desta última. Finalmente, utilizando outro par de iniciadores, V-BLE-F e IE-PHO13-R (que anelam dentro do gene de resistência *Ble^r* e posterior ao gene *PHO13*, respectivamente, vide Figura 7), não houve amplificados a partir da levedura parental DLG-K1 (linha 4); por outro lado, foi possível amplificar um fragmento de 985pb a partir da linhagem recombinante ASY-3 (linha 7), confirmando, novamente, a presença do módulo de deleção no genoma dessa levedura.

Figura 10 - Confirmação da construção genômica em gel de agarose: deleção do gene *PHO13* na linhagem DLG-K1. O evento de recombinação homóloga inseriu o módulo de deleção na linhagem DLG-K1, originando a linhagem ASY-3. No gel de agarose: linha 1 (marcador molecular 1kb Fermentas); linhas 2 e 5 (iniciadores IE-PHO13-F e IE-PHO13-R); linhas 3 e 6 (iniciadores VE-PHO13-F e IE-PHO13-R); linhas 4 e 7 (iniciadores V-BLE-F e IE-PHO13-R).



Fonte: Este trabalho

4.2 PERFORMANCE FERMENTATIVA DAS LINHAGENS RECOMBINANTES APÓS A EXPRESSÃO DE ENZIMAS E TRANSPORTADORES HETERÓLOGOS

Após a construção das linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes (ASY-1, ASY-2 e ASY-3), o presente trabalho buscou avaliar a capacidade fermentativa dessas linhagens após a expressão de enzimas ou transportadores de xilose provenientes de outros microrganismos. Com esse objetivo, foi realizada introdução de plasmídeos contendo

genes que codificam as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) heterólogas na linhagem parental CEN.PK2-1C e nas duas primeiras linhagens recombinantes construídas a partir dessa última: ASY-1 (cujo gene *XKSI* foi sobre-expresso na linhagem CEN.PK2-1C) e ASY-2 (cujo gene *PHO13* foi deletado na linhagem ASY-1). Após a construção das linhagens recombinantes expressando as enzimas XR e XDH, a performance fermentativa das leveduras foi testada frente às principais fontes de carbono envolvidas na produção de etanol 2G: glicose e xilose. Posteriormente, foi utilizada a linhagem parental DLG-K1 [linhagem sobre-expressando os genes necessários à metabolização de xilose (genes *XYL1*, *XYL2* e *XKSI*) e com os principais genes para o transporte de xilose deletados (*hxt*-null)] e a terceira linhagem recombinante construída nesse trabalho, ASY-3 (cujo gene *PHO13* foi deletado na linhagem DLG-K1), para clonagem e expressão de transportadores de xilose heterólogos. Após a construção das linhagens recombinantes expressando transportadores heterólogos, novamente, a performance fermentativa das leveduras foi avaliada. Vale lembrar que o intuito da expressão heteróloga de enzimas e transportadores de xilose nas linhagens modificadas geneticamente por esse trabalho foi verificar se as modificações genômicas realizadas (sobre-expressão do gene *XKSI* e/ou deleção do gene *PHO13*) de fato auxiliam na eficiente utilização da pentose em questão.

4.2.1 Teste das linhagens como plataformas para a expressão de enzimas heterólogas

Em trabalho recente desenvolvido por Mouro (2016), as espécies de leveduras *S. arborariae* e *S. passalidarum*, naturalmente fermentadoras de xilose, foram avaliadas em busca de genes que codificam as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH). No trabalho em questão, inicialmente, foram identificados genes que codificam possíveis XRs das duas leveduras do gênero *Spathaspora* (*S. arborariae* e *S. passalidarum*), e posteriormente os genes foram clonados e expressos (por meio de clonagem em plasmídeos de expressão) na linhagem CEN.PK2-1C de *S. cerevisiae* para avaliar a funcionalidade das enzimas. A clonagem e expressão de uma XR a partir de *S. passalidarum* em *S. cerevisiae* resultou em uma enzima que exibiu atividade estritamente dependente de NADPH. Por outro lado, a clonagem e expressão de uma XR a partir de *S. arborariae* em *S. cerevisiae* demonstrou uma enzima com atividade para ambos os

cofatores (NADH e NADPH), tornando esta última de grande interesse, visto que a atividade com o cofator NADH poderia diminuir o problema do desbalanço de cofatores (HAHN HÄNGERDAL et al., 1994; JEFFRIES, 2006). Mouro (2016) também realizou a clonagem de uma XDH de *S. passalidarum* em *S. cerevisiae*. A atividade da XDH clonada revelou uma enzima exibindo boa atividade e estrita dependência ao cofator NAD⁺.

Em virtude dos resultados encontrados no trabalho de Mouro (2016), o presente trabalho se propôs a utilizar os plasmídeos construídos pelo autor para expressão em nossas linhagens recombinantes. Mouro (2016) utilizou o plasmídeo pPGK contendo a sequência que codifica a enzima XR (clonada a partir da levedura *S. arborariae*) sob o controle do promotor forte e constitutivo do gene *PGK* – promotor, este, do gene que codifica a enzima fosfoglicerato quinase da via glicolítica. Além disso, o autor também utilizou o plasmídeo pTEF contendo a sequência gênica que codifica a enzima XDH (clonada a partir da levedura *S. passalidarum*) sob o controle do promotor forte e constitutivo do gene *TEF* – promotor do gene que codifica um fator de alongamento da tradução, que participa da síntese de proteínas. Os plasmídeos desenvolvidos por Mouro (2016), contendo as sequências gênicas que codificam as enzimas desejadas, foram inseridos na linhagem de *S. cerevisiae* CEN.PK2-1C, e, também, nas duas primeiras linhagens construídas no presente trabalho: ASY-1 (com o gene *XKSI* sobre-expresso) e ASY-2 (linhagem que além de ter o gene *XKSI* sobre-expresso também tem o gene *PHO13* deletado), conforme detalhado na seção Material e Métodos, item 3.3.7. As linhagens transformantes, expressando os plasmídeos com os genes que codificam as enzimas desejadas, foram denominadas CEN.PK2-1C-xr-xdh, ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh.

A partir das linhagens transformantes contendo os plasmídeos de expressão com as sequências codificantes desejadas, foi verificada a atividade específica das enzimas XR e XDR (Tabela 5). Para as três linhagens avaliadas, resultados semelhantes foram encontrados: enquanto que a atividade de XR com o cofator NADPH foi de $\approx 2 \text{ U.mg}^{-1}$, a atividade com o cofator NADH foi de $\approx 0,8 \text{ U.mg}^{-1}$ (cerca de 3 vezes menor que a atividade com o primeiro cofator). Isso corresponde ao encontrado pelo trabalho de Mouro (2016), que identificou a enzima XR de *S. arborariae* com NADH como tendo cerca de um terço da atividade com o cofator NADPH. A atividade XDH, por sua vez, foi de $\approx 0,4 \text{ U.mg}^{-1}$, cerca de 5 vezes menor do que a atividade de XR com o cofator

NADPH, o que também foi visto pelo trabalho de Mouro (2016). Além disso, a atividade de XR com o cofator NADH foi ≈ 2 vezes maior que a atividade de XDH. Essas diferenças entre as atividades das enzimas XR e XDH pode ter ocorrido devido aos vetores de expressão utilizados para a clonagem das duas enzimas: o gene que codifica a XR está clonado no vetor pPGK, enquanto que o gene que codifica a XDH está clonado no vetor pTEF. Embora ambos os vetores tenham promotores que ocasionam forte expressão gênica, a expressão de pTEF é considerada inferior à de plasmídeos que possuem promotores da via glicolítica, como pGPD e pPGK (MUMBERG et al., 1995).

Tabela 5 - Atividade específica das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase em leveduras portando os plasmídeos pPGK-XR e pTEF-XDH

| Levedura | Plasmídeos | Atividade específica (U.mg ⁻¹ proteína) | | |
|-------------------|----------------------|---|-------------|--------------------------|
| | | Xilose redutase | | Xilitol desidrogenase |
| | | NADPH | NADH | NAD ⁺ |
| CEN.PK2-1C-xr-xdh | pPGK-XR; pTEF-XDH | 2,17 ± 0,06 | 0,87 ± 0,02 | 0,42 ± 0,15 |
| ASY-1-xr-xdh | pPGK-XR; pTEF-XDH | 2,41 ± 0,25 | 0,89 ± 0,23 | 0,48 ± 0,03 |
| ASY-2-xr-xdh | pPGK-XR; pTEF-XDH | 2,37 ± 0,22 | 0,81 ± 0,22 | 0,48 ± 0,07 |

NOTA: Os valores são a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes.

No intuito de verificar as mudanças nas performances metabólicas da glicose e da xilose causadas pela sobre-expressão do gene *XKS1* e/ou deleção do gene *PHO13*, foram analisados os perfis de crescimento celular, consumo de glicose e xilose e produção de metabólitos das linhagens de leveduras CEN.PK2-1C-xr-xdh, ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh, portando os plasmídeos com genes que codificam as enzimas XR e XDH heterólogas clonadas a partir do trabalho de Mouro (2016). Como pode ser visualizado na Figura 11, as três linhagens testadas demonstraram similaridade no perfil metabólico em glicose (gráficos A, B e C): o crescimento celular, o consumo de glicose e a produção de etanol foram muito semelhantes para as três

linhagens. Esse resultado sugere que a sobre-expressão do gene *XKSI* e a deleção do gene *PHO13* não afetam a utilização da glicose pelas linhagens. Isso é condizente com estudos prévios, onde a sobre-expressão da enzima xilulocinase não demonstrou afetar o metabolismo da glicose em outras cepas de *S. cerevisiae* (RODRIGUEZ-PEÑA et al., 1998; RICHARD; TOIVARI; PENTTILA, 2000; JIN et al., 2003). Similarmente, a deleção do gene *PHO13* também não afetou o consumo de glicose em outros estudos já reportados que realizaram crescimentos aeróbios com 20 g.L⁻¹ e 40 g.L⁻¹ da hexose (VAN VLEET; JEFFRIES; OLSSON, 2008; KIM et al., 2015). Embora Kim et al. (2015) tenham encontrado mudanças na expressão de alguns genes em cepas *pho13Δ* crescidas em glicose, os autores também não verificaram diferenças fenotípicas no crescimento e na fermentação do açúcar.

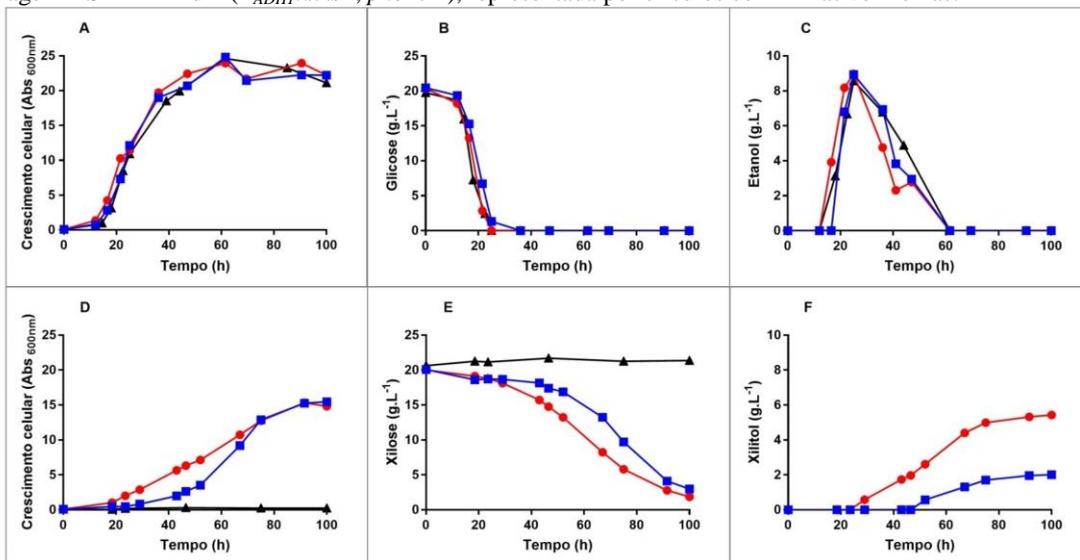
Por outro lado, diferentemente do que foi visualizado em relação à glicose, os perfis de metabolização da xilose foram distintos nas linhagens testadas. Observando os gráficos de crescimento celular e consumo de xilose (Figura 11 – D e E), vê-se que a linhagem CEN.PK2-1C-xr-xdh não conseguiu consumir xilose e crescer na presença desse açúcar; entretanto, quando teve seu gene *XKSI* sobre-expresso, originando a linhagem ASY-1-xr-xdh, esta última foi capaz de crescer e consumir essa pentose. Esses resultados sugerem que a sobre-expressão do gene *XKSI* é essencial para o fluxo metabólico da xilose, o que é condizente com estudos prévios que demonstraram que a sobre-expressão desse gene melhora pronunciadamente a utilização da xilose em linhagens portando XR e XDH heterólogas provenientes de *S. stipitis* (HO; CHEN; BRAINARD, 1998; TOIVARI et al., 2001; MATSUSHIKA; SAWAYAMA, 2008). Desse modo, percebe-se a importância de linhagens de *S. cerevisiae* *XKSI* constitutivas em estudos com expressão heteróloga de enzimas XR e XDH.

Em contrapartida, nossos resultados contrastam com os encontrados por Johansson et al. (2001), onde foi visto que a sobre-expressão do gene *XKSI* reduziu o consumo de xilose em *S. cerevisiae* recombinantes, e que existe um possível efeito inibitório causado pela sobre-expressão desse gene. No entanto, aqueles autores encontraram um efeito inibitório no crescimento em xilose em cepas com atividades de XK muito maiores (28-36 U.mg⁻¹) do que a atividade observada pela nossa linhagem XK constitutiva, que foi de 0,15 U.mg⁻¹ (vide Tabela 4). Essa maior atividade encontrada nos resultados de Johansson et al. (2001) pode ter ocorrido devido ao fato de que o gene *XKSI*, no trabalho dos autores, estava clonado em um plasmídeo multicópia sob o controle

de um promotor forte e constitutivo, conferindo, assim, maior expressão gênica do que uma única cópia sobre-expressa, como no caso da nossa sobre-expressão de *XKSI* realizada diretamente no genoma da levedura. Rodriguez-Peña et al. (1998), que também observaram uma toxicidade da sobre-expressão de XK em células cultivadas em xilulose, embora não tenham medido a atividade de XK, também utilizaram um plasmídeo multicópia para a clonagem e expressão dessa enzima. De fato, Jin et al. (2003) observaram que, em linhagem de *S. cerevisiae* expressando XR e XHD de *S. stipitis*, a sobre-expressão do gene *XKSI* através de um plasmídeo cópia-única (conferindo atividade de enzima XK de $0,30 \text{ U.mg}^{-1}$) proporcionou maior crescimento e consumo de xilose pela linhagem; contudo, utilizando um plasmídeo multicópia e tendo, portanto, atividade de XK aumentada para $1,27 \text{ U.mg}^{-1}$, a linhagem apresentou inibição do crescimento celular. Ho, Chen e Brainard (1998) e Toivari et al. (2001), por outro lado, relataram que a sobre-expressão de *XKSI* aumenta significativamente a utilização de xilose em vez de causar efeitos tóxicos, assim como foi visto em nossos resultados. Aqueles autores encontraram atividades de XK de 0,1 e $0,42 \text{ U.mg}^{-1}$, respectivamente; valores próximos do encontrado pelo presente trabalho.

A respeito da sobre-expressão do gene *XKSI*, em suma, os resultados encontrados pelos autores citados anteriormente juntamente com os do presente trabalho, indicam que a sobre-expressão desse gene é necessária para o fluxo metabólico da xilose, e, assim, para haver maior consumo de xilose é importante que a atividade de XK seja superior à nativa de *S. cerevisiae*. Contudo, o nível de expressão dessa enzima deve ser cuidadoso para que não ocorra efeito deletério nas células. Esse efeito deletério visto por alguns pesquisadores é possivelmente causado pelo excesso de xilulose-5-fosfato formada a partir de grandes atividades de XK e à grande utilização de ATP pela enzima. *S. cerevisiae* provavelmente não possui um sistema que impede o consumo excessivo de ATP pela enzima XK sobre-expressa, de forma que esta molécula pode se esgotar das células, inibindo, assim, o crescimento celular haja vista que ATP é essencial para diversas atividades celulares (ELIASSON et al., 2001; JIN et al., 2003).

Figura 11 – Crescimentos aeróbios das linhagens CEN.PK2-1C-xr-xdh, ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh em meios sintéticos sem uracila e sem histidina contendo 2% de glicose (A, B, C) ou 2% de xilose (D, E, F) como fontes de carbono. Na figura, são apresentados o crescimento celular (A, D), o consumo de glicose ou xilose (B, E) e a produção dos metabólitos etanol (C) e xilitol (F) durante os crescimentos. As linhagens de leveduras apresentadas nesta figura estão expressando os plasmídeos pPGK e pTEF contendo, respectivamente, os genes que codificam as enzimas XR e XDH heterólogas: linhagem CEN.PK2-1C-xr-xdh, representada por triângulos com linhas pretas; linhagem ASY-1-xr-xdh ($P_{ADHI}::xks1$), representada por quadrados com linhas azuis; e linhagem ASY-2-xr-xdh ($P_{ADHI}::xks1$; $pho13\Delta$), representada por círculos com linhas vermelhas.



É possível observar também através dos gráficos D e E da Figura 11 que, embora ASY1-1-xr-xdh tenha sido capaz de consumir xilose, seu crescimento foi lento e com uma extensa fase lag, iniciando, de fato, crescimento e consumo do açúcar apenas em 30 horas de incubação. Em contrapartida, quando essa linhagem teve seu gene *PHO13* deletado (originando a linhagem ASY-2-xr-xdh), houve um crescimento mais rápido da levedura e um consumo mais acelerado do açúcar: a cepa ASY-2-xr-xdh iniciou sua fase exponencial em aproximadamente 20 horas de incubação e consumiu a xilose mais rapidamente que a sua parental. Esse resultado indica que a deleção do gene *PHO13* auxiliou na utilização de xilose pela linhagem de *S. cerevisiae* *pho13Δ* desenvolvida neste trabalho. Isso está de acordo com estudos realizados por Van Vlet, Jeffries e Olsson (2008) e Kim et al. (2015), que, em crescimentos aeróbios com 20 g.L⁻¹ e 40 g.L⁻¹ de xilose, respectivamente, revelaram linhagens de *S. cerevisiae* *pho13Δ* que com melhora na velocidade de crescendo em xilose e no consumo dessa pentose quando expressando as enzimas XR e XDH de *S. stipitis*.

Como citado na introdução do presente trabalho, os benefícios para o metabolismo da xilose causados pela deleção do gene *PHO13* estão sendo ainda compreendidos. De acordo Kim et al. (2013), a atividade de fosfatase da proteína Pho13 sob a molécula de xilulose-5-fosfato poderia formar um ciclo fútil de fosforilação e desfosforilação quando acoplado às altas atividades de XK (desfosforilando a xilulose-5-fosfato), causando, assim, diminuição de ATP e interferindo no crescimento da célula. De fato, nossa linhagem *pho13Δ* também possui o gene *XKS1* sobre-expresso e atividade maior de XK (vide Tabela 4). Embora a sobre-expressão desse gene não tenha aparentemente causado efeito tóxico para o crescimento e consumo de xilose nos nossos ensaios (Figura 11 - D e E), a deleção de *PHO13* pode ter aliviado o gasto de ATP se algum ciclo fútil existisse devido à aumentada atividade de XK quando acoplada à atividade da proteína Pho13. Dessa forma, esse poderia ser o motivo do melhor crescimento e consumo da xilose apresentado por nossa cepa *pho13Δ*. Ademais, estudos mais recentes têm demonstrado que a deleção do gene *PHO13* regula positivamente alguns genes da Via das Pentoses-fosfato, incluindo genes relacionados à regeneração do NADPH (KIM et al., 2015; BAMBÁ; HASUNUMA; KONDO, 2016; XU et al., 2016). É sabido que *S. cerevisiae* exibe baixo fluxo na parte não oxidativa da via das pentoses-fostato quando comparado com esse fluxo em leveduras naturalmente

fermentadores de xilose (KOTTER; CIRIACITY, et al., 1993), além disso, a produção de NADPH é necessária para a resistência ao estresse oxidativo (LAROCHELLE et al., 2006) e também como cofator para a enzima XR clonada em nossas linhagens. Estes, portanto, também podem ser os motivos pelos quais as células *pho13Δ* deste trabalho apresentaram melhor desempenho em metabolizar a xilose.

As cepas ASY-1-xr-xh e ASY-2-xr-xdh, embora tenham crescido e consumido quase toda a xilose presente no meio no tempo de incubação estudado, não produziram etanol a partir de xilose (dados não mostrados). Em contrapartida, a produção de xilitol foi pronunciada para as duas cepas (Figura 11- F), sobretudo para a linhagem ASY-2-xr-xdh, que produziu quase 6 g.L⁻¹ desse metabólito. Uma possível explicação para a produção de xilitol em detrimento da produção de etanol poderia ser a diferença entre a atividade das enzimas XR e XDH clonadas nas leveduras: a atividade de XR foi cerca de 5 e 2 vezes maior utilizando os cofatores NADPH e NADH, respectivamente, do que a atividade de XDH (Tabela 5). De fato, um estudo que analisou vários níveis de expressão das enzimas XR e XDH sugeriu que a melhora na produção de etanol e a diminuição da excreção de xilitol, deve-se uma alta razão de atividade XDH/XR (TAMAKAWA; IKUSHIMA; YOSHIDA, 2013). Kim et al. (2012) também verificaram que baixos níveis de expressão de XDH é um importante gargalo na eficiente fermentação de xilose. Além disso, Walfridsson et al. (1997) e Eliasson et al. (2001) demonstraram também que baixa razão XR/XDH promove a diminuição do acúmulo de xilitol; o segundo trabalho, inclusive, sugere que a atividade de XDH deve ser cerca de 10 vezes maior do que a atividade de XR.

No trabalho de Eliasson et al. (2001) supracitado, que sugeriu que a atividade de XDH deve ser pelo menos 10 vezes maior do que a de XR, as duas enzimas utilizadas eram da levedura *S. stipitis*. A enzima XDH dessa levedura possui uma velocidade máxima de formação de xilulose de 64,85 U.mg⁻¹, enquanto que a velocidade da reação inversa (formação de xilitol a partir de xilulose) é de 872,1 U.mg⁻¹, além de uma constante de equilíbrio K_{eq} de 6,9.10⁻¹¹ mol.L⁻¹ (RIZZI et al., 1989; ELIASSON et al., 2001). Isso indica que a formação de xilitol a partir de xilulose é favorecida para a enzima XDH de *S. stipitis* e, portanto, como salientam os autores, pode ser por isso a necessidade de alta razão de atividade XDH/XR. Por outro lado, a enzima XR de *S. stipitis*, embora utilize NADH, tem como cofator de preferencia o NADPH (VERDUYN et al., 1985), assim, o desbalanço de cofores também pode ser o ponto crucial para a necessidade de altas atividades de XDH em

comparação com a XR. Sobre a enzima XR de *S. arborariae* clonada em nossas linhagens, sabe-se que ela possui maior afinidade pelo cofator NADPH e maior atividade com esta coenzima do que com o cofator NADH (MOURO, 2016). Dessa forma, possivelmente é necessária uma maior atividade de XDH em comparação com a atividade de XR.

Após as análises de crescimento celular e consumo de glicose e xilose, as cepas CEN.PK2-1C-xr-xdh, ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh foram submetidas a ensaios de fermentação de xilose com alta densidade celular e condições microaeróbias. Nessa condição, a fermentação é favorecida e a alta densidade celular se aproxima da encontrada em condições industriais de produção do etanol (AMORIM et al., 2011). Os resultados dessas análises estão apresentados na Figura 12 e a comparação entre os dados de consumo de xilose e produção de etanol a partir dessa fermentação estão resumidos na Tabela 6.

Nesse ensaio fermentativo, observou-se que a linhagem CEN.PK2-1C-xr-xdh foi capaz de consumir $\approx 30\%$ da xilose presente no meio (Figura 12: gráfico B; Tabela 6), entretanto, não foi capaz de produzir etanol (gráfico C), mas produziu $\approx 4 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol (gráfico D). Por outro lado, a linhagem ASY-1-xr-xdh foi capaz de consumir $\approx 70\%$ de xilose, mais que o dobro de sua linhagem parental, ressaltando a importância da sobre-expressão do gene *XKS1* na fermentação. Ainda, vê-se que a linhagem ASY-1-xr-xdh foi capaz de produzir $\approx 2 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol, diferentemente de sua parental (onde a enzima XK está com o nível basal de expressão), que não produziu esse metabólito. Adicionalmente, a velocidade de consumo de xilose para a cepa ASY-1-xr-xdh foi mais que o dobro da velocidade vista para a cepa CEN.PK2-1C-xr-xdh (Tabela 6). De fato, dados observados por Eliasson et al. (2001) mostram que, em microaerobiose, a sobre-expressão de XK foi necessária para a produção de etanol a partir de xilose. De modo similar, Toivari et al. (2001) verificaram que a sobre-expressão da enzima XK aumentou as velocidades de utilização de xilose em linhagens sobre-expressando as enzimas XR e XDH de *S. stipitis*, bem como os rendimentos de etanol sobre xilose em condições de microaerobiose. Estes últimos autores ainda verificaram que os níveis de xilulose-5-fosfato e ribulose-5-fosfato foram maiores para a linhagem *XKS1* constitutiva. Muito provavelmente, a sobre-expressão de XK ocasiona a conversão mais eficiente de xilulose em xilulose-5-fosfato, permitindo o fluxo desta última para a Via-das-Pentoses-fosfato mais eficientemente, o que possibilitou a formação de etanol a partir da xilose.

Figura 12 – Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila e sem histidina contendo 2% de xilose como fonte de carbono pelas linhagens CEN.PK2-1C-xr-xdh, ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh. Na figura, são apresentados a biomassa celular (A), o consumo de xilose (B) e a produção dos metabólitos etanol (C), xilitol (D), ácido acético (E) e glicerol (F) durante a fermentação. As linhagens de leveduras apresentadas nesta figura estão expressando os plasmídeos pPGK e pTEF contendo, respectivamente, os genes que codificam as enzimas XR e XDH heterólogas: linhagem CEN.PK2-1C-xr-xdh, representada por triângulos com linhas pretas; linhagem ASY-1-xr-xdh ($P_{ADHI}::xks1$) representada por quadrados com linhas azuis; e linhagem ASY-2-xr-xdh ($P_{ADHI}::xks1$; $pho13\Delta$), representada por círculos com linhas vermelhas.

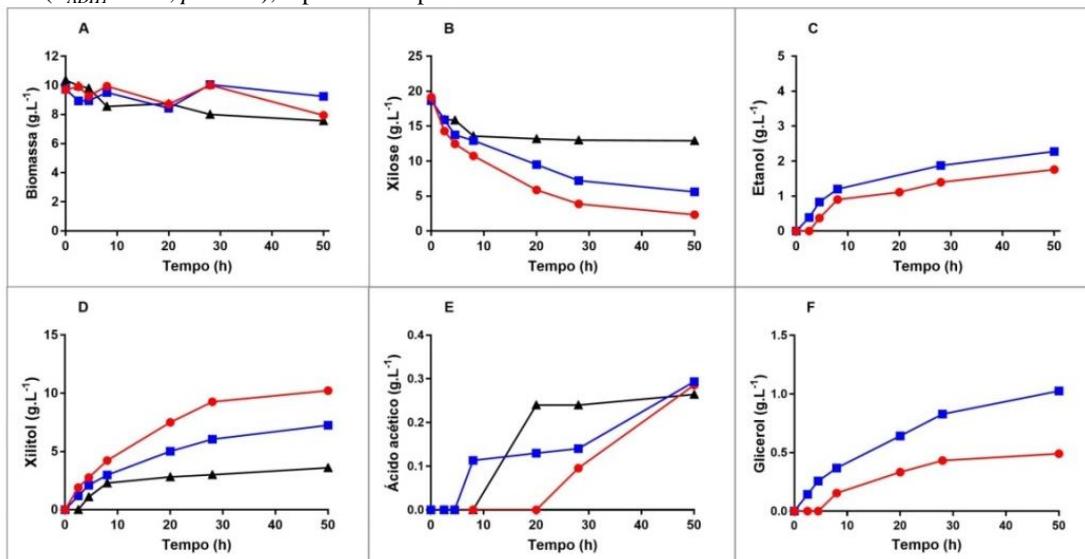


Tabela 6 – Comparação entre as performances fermentativas de 20 g.L⁻¹ xilose pelas cepas CEN.PK2-1C-xr-xdh, ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh

| Levedura | Consumo de xilose (%) | V _s (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^a | Ve (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b |
|-------------------|-----------------------|---|---|
| CEN.PK2-1C-xr-xdh | 30,69 | 0,11 | 0 |
| ASY-1-xr-xdh | 69,97 | 0,26 | 0,04 |
| ASY-2-xr-xdh | 87,71 | 0,33 | 0,03 |

NOTA: ^aVelocidade de consumo volumétrico máximo de xilose.
^bVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol.

Ainda, é possível observar através das análises apresentadas na Figura 12 e na Tabela 6 que, embora a linhagem ASY-1-xr-xdh tenha consumido xilose, o remanecente no meio ainda foi de 30% desse carboitrado no final do tempo de incubação utilizado. Em contrapartida, a linhagem ASY-2-xr-xdh conseguiu consumir ≈88% da xilose presente no meio. Além disso, a velocidade de consumo de xilose foi maior para a linhagem ASY-2-xr-xdh do que para a linhagem ASY-1-xr-xdh (Tabela 6). Por outro lado, a excreção de xilitol foi novamente maior para a cepa *pho13Δ*, enquanto que a produção de etanol não foi maior para esta última linhagem recombinante, e também, a velocidade de produção de etanol foi levemente maior para a cepa parental ASY-1-xr-xdh (Tabela 6). Esses dados são semelhantes aos resultados encontrados por Dall Agnolo (2014), que verificou que, em fermentações microaeróbias com 20 g.L⁻¹ de xilose, a sua linhagem de *S. cerevisiae pho13Δ* foi responsável por aumentar consideravelmente a produção de xilitol, enquanto que a linhagem parental (com o gene *PHO13* intacto) apresentou ligeira vantagem na produção de etanol. Como salienta Dall Agnolo (2014), essa vantagem poderia ser atribuída, em partes, ao excesso de xilitol produzido (e que posteriormente não foi consumido) pela linhagem *pho13Δ*. Esses resultados encontrados no trabalho de Dall Agnolo (2014) e pelo presente trabalho contrastam com os obtidos por Van Vleet, Jeffries e Olsson, (2008). Esses autores viram a produção de etanol foi marcadamente maior na linhagem *pho13Δ* em ensaios microaeróbios, contudo, a linhagem também apresentou aumento na produção de xilitol.

Embora as linhagens ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh tenham produzido etanol a partir de xilose, o produto principal desse ensaio

fermentativo, como já mencionado acima, foi o xilitol: as duas linhagens produziram, respectivamente, $\approx 7 \text{ g.L}^{-1}$ e $\approx 10 \text{ g.L}^{-1}$ desse metabólito (Figura 12, gráfico D). Uma possível explicação para essa grande produção de xilitol em detrimento da baixa produção de etanol poderia ser, assim como foi visualizado para as análises de crescimento celular, novamente a diferença entre as atividades enzimáticas de XR e XDH e a alta razão XR/XDH. De fato, Van Vleet, Jeffries e Olsson (2008) observaram, como comentado no parágrafo anterior, que produção de etanol foi marcadamente maior na linhagem *pho13Δ* portando XR e XDH heterólogas de *S. stipitis*, contudo, os autores não informaram a atividade das enzimas para as linhagens. Outra questão poderia ser a maior afinidade da enzima XR clonada de *S. arborariae* pelo cofator NADPH (MOURO, 2015) que poderia favorecer o desbalanço de cofatores e a alta produção de xilitol. Ainda, Eliasson et al. (2001) sugerem, a partir de modelagem matemática, que diferentes concentrações intracelulares de NADH e NAD^+ em células de *S. cerevisiae* recombinantes que utilizam xilose pode ter um alto impacto na formação do xilitol.

Ainda com base nos dados da fermentação de xilose (Figura 12), nota-se que algumas cepas analisadas produziram glicerol durante o tempo de incubação (gráfico F). Interessantemente, a linhagem CEN.PK2-1C-xr-xdh não produziu esse metabólito, enquanto que a linhagem ASY-1-xr-xdh produziu cerca de 1 g.L^{-1} . Isso sugere, novamente, que a sobre-expressão do gene *XKS1* (na segunda linhagem) pode ter permitido um maior fluxo de carbonos para a Via das Pentoses-fosfato e, posteriormente, possibilitou a formação não só do etanol, mas também de glicerol. De maneira similar, Toivari et al. (2001) também verificaram a produção de glicerol em suas cepas apenas quando a enzima XK foi sobre-expressa. A linhagem ASY-2-xr-xdh (*pho13Δ*), por outro lado, produziu menos da metade do glicerol de sua parental ASY-1-xr-xdh (gráfico F).

Outro metabólito produzido pelas linhagens foi o ácido acético (Figura 12 - D). Esse ácido fraco pode ser produzido pelas leveduras durante o consumo de xilose para a regeneração do cofator NADPH, a partir da conversão de acetaldeído a ácido acético pela enzima acetaldeído desidrogenase codificada pelo gene *ALD6*, que utiliza NADP^+ como cofator (MEADEN et al., 1997; GRABOWSKA; CHELSTOWSKAUMA, 2003). Assim, a produção desse metabólito pode estar indicando a necessidade de regeneração do cofator NADPH, requerido pela enzima XR que foi clonada e expressa nas linhagens.

Nossos primeiros resultados obtidos, através do crescimento celular e perfis fermentativos (Figuras 11 e 12), demonstram que, nas linhagens ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh, embora haja crescimento celular e consumo de xilose, esse açúcar está sendo desviado em grande parte para a produção de xilitol, tanto no crescimento aeróbio quanto na fermentação com alta densidade celular e microaerobiose. Paralelamente, foi visto que as atividades das enzimas XR e XDH das linhagens em questão se mostraram diferentes (vide Tabela 5), de modo que a atividade de XR com o cofator NADPH é quase 5 vezes maior do que a atividade de XDH. Esses resultados sugerem, juntamente com a alta produção de xilitol, que a otimização no nível de expressão e, consequentemente, na atividade das enzimas XR e XDH clonadas nas linhagens deste trabalho poderia ser um dos caminhos para aumentar a produção de etanol e diminuir a produção de xilitol. Como discutido anteriormente, alguns pesquisadores têm demonstrado que a atividade de XDH deve ser maior que a de XR para diminuir da produção de xilitol e aumentar a produção de etanol, justamente o contrário do que aconteceu em nossos resultados iniciais (alta razão XR/XDH) (WALFRIDSSON et al., 1997; ELIASSON et al. 2001; KIM et al., 2012; TAMAKAWA; IKUSHIMA; YOSHIDA, 2013).

Devido a esses primeiros resultados encontrados, este trabalho se propôs a reclonar as enzimas XR e XDH em plasmídeos, utilizando, para as duas enzimas, promotores de genes da via glicolítica, na tentativa de equiparar a expressão, e, consequentemente, a atividade das duas enzimas. Conforme citado anteriormente, embora os vetores pPGK e pTEF tenham promotores que ocasionam forte expressão gênica, a expressão de pTEF é considerada inferior se comparada à de plasmídeos com promotores de genes da via glicolítica, como pGPD e pPGK (MUMBERG et al., 1995). Mouro (2016) já havia clonado o gene que codifica a XDH no plasmídeo pPGK, por isso, realizamos a amplificação do gene que codifica a enzima XR e a clonagem deste em um novo plasmídeo: pGPD, onde o controle da expressão gênica de XR é feita pelo promotor forte e constitutivo do gene *GPD*, gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase da via glicolítica, além do plasmídeo apresentar um marcador auxotrófico diferente.

A amplificação do gene que codifica a enzima XR e sua clonagem no plasmídeo pGPD foram realizadas conforme descrito em Material e Métodos, item 3.3.8. Após, os novos plasmídeos (pGPD,

contendo a sequência da enzima XR proveniente da levedura *S. arborariae*, e pPGK, contendo a sequência da enzima XDH proveniente da levedura *S. passalidarum*) foram inseridos na linhagem ASY-1 (com o gene *XKSI* sobre-expresso) e na linhagem ASY-2 (linhagem que além de ter o gene *XKSI* sobre-expresso também tem o gene *PHO13* deletado), conforme detalhado na seção Material e Métodos. Não realizamos a inserção dos plasmídeos na linhagem CEN.PK2-1C, uma vez que esta não conseguiu crescer em xilose sem a sobre-expressão de *XKSI* (conforme discutido e demonstrado na Figura 11). As linhagens transformantes, contendo o novo conjunto de plasmídeos construídos, foram denominadas ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B.

As novas linhagens transformantes foram, então, submetidas à análise da atividade específica das enzimas XR e XDH (Tabela 7). Para as duas linhagens avaliadas (ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B), resultados semelhantes foram encontrados: enquanto que a atividade de XR com o cofator NADPH foi de $\approx 5 \text{ U.mg}^{-1}$, a atividade com o cofator NADH foi de $\approx 2 \text{ U.mg}^{-1}$ (aproximadamente 2,5 vezes menor que a primeira). Novamente, assim como encontrado por Mouro (2016), identificamos a enzima XR de *S. arborariae* tendo menor atividade com o cofator NADH do que com o cofator NADPH. A atividade da enzima XDH, por sua vez, foi de $\approx 3 \text{ U.mg}^{-1}$, cerca de 1,6 vezes menor do que a atividade de XR com o cofator NADPH. Por outro lado, com o cofator NADH a enzima XR apresentou atividade específica um pouco menor do que a enzima XDH. Dessa vez, portanto, quando controladas pelos promotores P_{GPD} e P_{PGK} , respectivamente, a atividade das enzimas XR e XDH se mostraram menos diferentes do que anteriormente (quando controladas pelos promotores P_{PGK} e P_{TEF} , respectivamente). Contudo, embora a diferença entre as atividades seja menor, e, conseqüentemente, a razão XR/XDH tenha diminuído com a construção dos novos plasmídeos, a atividade de XR com o cofator NADPH ainda permanece quase 2 vezes maior do que a atividade de XDH. Em compensação, a razão XR/XDH (quando XR utiliza o cofator NADH), diminuiu de 2 para $\approx 0,66$.

Tabela 7 - Atividade específica das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase em leveduras portando os plasmídeos pGPD-XR e pPGK-XDH

| Levedura | Plasmídeos | Atividade específica (U.mg ⁻¹ proteína) | | |
|----------------|----------------------|--|-------------|-----------------------|
| | | Xilose redutase | | Xilitol desidrogenase |
| | | NADPH | NADH | NAD ⁺ |
| ASY-1-xr-xdh-B | pGPD-XR; pPGK-XDH | 4,77 ± 0,17 | 1,70 ± 0,34 | 3,11 ± 0,04 |
| ASY-2-xr-xdh-B | pGPD-XR; pPGK-XDH | 5,12 ± 1,34 | 2,11 ± 0,66 | 2,95 ± 0,34 |

NOTA: Os valores são a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes.

Após as análises enzimáticas, as cepas ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B, com os novos conjuntos de plasmídeos, foram submetidas a ensaios de fermentação de xilose com alta densidade celular e condições microaeróbias. Os resultados destas análises estão apresentados na Figura 13 e a comparação entre os dados de consumo de xilose e produção de etanol a da fermentação estão resumidos na Tabela 8.

Observando os gráficos da Figura 13, nota-se que as linhagens ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B apresentaram consumo de xilose e produção de etanol e xilitol semelhantes ao visto pelas cepas ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh (vide Figura 12). Novamente, a cepa *pho13Δ* (ASY-2-xr-xdh-B) apresentou melhor desempenho em consumir a xilose do que sua parental (ASY-1-xr-xdh-B): a porcentagem de xilose consumida e a velocidade de seu consumo foram maiores para a cepa *pho13Δ* (Figura 13: gráfico B; Tabela 8). Dessa vez, no entanto, diferentemente do que foi visto nas primeiras análises com o conjunto de plasmídeos inicial (vide Figura 12), a produção de etanol foi ligeiramente maior para a linhagem *pho13Δ*, além da velocidade de produção de etanol também ter sido maior (Tabela 8). Esses dados podem indicar um melhor balanço entre as atividades das enzimas XR e XDH. Com a Tabela 7 é possível notar que as atividades da enzima XR (com ambos os cofatores) estão mais próximas das atividades da enzima XDH com o cofator NAD⁺; diferentemente das cepas ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh (que portavam o primeiro conjunto de plasmídeos), as quais apresentaram atividade de XR cerca de 5 vezes maior que a de XDH (vide Tabela 5).

De fato, no trabalho de Kim et al. (2013) foi demonstrado que, quando as enzimas XR e XDH estavam ambas com atividades de $\approx 0,4 \text{ U.mg}^{-1}$ com os cofatores NADPH e NAD^+ , respectivamente, a cepa *pho13Δ* consumiu mais xilose e produziu mais etanol, porém, dobrou a produção de xilitol em comparação com sua parental não deletada nesse gene. Por outro lado, a cepa *pho13Δ* com atividade da enzima XDH cerca de 10 vezes maior do que a atividade de XR também consumiu mais xilose e produziu mais etanol, mas produziu menos xilitol do que sua parental. Assim, provavelmente o melhor balanço entre as enzimas XR e XDH com o segundo conjunto de plasmídeos favoreceu o aumento na produção de etanol aqui apresentado por nossa cepa *pho13Δ* ASY-2-xr-xdh-B na Figura 13. Como salienta Kim et al. (2013), as vantagens para a fermentação de xilose causadas pela deleção do gene *PHO13* parecem estar associadas com a otimização das atividades das enzimas XR e XDH, o que parece se confirmar com os nossos resultados.

De maneira interessante, uma das diferenças mais evidentes entre o perfil fermentativo das linhagens ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh, comparado às linhagens ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B, foi a ausência de ácido acético como produto fermentativo para as duas últimas cepas (dados não mostrados). Como comentado anteriormente, a produção de ácido acético é uma das formas que as leveduras podem utilizar para regeneração do cofator NADPH (MEADEN et al., 1997; GRABOWSKA; CHELSTOWSKAUMA, 2003), requerido pela enzima XR clonada nas linhagens deste trabalho. Assim, a ausência desse metabólito no ensaio em questão pode indicar que a atividade das enzimas XR e XDH estão mais balanceadas quanto a seus cofatores. De fato, de acordo com a Tabela 7, nota-se que a atividade da enzima XR com o cofator NADH esta maior que nas primeiras linhagens construídas com o primeiro conjunto de plasmídeos (Tabela 5), de forma que a razão entre XR/XDH (quando XR utiliza NADH) passou de ≈ 2 para $\approx 0,66$. Vale ressaltar que, embora essa razão seja menor, Eliasson et al. (2001) sugerem que a enzima XDH necessita ter atividade 10 vezes maior que XR para alta produção de etanol e para a ausência de xilitol. Dessa forma, pode ser por isso que, ainda, o xilitol permaneceu como produto principal dos nossos ensaios. Outro dado que pode ser observado através da fermentação em questão é o aumento da produção de glicerol para a cepa *pho13Δ* (Figura 13, gráfico E). Fujitomi et al. (2012) e Dall Agnolo (2015) também observaram que a deleção do gene *PHO13* aumentou a produção de glicerol.

Figura 13 – Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila e sem histidina contendo 2% de xilose como fonte de carbono pelas linhagens ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B. Na figura, são apresentados a biomassa celular (A), o consumo de xilose (B) e a produção dos metabólitos etanol (C), xilitol (D), e glicerol (E) durante a fermentação. As linhagens de leveduras apresentadas nesta figura estão expressando plasmídeos pGPD e pPGK contendo, respectivamente, os genes que codificam as enzimas XR e XDH heterólogas: ASY-1-xr-xdh-B, representada por quadrados com linhas azuis; e ASY-2-xr-xdh-B (*pho13Δ*), representada por círculos com linhas vermelhas.

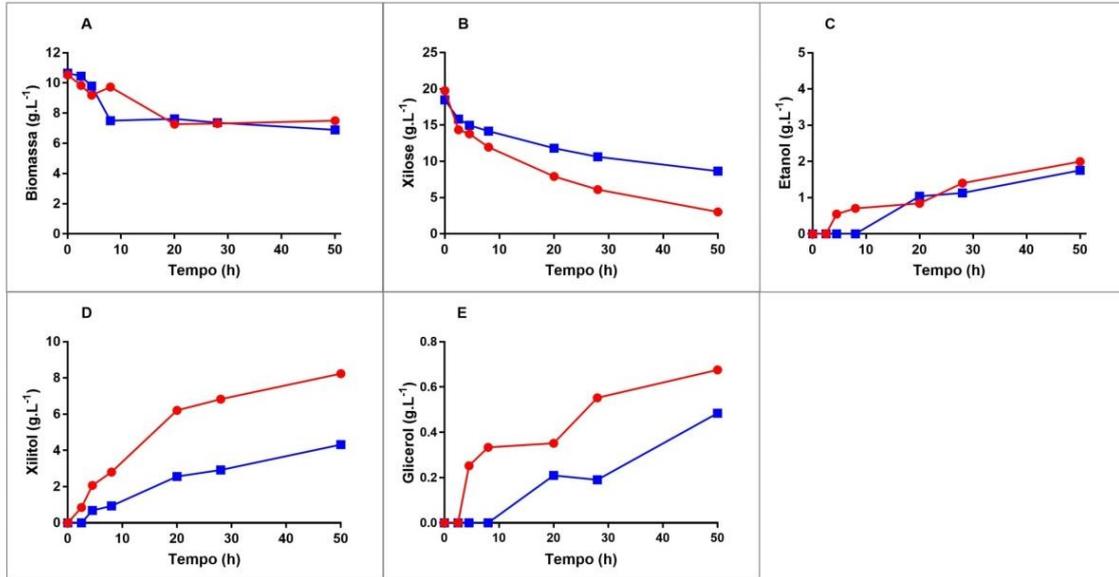


Tabela 8 – Comparação entre as performances fermentativas de 20 g.L⁻¹ xilose pelas cepas ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B

| Levedura | Consumo de xilose (%) | V _s (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^a | Ve (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b |
|----------------|-----------------------|---|---|
| ASY-1-xr-xdh-B | 53,21 | 0,19 | 0,04 |
| ASY-2-xr-xdh-B | 84,67 | 0,33 | 0,05 |

NOTA: ^aVelocidade de consumo volumétrico máximo de xilose.

^bVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol.

As cepas ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B também foram submetidas a ensaios de co-fermentação de glicose e xilose com alta densidade celular e condições microaeróbias, conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados destas análises estão apresentados na Figura 14 e a comparação entre os dados de consumo de xilose e produção de etanol a partir dessa co-fermentação estão resumidos na Tabela 9.

Através do gráfico B da Figura 14 é possível observar que a glicose foi consumida rapidamente tanto pela cepa ASY-1-xr-xdh-B quanto pela cepa ASY-2-xr-xdh-B. Além disso, o consumo da hexose foi similar para ambas as linhagens. Por outro lado, a velocidade de consumo de xilose e a porcentagem de açúcar consumido foram maiores para a cepa *pho13Δ* (ASY-2-xr-xdh-B) do que para ASY-1-xr-xdh-B (Figura 14: gráfico C; Tabela 9). Mais uma vez, vê-se a confirmação de que os benefícios da deleção do gene *PHO13* foram específicos para o metabolismo da xilose, mesmo em meios contendo a mistura glicose e xilose. Van Vleet, Jeffries e Olsson (2007) e Kim et al. (2015) também notaram esse padrão em co-fermentações de xilose e glicose por linhagens *pho13Δ*, contudo, naqueles estudos as análises foram feitas sob aerobiose, diferentemente do presente trabalho. Por outro lado, novamente, a produção de xilitol foi maior para a linhagem *pho13Δ* (gráfico E), assim como foi visto por Fujitomi et al. (2012) e Dall Agnolo (2015) em suas linhagens *pho13Δ*.

De maneira interessante, vê-se também que as linhagens ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B apresentaram decaimento tanto na velocidade de consumo de xilose quanto na porcentagem desse açúcar consumido durante a co-fermentação com glicose, em comparação com o ensaio fermentativo em que havia apenas xilose no meio (vide Figuras 13 e 14 e Tabelas 8 e 9 para comparação). Isso pode ser atribuído, pelo menos em partes, ao problema do transporte de xilose para o interior das células da levedura. De fato, é sabido que a xilose compete com a

glicose pelos mesmos transportadores de membrana ao ser internalizada pelas células de *S. cerevisiae*. Devido à preferência dos transportadores pela glicose, a captação de xilose acaba por ser inibida e, conseqüentemente, seu consumo é mais lento em co-fermentações desses dois açúcares (RUNQUIST et al., 2010; SUBTIL; BOLES, 2012).

É possível notar, ainda, através da Figura 14 (gráficos D e F), que a produção de etanol e glicerol foi ligeiramente maior para a cepa *pho13Δ* ASY-2-xr-xdh-B. A cepa ASY-1-xr-xdh-B parece ter produzido etanol apenas a partir do consumo da glicose. Por outro lado, vê-se que a linhagem ASY-2-xr-xdh-B aumentou em $\approx 3 \text{ g.L}^{-1}$ a produção de etanol após a glicose ter sido completamente consumida do meio (≈ 30 horas de incubação), o que indica que essa produção de etanol foi proveniente do metabolismo da xilose. Esses dados diferem dos encontrados por Dall Agnolo (2014), que não obteve aumento na produção de etanol em células *pho13Δ* em co-fermentações microaeróbias com 40 g.L^{-1} de xilose e glicose. Por outro lado, Dall Agnolo (2014) notou aumento na produção de glicerol pelas linhagens *pho13Δ* em comparação com a cepa parental. Essa produção maior de glicerol também foi observada pelo presente trabalho (Figura 14; gráfico F). É possível notar, contudo, que a maior parte da produção de glicerol observada para ambas as linhagens (ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B) parece ter sido proveniente do consumo primário da glicose.

Figura 14 – Co-fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila e sem histidina contendo 2% de xilose e 2% de glicose como fontes de carbono pelas linhagens ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B. Na figura, são apresentados a biomassa celular (A), o consumo de glicose (B) e xilose (C) e a produção dos metabólitos etanol (D), xilitol (E) e glicerol (F) durante a fermentação. As linhagens de leveduras apresentadas nesta figura estão expressando plasmídeos pGPD e pPGK contendo, respectivamente, os genes que codificam as enzimas XR e XDH heterólogas: ASY-1-xr-xdh-B, representada por quadrados com linhas azuis; e ASY-2-xr-xdh-B (*pho13Δ*), representada por círculos com linhas vermelhas.

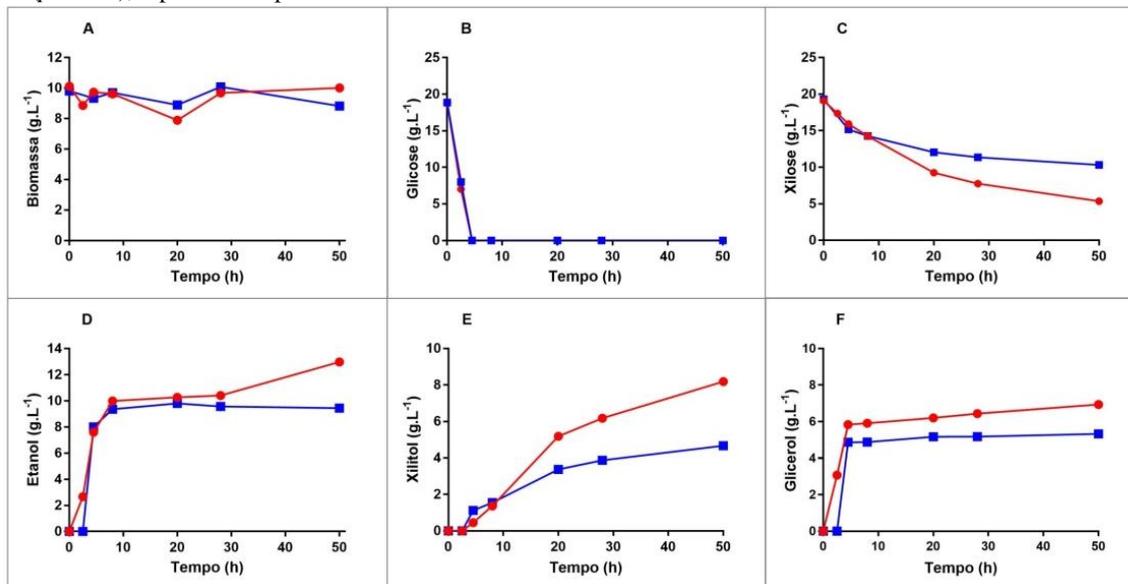


Tabela 9 – Comparação entre as performances fermentativas de 20 g.L⁻¹ xilose em co-fermentação com 20 g.L⁻¹ glicose pelas cepas ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B

| Levedura | Consumo de xilose (%) | V _s (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^a | V _e (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b |
|----------------|-----------------------|---|---|
| ASY-1-xr-xdh-B | 45,01 | 0,17 | 0,18 |
| ASY-2-xr-xdh-B | 71,96 | 0,27 | 0,25 |

NOTA: ^aVelocidade de consumo volumétrico máximo de xilose.
^bVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol.

Como comentado na introdução deste trabalho, Van Vleet, Jeffries e Olsson (2008) verificaram uma inibição do crescimento de cepas de *S. cerevisiae* modificadas geneticamente para consumir xilose com o aumento na concentração desse açúcar no meio. Os autores notaram que em meios com 6% de xilose (60 g.L⁻¹) as cepas não apresentavam crescimento, enquanto que em meios com 2% do açúcar havia crescimento celular. De maneira similar, o estudo de Kim et al. (2013) obteve um resultado interessante: quando as cepas de *S. cerevisiae* portando XR e XDH heterólogas de *S. stipitis* eram crescidas em xilose, a velocidade específica desse crescimento aumentou até concentrações de 10 g.L⁻¹ do açúcar; contudo, a partir de 20 g.L⁻¹, a velocidade específica do crescimento caía drasticamente conforme ia-se aumentando a concentração de xilose. Aparentemente, altas concentrações de xilose causaram um efeito tóxico para as células. Buscando, então, superar esse problema, um experimento de engenharia evolutiva daqueles autores relevou uma linhagem evoluída capaz de crescer mais rapidamente sob concentração de 40 g.L⁻¹ de xilose. Essa linhagem apresentou mutações no gene *PHO13* que, então, foram vistas ser responsáveis pela perda da função da proteína Pho13. Experimentos posteriores, também utilizando 40 g.L⁻¹ ou até mesmo 100 g.L⁻¹ de xilose, demonstraram que a deleção do gene *PHO13* parece permitir o crescimento e consumo da xilose, sobretudo em meios com alta concentração desse açúcar (DALL AGNOLO, 2015; KIM et al., 2015; BAMBA; HASUNUMA; KONDO, 2016). Vale ressaltar que, para uma produção industrial de etanol 2G, altas concentrações de açúcar são desejadas para que resultem em altas concentrações de etanol a partir da fermentação (SÁNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015).

Devido ao que se observou acima, as cepas ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B desenvolvidas pelo presente trabalho foram submetidas a ensaios de fermentação de xilose em meios com 100 g.L^{-1} desse açúcar e com alta densidade celular e condições microaeróbias. Os resultados destas análises estão apresentados na Figura 15 e a comparação entre os dados de consumo de xilose e produção de etanol a partir dessa fermentação estão resumidos na Tabela 10. Como pode ser visualizado na Figura 15 e na Tabela 10, o consumo de xilose em meios com 100 g.L^{-1} do açúcar foi marcadamente alterado com a deleção do gene *PHO13*: a cepa ASY-2-xr-xdh-B conseguiu consumir $\approx 53\%$ da xilose presente no meio em 50 horas de incubação, enquanto que a cepa ASY-1-xr-xdh-B consumiu apenas $\approx 19\%$. Além disso, é possível notar que a velocidade de consumo da xilose foi ≈ 5 vezes maior para a linhagem *pho13* Δ (ASY-2-xr-xdh-B) do que a velocidade para a linhagem parental, além da velocidade de produção de etanol também ter sido maior (Tabela 10). Esses resultados indicam que as vantagens da deleção de *PHO13* no consumo de xilose são evidenciadas em meios com uma alta concentração do açúcar. De fato, a maior parte dos estudos utilizando cepas *pho13* Δ tem realizado ensaios de crescimentos celulares e fermentações sob altas concentrações de xilose (NI; LAPLAZA; JEFFRIES, 2007; FUJITOMI et al., 2012; KIM et al., 2013; DALL AGNOLO, 2015; KIM et al., 2015; BAMBA; HASUNUMA; KONDO, 2016). De maneira similar aos outros ensaios, novamente, a produção de xilitol aumentou para a linhagem *pho13* Δ (Figura 15, gráficos D e E), o que também foi verificado por Dall Agnolo (2015) e Fujitomi (2012) utilizando fermentações em 100 g.L^{-1} e 40 g.L^{-1} de xilose, respectivamente.

O efeito positivo causado pela deleção do gene *PHO13* em nossas linhagens sob concentrações elevadas de xilose parece estar relacionado à regulação positiva da Via das Pentoses-Fosfato (VPF). Recentemente, Xu et al. (2016), analisando metabólitos produzidos e acumulados por linhagens de *S. cerevisiae* fermentadoras de xilose e deletadas no gene *PHO13*, verificaram uma diminuição na acumulação de sedoeptulose, um intermediário da VPF. Os pesquisadores ainda encontraram que as concentrações de sedoeptulose-7-fosfato (um dos substratos da enzima transaldolase, codificada pelo gene *TALI*) foram reduzidas nas linhagens *pho13* Δ , o que sugere que a atividade de desfosforilação de Pho13 novamente pode estar causando ciclos de perda de ATP e, conseqüentemente, prejudicando o consumo de xilose. Neste trabalho, ainda, os autores verificaram que a sobre-expressão do

gene *TALI* também preveniu a acumulação de sedoheptulose-7-fosfato. Aliado a isso, Kim et al. (2015) demonstram que um dos genes regulados positivamente em cepas *pho13Δ* é justamente o gene *TALI*. Interessantemente, ainda, Erasmus et al. (2003) analisaram a resposta transcricional global de cepas industriais de *S. cerevisiae* submetidas à altas concentrações de glicose e frutose (20% de cada hexose), e verificaram que o estresse causado pela alta concentração de açúcar regulou positivamente genes da via glicolítica e genes da VPF. Assim, a regulação positiva dos genes da VPF causada pela deleção do gene *PHO13* poderia explicar a melhorada performance fermentativa da xilose por nossa linhagem *pho13Δ* sob 100 g.L⁻¹ do açúcar em questão.

Novamente, nota-se a maior produção de glicerol pela cepa *pho13Δ* (Figura 15 - E), assim como foi visto nos ensaios de co-fermentação de 20 g.L⁻¹ xilose e glicose e nas fermentações de 20 g.L⁻¹ de xilose apenas (vide Figuras 13 e 14). O glicerol apenas foi visto ser excretado em menor quantidade pela cepa *pho13Δ* no primeiro ensaio fermentativo realizado no presente trabalho (Figura 12), onde as enzimas XR e XDH ainda estavam menos balanceadas quanto às atividades de XR e XDH. A produção de glicerol sob condições fermentativas pode estar intimamente ligada ao balanço redox intracelular, e a produção desse metabólito em condições de microaerobiose pode estar relacionada à reoxidação do cofator NADH (VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1986). Durante a formação do glicerol, o cofator NADH é utilizado através da redução da diidroxiacetona a glicerol (JEPPSSON et al., 2003), gerando, dessa forma, NAD⁺ que pode ser utilizado pela enzima XDH. Na literatura, alguns trabalhos vêm relacionando a deleção do gene *PHO13* com a redução da produção de glicerol (VAN VLEET, JEFFRIES, OLSSON, 2008; SHEN et al., 2012). Por outro lado, o presente trabalho bem como outros estudos como o de Fujitomi et al. (2012) e o de Dall Agnolo (2014) obtiveram aumento na produção de glicerol pelas cepas *pho13Δ*. Esses resultados contradizentes em relação ao glicerol de alguns autores para com os outros pode indicar que a deleção do gene *PHO13* pode influenciar o balanço redox intracelular.

Figura 15 – Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila e sem histidina contendo 10% de xilose como fonte de carbono pelas linhagens ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B. Na figura, são apresentados a biomassa celular (A), o consumo de xilose (B) e a produção dos metabólitos etanol (C), xilitol (D), e glicerol (E) durante a fermentação. As linhagens de leveduras apresentadas nesta figura estão expressando plasmídeos pGPD e pPGK contendo, respectivamente, os genes que codificam as enzimas XR e XDH heterólogas: ASY-1-xr-xdh-B, representada por quadrados com linhas azuis; e ASY-2-xr-xdh-B (*pho13Δ*), representada por círculos com linhas vermelhas.

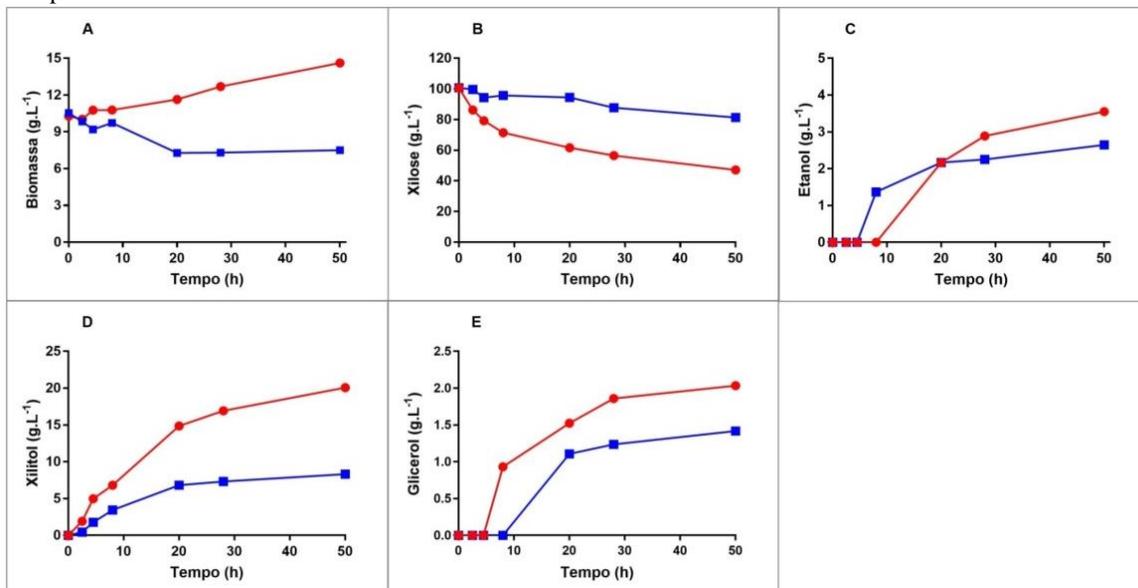


Tabela 10 – Comparação entre as performances fermentativas de 100 g.L⁻¹ xilose pelas cepas ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B

| Levedura | Consumo de xilose (%) | V _s (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^a | Ve (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b |
|----------------|-----------------------|---|---|
| ASY-1-xr-xdh-B | 19,22 | 0,19 | 0,05 |
| ASY-2-xr-xdh-B | 53,10 | 1,06 | 0,07 |

NOTA: ^aVelocidade de consumo volumétrico máximo de xilose.
^bVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol

Por fim, cabe ressaltar aqui que os benefícios da deleção do gene *PHO13* parecem se estender ao aumento da resistência das leveduras aos compostos inibidores da fermentação. Fugitomi et al. (2012) verificaram que a deleção do gene *PHO13* melhorou a produção de etanol a partir de xilose na presença dos três principais inibidores da fermentação formados a partir do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica: ácido acético, ácido fórmico e furfural. Portanto, seria interessante também testar as linhagens aqui apresentadas em fermentações contendo esses inibidores, com vistas a entender melhor os efeitos da deleção do gene *PHO13* sob a resistência celular.

4.2.2 Teste das linhagens como plataformas para a expressão de transportadores heterólogos

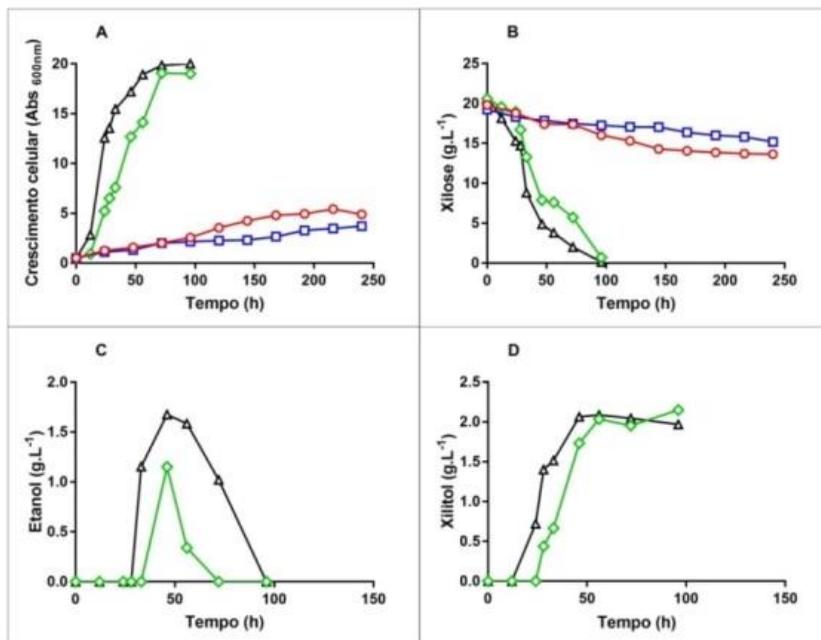
Um dos passos limitantes para a eficiente fermentação da xilose pela levedura *S. cerevisiae* recombinante é o transporte desse monossacarídeo para o interior das células. Estudos têm demonstrado que mesmo após a construção de linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes (por meio da expressão heteróloga de enzimas para o metabolismo interno da xilose), essa pentose é consumida pelas células a uma velocidade insuficiente para uma eficiente produção de etanol a partir desse açúcar, e tem-se visto que isso ocorre principalmente devido à ineficiência da captação de xilose através da membrana plasmática do meio extracelular para o interior das células dessa levedura (SEDLAK; HO, 2004; SUBTIL; BOLES, 2012). Em busca de uma solução para esta questão, muitos pesquisadores têm identificado transportadores de açúcares de diferentes organismos para verificação de suas propriedades de transporte de xilose. Recentemente, o nosso laboratório identificou o

transportador de açúcar Sut4 na levedura *S. arborariae*. O transportador em questão teve seu gene amplificado e clonado no plasmídeo pGPD. Em seguida, o plasmídeo contendo o transportador foi inserido na linhagem DLG-K1 (*hxt*-null), originando a linhagem DLG-K1-Sut4. Essa linhagem foi, então, submetida à análise de crescimento celular e consumo de xilose, no entanto, foi capaz de consumir pouco açúcar e crescer lentamente (dados ainda não publicados). Adicionalmente, Sales et al. (2015), em trabalho também realizado pelo nosso grupo de pesquisa, identificaram o transportador de xilose Xut1 na levedura *S. stipitis*. O gene que codifica esse transportador foi clonado no plasmídeo pPGK, e esse plasmídeo foi, então, inserido na linhagem DLG-K1, originando a linhagem DLG-K1-Xut1. A partir dessa linhagem, análises fermentativas foram realizadas sob diferentes fontes de carbono, incluindo xilose, para a qual o transportador se mostrou capaz de mediar o transporte e promover produção de etanol eficientemente (SALES et al., 2015).

Em virtude dos transportadores identificados e clonados pelo nosso grupo de pesquisa, decidiu-se testar essas permeases em nossa linhagem recombinante ASY-3 (linhagem DLG-K1, mas *pho13*Δ), construída através do presente trabalho. Para isso, os plasmídeos pGPD contendo o gene que codifica o transportador heterólogo Sut4, e pPGK, contendo o transportador heterólogo Xut1, foram inseridos na linhagem recombinante construída ASY-3, conforme descrito em Material e Métodos (item 3.3.7), dando origem às linhagens ASY-3-Sut4 e ASY-3-Xut1, respectivamente. A seguir, testou-se a performance de crescimento celular e consumo de xilose dessas linhagens e também, para comparação, das cepas não deletadas no gene *PHO13* (DLK-K1-Sut4 e DLG-K1-Xut1). Os resultados destas análises estão apresentados na Figura 16. Observando a Figura 16, nota-se que a linhagem DLG-K1-Sut4 foi capaz de crescer em xilose, entretanto, apresentou crescimento lento com extensa fase lag e consumiu apenas $\approx 4 \text{ g.L}^{-1}$ do açúcar em 250 horas de incubação. A linhagem DLG-K1-Xut1, em contrapartida, consumiu quase a totalidade da xilose presente já em 100 horas de ensaio, além de ter apresentado crescimento expressivo durante esse período e ter produzido $\approx 1,2 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol e $\approx 2 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol. Esses resultados indicam que o transportador Xut1, proveniente da levedura *S. stipitis* e presente na linhagem DLG-K1-Xut1, se mostrou mais eficiente na captação de xilose e ainda permitiu a produção de etanol a partir dessa pentose. De fato, o transportador Xut1 tem sido caracterizado como uma permease com eficiência moderada no transporte, mas alta

preferência por xilose (YOUNG et al., 2011; 2012). Por outro lado, ainda não se tem dados na literatura sobre o transportador Sut4 de *S. arborariae*; sabe-se apenas que ele é capaz de transportar glicose eficientemente (dados ainda não publicados).

Figura 16 – Crescimentos aeróbios das linhagens DLG-K1-Sut4, ASY-3-Sut4, DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1 em meios sintéticos sem uracila contendo 2% de xilose como fonte de carbono. Nos tempos indicados, amostras foram retiradas dos meios para a determinação do crescimento celular (A), do consumo de xilose (B) e da produção dos metabólitos etanol (C) e xilitol (D) durante os crescimentos. Duas linhagens de leveduras apresentadas nesta figura estão expressando o plasmídeo pGPD contendo o gene que codifica os transportador heterólogo Sut4: linhagem DLG-K1-Sut4, representada por quadrados com linhas azuis; e linhagem ASY-3-Sut4 (*pho13Δ*), representada por círculos com linhas vermelhas. As outras duas linhagens apresentadas nesta figura estão expressando o plasmídeo pPGK contendo o gene que codifica o transportador heterólogo Xut1: linhagem DLG-K1-Xut1, representada por losangos com linhas verdes; e linhagem ASY-3-Xut1 (*pho13Δ*), representada por triângulos com linhas pretas.



É possível observar também através dos gráficos da Figura 16 que, as linhagens com o gene *PHO13* deletado (ASY-3-Sut4 e ASY-3-Xut1) apresentaram um crescimento mais elevado do que suas isogênicas mas com gene *PHO13* intacto, DLG-K1-Sut4 e DLG-K1-Xut1, respectivamente (gráfico A). Além disso, a cepa ASY-3-Sut4 conseguiu consumir $\approx 6 \text{ g.L}^{-1}$ de xilose ($\approx 2 \text{ g.L}^{-1}$ a mais que sua parental DLG-K1-Sut4). Ainda, a cepa ASY-3-Xut1, embora tenha consumido quase a totalidade da xilose no mesmo tempo que DLG-K1-Xut1, demonstrou um consumo mais rápido do açúcar do que esta última (gráfico B). Esses resultados indicam que a deleção do gene *PHO13* favoreceu um consumo mais rápido e maior desse carboidrato pelas linhagens expressando os transportadores heterólogos Sut4 e Xut1 nesse ensaio de crescimento em condições aeróbias. Essa melhora no metabolismo da xilose causada pela deleção do gene *PHO13* poderia ser atribuída a um alívio num possível efeito inibitório causado pela sobre-expressão de *XKS1* (como sugerido por Kim et al., 2013), haja vista que tanto a linhagem DLG-K1 quanto a ASY-3 possuem esse gene sobre-expresso. Outra explicação poderia ser uma possível regulação positiva de alguns genes da Via das Pentoses-fosfato, incluindo genes relacionados à regeneração do NADPH, com a deleção do gene *PHO13* e, conseqüentemente, um fluxo maior de carbonos nessa parte do metabolismo da xilose (KIM et al., 2015; BAMBÁ; HASUNUMA; KONDO, 2016; XU et al., 2016). De fato, quando observamos a produção de etanol das linhagens (gráfico C), vemos que ASY-3-Xut1 (*pho13* Δ) produziu mais etanol que DLG-K1-Xut1, o que pode ser resultado de uma regulação positiva da Via das Pentoses-Fosfato.

É importante notar também através da Figura 16 que, embora as linhagens DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1 (*pho13* Δ) tenham consumido quase a totalidade da xilose presente no meio e produzido etanol e xilitol (gráficos B e C), essa produção foi baixa para ambas as linhagens. Além disso, vê-se a ausência desses metabólitos tanto para a linhagem DLG-K1-Sut4 quanto para a cepa ASY-3-Sut4 (*pho13* Δ). Essa ausência de metabólitos no meio e/ou a baixa produção dos mesmos indica que os carbonos provenientes do consumo da xilose foram prioritariamente metabolizados de forma aeróbia. De fato, nesses ensaios o oxigênio está livremente dissolvido no meio, permitindo esse tipo de metabolismo. Adicionalmente, alguns pesquisadores demonstraram que, quando os açúcares são consumidos lentamente (como foi o caso para as linhagens DLG-K1-Sut4 e ASY-3-Sut4), o metabolismo das leveduras é, sobretudo, respiratório (DUVAL et al., 2010).

Por fim, de maneira interessante, vê-se também por meio da Figura 16 (gráficos C e D) que as cepas DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1 (*pho13Δ*) conseguiram produzir quase tanto etanol quanto xilitol a partir dos ensaios de crescimento celular em aerobiose, diferentemente das primeiras cepas analisadas quando testamos as linhagens como plataformas para a introdução de enzimas heterólogas, ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh, que só produziram xilitol a partir dos ensaios em condições semelhantes (vide Figura 11). A cepa da qual tanto DLG-K1-Xut1 quanto ASY-3-Xut1 são derivadas, é a DLG-K1. Como comentado no início deste trabalho, essa linhagem é utilizada para análise de transportadores heterólogos, uma vez que possui os principais genes para o transporte de xilose deletados (*hxt-null*) e, ainda, possui um plasmídeo integrativo sobre-expressando as enzimas XR e XDH de *S. stipitis* e a enzima XK endógena. Para essa cepa, as atividades das enzimas XR e XDH, com os cofatores NADPH e NAD⁺, respectivamente, são de 1,7 U.mg⁻¹ e 2,0 U.mg⁻¹, além de uma atividade XK de 0,2 U.mg⁻¹ (GONÇALVES et al., 2014). Aqui, portanto, vê-se que a enzima XDH tem atividade cerca de 1,17 vezes maior do que a atividade de XR com o cofator NADPH, diferentemente da atividade quase 5 vezes maior de XR em relação à XDH vista em nossas primeiras cepas (ASY-1-xr-xdh e ASY-2-xr-xdh) – vide tabela 5. Essa observação reforça a ideia de que a enzima XDH deve ter atividade maior que XR para aumentar a produção de etanol e diminuir a produção de xilitol, ideia discutida anteriormente e defendida por diferentes estudos (ELIASSON et al. 2001; TAMAKAWA; IKUSHIMA; YOSHIDA, 2013).

Após as análises de crescimento celular e consumo de xilose, as cepas DLG-K1-Sut4 e ASY-3-Sut4, bem como as linhagens DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1, foram submetidas a ensaios fermentativos com alta densidade celular e condições microaeróbias em meios contendo 20 g.L⁻¹ de glicose como fonte de carbono. Os resultados destas análises estão apresentados na Figura 17. Ao observar a Figura 17, é possível notar que tanto o consumo de glicose, quanto a produção de etanol, xilitol, ácido acético e glicerol foram muito similares para linhagens testadas com ou sem o gene *PHO13* (comparando-se as cepas DLG-K1-Sut4 com ASY-3-Sut4 e DLG-K1-Xut1 com ASY-3-Xut1). Novamente, a deleção de *PHO13* parece não afetar o metabolismo da glicose, mesmo na linhagem *Hxt-null* e expressando os transportadores heterólogos Sut4 e Xut1. Isso vai ao encontro dos próprios resultados encontrados por

esse trabalho ao deletar esse gene nas linhagens CEN.PK2-1C, ASY-1 e ASY-2 e analisar a utilização de glicose quando as cepas estavam expressando enzimas XR e XDH heterólogas (vide gráficos A, B e C da Figura 11). Além disso, também corrobora com estudos que vêm demonstrando que linhagens *pho13Δ* não são afetadas fenotipicamente em seu consumo de glicose (VAN VLEET; JEFFRIES; OLSSON, 2008; KIM et al., 2015).

As cepas DLG-K1-Sut4 e ASY-3-Sut4, bem como as linhagens DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1, também foram submetidas a ensaios fermentativos com alta densidade celular e condições microaeróbias em meios contendo 20 g.L⁻¹ de xilose como única fonte de carbono. Os resultados destas análises estão apresentados na Figura 18 e a comparação entre os dados de consumo de xilose e produção de etanol a partir dessa fermentação estão resumidos na Tabela 11.

Observando os gráficos da Figura 18 é possível notar que apenas as linhagens expressando o transportador Xut1 da levedura *S. stipitis* (DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1) foram capazes de consumir a xilose e fermentá-la a etanol, indicando, novamente, a grande eficiência na captação da xilose pelo transportador Xut1 de *S. stipitis* em comparação com o transportador Sut4 de *S. arborariae*, presente nas linhagens que não conseguiram consumir essa fonte de carbono (DLG-K1-Sut4 e ASY-3-Sut4). As duas linhagens (DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1), inclusive, conseguiram consumir ≈94% da xilose dos meios (Tabela 11). Conforme já descrito por Sales et al. (2015), a clonagem do transportador Xut1 em *S. cerevisiae* com os principais genes para o transporte de xilose deletados permite eficiente consumo de xilose e produção de etanol.

Figura 17 – Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de glicose como fonte de carbono pelas linhagens DLG-K1-Sut4, ASY-3-Sut4, DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1. Na figura, são apresentados a biomassa celular (A), o consumo de glicose (B) e a produção dos metabólitos etanol (C), ácido acético (D) e glicerol (E) durante a fermentação. Duas linhagens de leveduras apresentadas nesta figura estão expressando o plasmídeo pGPD contendo o gene que codifica os transportador heterólogo Sut4: linhagem DLG-K1-Sut4, representada por quadrados com linhas azuis; e linhagem ASY-3-Sut-2 (*pho13Δ*), representada por círculos com linhas vermelhas. As outras duas linhagens apresentadas nesta figura estão expressando o plasmídeo pPGK contendo o gene que codifica o transportador heterólogo Xut1: linhagem DLG-K1-Xut1, representada por losangos com linhas verdes; ASY-3-Xut1 (*pho13Δ*), representada por triângulos com linhas pretas.

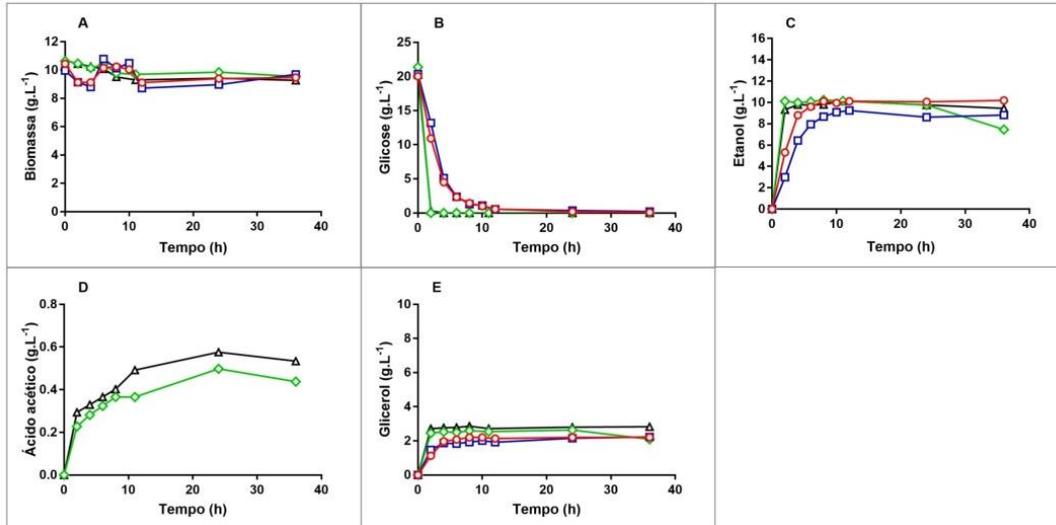


Figura 18 – Fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de xilose como fonte de carbono pelas linhagens DLG-K1-Sut4, ASY-3-Sut4, DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1. Na figura, são apresentados a biomassa celular (A), o consumo de xilose (B) e a produção dos metabólitos etanol (C), xilitol (D), ácido acético (E) e glicerol (F) durante a fermentação. Duas linhagens de leveduras apresentadas nesta figura estão expressando o plasmídeo pGPD contendo o gene que codifica os transportador heterólogo Sut4: linhagem DLG-K1-Sut4, representada por quadrados com linhas azuis; e linhagem ASY-3-Sut-2 (*pho13Δ*), representada por círculos com linhas vermelhas. As outras duas linhagens apresentadas nesta figura estão expressando o plasmídeo pPGK contendo o gene que codifica o transportador heterólogo Xut1: linhagem DLG-K1-Xut1, representada por losangos com linhas verdes; ASY-3-Xut1 (*pho13Δ*), representada por triângulos com linhas pretas.

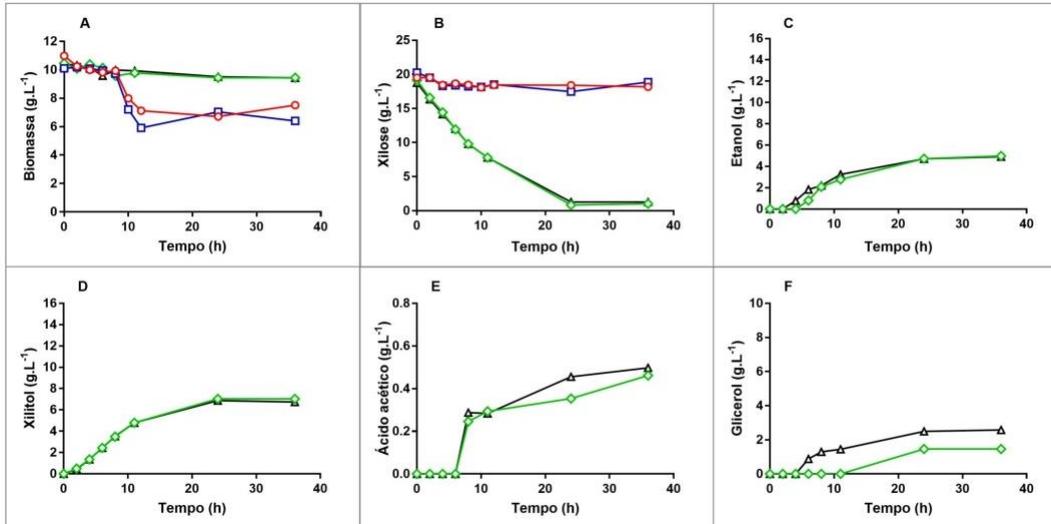


Tabela 11 – Comparação entre as performances fermentativas de 20 g.L⁻¹ xilose pelas cepas DLG-K1-Sut4, ASY-3-Sut4, DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1.

| Levedura | Consumo de xilose (%) | V _s (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^a | Ve (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b |
|---------------------------------|-----------------------|---|---|
| DLG-K1-Sut4 | 6,86 | 0,03 | 0,00 |
| ASY-3-Sut4 (<i>pho13Δ</i>) | 6,95 | 0,03 | 0,00 |
| DLG-K1-Xut1 | 94,62 | 0,50 | 0,13 |
| ASY-3-Xut1 (<i>pho13Δ</i>) | 94,64 | 0,51 | 0,13 |

NOTA: ^aVelocidade de consumo volumétrico máximo de xilose.

^bVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol

De maneira interessante, no entanto, vê-se que a deleção do gene *PHO13* não alterou o consumo da xilose, nem a produção de etanol e xilitol ou ácido acético, quando comparam-se os gráficos da Figura 18 (gráficos B, C, D e E) entre as linhagens DLG-K1-Sut4 e ASY-3-Sut4 (*pho13Δ*) e entre as linhagens DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1 (*pho13Δ*). A única diferença evidente foi o aumento na produção de glicerol para a cepa ASY-3-Xut1 *pho13Δ*. Ainda, a deleção desse gene não alterou a porcentagem de açúcar consumido, a velocidade de consumo de xilose e a velocidade de produção de etanol entre as linhagens com ou sem o gene *PHO13* (Tabela 11). Esse resultado foi surpreendente, visto que os estudos utilizando cepas *pho13Δ* vêm demonstrando melhorias no metabolismo da xilose mesmo em condições limitadas de oxigênio (VAN VLEET; JEFFRIES; OLSSON, 2008). Além disso, esse resultado contrasta os próprios resultados obtidos anteriormente no presente trabalho, onde foi visto que a deleção do gene *PHO13* aumentou o consumo de xilose e a produção de xilitol, além de ligeiro aumento na produção de etanol, nas linhagens expressando XR e XDH heterólogas (vide Figura 13 e Tabela 8) na mesma condição de alta densidade celular e microaerobiose. Contudo, a principal diferença entre o ensaio mencionado e este apresentado agora é que as linhagens agora analisadas possuem apenas um transportador de monossacarídeos expresso (Sut4 ou Xut1) e é deletada nos transportadores nativos de xilose (Hxts), diferentemente das cepas derivadas da linhagem CEN.PK2-1C daquele ensaio, que possuem todos os transportadores de hexoses nativos (dos quais, alguns deles também podem transportar

xilose). Isso sugere a possibilidade de que o fator limitante do presente ensaio seja a captação da xilose. Seria interessante, portanto, analisar a deleção do gene *PHO13* em linhagens expressando os transportadores estudados aqui (Sut4 e Xut1), mas com todos os transportadores de hexoses nativos.

Ao buscarmos na literatura trabalhos relacionados à expressão de transportadores de xilose heterólogos em linhagens de *S. cerevisiae* deletadas no gene *PHO13*, foi possível encontrar apenas um recente estudo apresentando essas condições de pesquisa. No trabalho em questão, o transportador de xilose Gxf1 proveniente da levedura *Candida intermedia* foi expresso em linhagem de *S. cerevisiae* *pho13Δ* e, de maneira similar aos nossos resultados, a cepas portando o transportador Gxf1 com ou sem o gene *PHO13* apresentaram o mesmo perfil em ensaios fermentativos (AHMED, 2016). Os resultados deste autor, bem como os apresentados no presente trabalho, indicam que a deleção do gene *PHO13* não é capaz de melhorar o consumo de xilose e a produção de etanol em condições limitantes de oxigênio quando transportadores heterólogos são expressos, pelo menos para casos em que as linhagens plataformas são *hxt-null*.

Em trabalho de Shen et al. (2012), foi verificado que a cepa *pho13Δ* teve seu crescimento em xilose e a produção de etanol prejudicados quando esta também apresentava alguns genes responsáveis pela respiração celular deletados. Por outro lado, quando a respiração celular não estava prejudicada, a cepa *pho13Δ* melhorou o consumo de xilose e a produção de etanol em comparação à sua parental não deletada no gene *PHO13*. Os resultados daqueles autores indicam que os efeitos positivos da deleção do gene *PHO13* para uma maior produção de etanol parecem depender da respiração celular. No caso de nossas linhagens ASY-3-Sut4 e ASY-3-Xut1, elas não possuem, a princípio, nenhum gene responsável pela respiração celular deletado e/ou modificado. Contudo, pode ser que haja alguma relação entre microaerobiose (como foi o caso das fermentações) e as linhagem *Hxt-null* do presente trabalho com os transportadores Sut4 e Xut1 expressos, e isso, por motivos ainda desconhecidos, pode estar interferindo nos benefícios da deleção do gene *PHO13*. Isso explicaria o porquê da deleção desse gene ter apresentado efeitos vantajosos na metabolização da xilose nas análises de crescimento celular em aerobiose (Figura 16) e não ter apresentado essas vantagens nas análises fermentativas em microaerobiose (Figura 18).

As linhagens DLG-K1-Sut4 e ASY-3-Sut4 (*pho13Δ*), bem como as linhagens DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1 (*pho13Δ*), também foram submetidas a ensaios de co-fermentação com alta densidade celular e condições microaeróbias em meios contendo 20 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de xilose como fontes de carbono, conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados destas análises estão apresentados na Figura 19 e a comparação entre os dados de consumo de xilose e produção de etanol a partir dessa co-fermentação estão resumidos na Tabela 12. Como esperado, vê-se por meio da Figura 19 que os perfis de fermentação da glicose e produção de etanol e glicerol quando comparados entre as cepas deletadas ou não no gene *PHO13* foram muito semelhantes (gráficos B, C, D e F), além da produção de ácido acético também ter sido similar (dados não mostrados). Isso está de acordo com os ensaios anteriores do presente trabalho, em que a deleção do gene *PHO13* pareceu não alterar o metabolismo da glicose. Similarmente, as cepas com ou sem o gene *PHO13* e portando o transportador Xut1 de *S. stipitis* (DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1) também apresentaram semelhança nos perfis de consumo de xilose e produção de xilitol (gráficos C e E, Tabela 12). Novamente, a deleção do gene *PHO13* pareceu não afetar o metabolismo da xilose na cepa *Hxt-null* expressando o transportador Xut1, quando em co-fermentação com a glicose.

Por outro lado, curiosamente, observando-se o gráfico C da Figura 19 e a Tabela 12, vê-se que as linhagens DLG-K1-Sut4 e ASY-3-Sut4 conseguiram consumir ≈12% e ≈17%, respectivamente, da xilose presente nos meios quando em co-fermentação com a glicose. Em contrapartida, foi visto que essas mesmas linhagens consumiram apenas ≈6% da xilose quando esta era a única fonte de carbono do meio (vide Figura 18 e Tabela 11). De maneira interessante, a presença da glicose aumentou a porcentagem de xilose consumida em comparação com o ensaio onde havia apenas xilose no meio. Semelhante a esse padrão que observamos com o transportador Sut4, um trabalho com engenharia evolutiva utilizando cepas de *S. cerevisiae* fermentadoras de xilose descobriu um novo transportador, Hxt36 (um híbrido entre os transportadores Hxt3 e Hxt6), que demonstrou co-transportar glicose e xilose, mas que não foi capaz de transportar xilose quando essa era a única fonte de carbono (NIJLAND et al., 2015). Outro trabalho utilizando a cepa de *S. cerevisiae* DLG-K1 (*hxt-null*) e expressando apenas o transportador Hxt1 dessa levedura notou que esse transportador

é capaz de co-transportar xilose e glicose, mas é incapaz de transportar xilose quando essa é a única fonte de carbono (GONÇALVES et al., 2014).

Esse perfil de transporte observado por alguns pesquisadores, e aparentemente também observado no presente trabalho pelo transportador Sut4 de *S. arborariae*, pode estar relacionado à ubiquitinação de algumas proteínas de membrana regulada pela presença ou ausência de glicose no meio fermentativo (FINLEY et al., 2012). É sabido que, em leveduras, diversas proteínas de membrana, incluindo transportadores de açúcares, podem ser removidas da superfície celular em resposta ao excesso ou a escassez de substrato, e que, em leveduras, esse mecanismo é realizado por ubiquitinação (FINLEY et al., 2012). De fato, estudos recentes demonstram que o transportador Hxt1 de *S. cerevisiae*, bem como o transportador evoluído Hxt36, são retirados da membrana celular e degradados quando os níveis de glicose do meio são baixos (O'DONNELL et al., 2015; NIJLAND et al., 2016). Alguns estudos inclusive vêm demonstrando que a deleção de alguns genes, como o gene *RODI* (que codifica uma proteína envolvida na ubiquitinação dos transportadores de membrana) pode evitar essa endocitose e degradação (O'DONNELL et al., 2015). Assim, seria interessante também a pesquisa e a deleção de genes relacionados à degradação das proteínas de membrana na nossa linhagem recombinante ASY-3 (*hxt-null* e *pho13Δ*), a fim de evitar uma possível ubiquitinação dos transportadores a serem clonados nessa levedura plataforma.

Figura 19 – Co-fermentação em batelada de meios sintéticos sem uracila contendo 2% de glicose e 2% de xilose como fontes de carbono pelas linhagens DLG-K1-Sut4, ASY-3-Sut4, DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1. Na figura, são apresentados a biomassa celular (A), o consumo de açúcares (B) e a produção dos metabólitos etanol (C), xilitol (F), ácido acético (D) e glicerol (E) durante a fermentação. Duas linhagens de leveduras apresentadas nesta figura estão expressando o plasmídeo pGPD contendo o gene que codifica os transportador heterólogo Sut4: linhagem DLG-K1-Sut4, representada por quadrados com linhas azuis; e linhagem ASY-3-Sut4 (*pho13Δ*), representada por círculos com linhas vermelhas. As outras duas linhagens apresentadas nesta figura estão expressando o plasmídeo pPGK contendo o gene que codifica o transportador heterólogo Xut1: linhagem DLG-K1-Xut1, representada por losangos com linhas verdes; ASY-3-Xut1 (*pho13Δ*), representada por triângulos com linhas pretas.

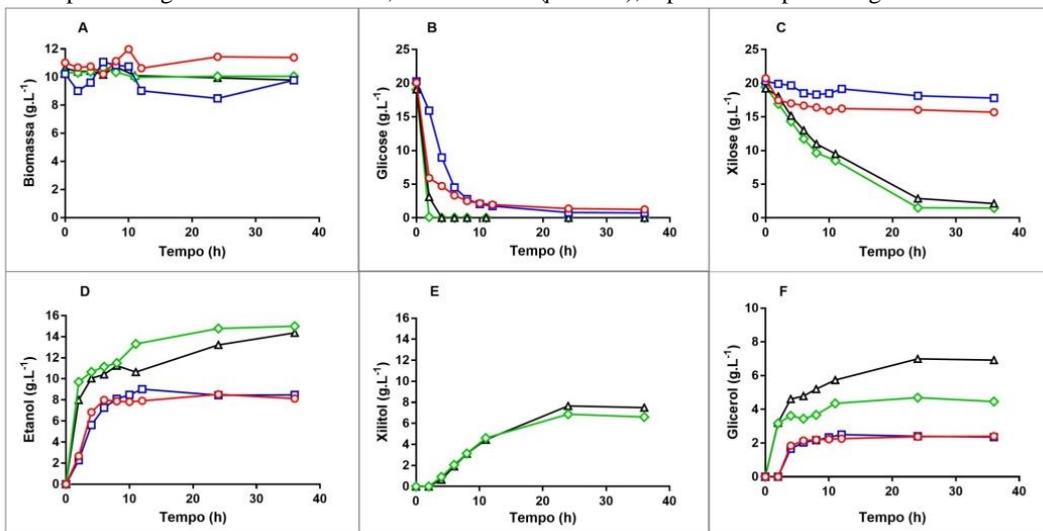


Tabela 12 – Comparação entre as performances fermentativas de 20 g.L⁻¹ xilose em co-fermentação com 20 g.L⁻¹ de glicose pelas cepas DLG-K1-Sut4, ASY-3-Sut4, DLG-K1-Xut1 e ASY-3-Xut1.

| Levedura | Consumo de xilose (%) | V _s (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^a | V _e (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b |
|---------------------------------|-----------------------|---|---|
| DLG-K1-Sut4 | 12,35 | 0,06 | 0,22 |
| ASY-3-Sut4 (<i>pho13Δ</i>) | 17,50 | 0,13 | 0,22 |
| DLG-K1-Xut1 | 92,47 | 0,49 | 0,41 |
| ASY-3-Xut1 (<i>pho13Δ</i>) | 91,74 | 0,50 | 0,42 |

NOTA: ^aVelocidade de consumo volumétrico máximo de xilose.
^bVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol

Por fim, vê-se também através da Figura 19 (gráfico C) que a linhagem ASY-3-Sut4 (*pho13Δ*) conseguiu consumir ligeiramente mais xilose do que sua parental não deletada nesse gene (DLG-K1-Sut4), além da velocidade de consumo desse açúcar também ter sido maior para a cepa *pho13Δ* (Tabela 12). Além disso, novamente, nota-se a maior formação de glicerol para a linhagem ASY-3-Xut1 (*pho13Δ*) (Figura 19 - F). Essa maior produção de glicerol, também vista por Fugitomi (2012) e Dall Agnollo (2014) nas linhagens *pho13Δ* dos autores em fermentações de xilose em microaerobiose, pode indicar um desequilíbrio maior no desbalanço redox oriundo da deleção desse gene.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos por meio do presente estudo permitiram concluir que:

1. A sobre-expressão do gene *XKSI* [que codifica a enzima xilulocinase (XK)] na linhagem CEN.PK2-1C, originando a linhagem ASY-1, é crucial para que esta última possa crescer em xilose e consumir essa fonte de carbono nos crescimentos aeróbios, após a expressão das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) provenientes das leveduras *S. arborariae* e *S. passalidarum*, respectivamente. Além disso, a sobre-expressão da enzima XK é decisiva para a produção de etanol a partir de xilose em fermentações microaeróbias.
2. A deleção do gene *PHO13* permite um consumo mais rápido e maior de xilose, tanto em crescimentos aeróbios quanto em fermentações microaeróbias, pela cepa sobre-expressando as enzimas XR e XDH heterólogas e a enzima XK endógena (cepa ASY-2-xr-xdh). Contudo, os efeitos positivos da deleção do gene *PHO13* para o metabolismo da xilose, sobretudo para a produção de etanol, parecem depender do balanço entre as atividades das enzimas XR e XDH.
3. A deleção do gene *PHO13* melhora ainda mais o consumo da xilose em meios com elevada concentração do açúcar. As células *pho13Δ* também apresentaram maior produção de xilitol e alterações na produção de glicerol. Vale ressaltar que, como perspectiva futura, seria interessante o teste das linhagens recombinantes ASY-1-xr-xdh-B e ASY-2-xr-xdh-B (*pho13Δ*) em ensaios fermentativos contendo compostos inibidores da fermentação (compostos que podem ser produzidos a partir do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica). Esses ensaios seriam interessantes para ampliar o conhecimento sobre os efeitos da deleção do gene *PHO13* na resistência celular.
4. Todas as linhagens de *S. cerevisiae pho13Δ* desenvolvidas por esse trabalho não apresentaram modificações fenotípicas no metabolismo da glicose, tanto em crescimentos aeróbios quanto em fermentações em microaerobiose.
5. A deleção do gene *PHO13* também permitiu um consumo mais rápido e maior de xilose nos crescimentos aeróbios pelas

linhagens ASY-3-Sut4 e ASY-3-Xut1, expressando, respectivamente, os transportadores de açúcares heterólogos Sut4 da levedura *S. arborariae* e Xut1 da levedura *S. stipitis*. Além disso, a produção de etanol foi maior nessa condição aeróbia para a linhagem *pho13Δ* expressando a permease Xut1. Nas fermentações em microaerobiose, no entanto, a deleção do gene *PHO13* não alterou o consumo de xilose pelas cepas *hxt-null* e expressando os transportadores Sut4 e Xut1 heterólogos, apenas aumentou a excreção de glicerol.

6. Em co-fermentações de glicose e xilose, a linhagem *pho13Δ* expressando o transportador Sut4 de *S. arborariae* foi capaz de consumir mais xilose do que nas fermentações onde a xilose era a única fonte de carbono do meio. Isso sugere que pode estar ocorrendo ubiquitinação do transportador Sut4 na ausência de glicose. Uma vez que recentes trabalhos têm encontrado genes relacionados à ubiquitinação de transportadores de açúcares, seria interessante, como perspectiva futura, deletar alguns desses genes envolvidos na endocitose das permeases na linhagem plataforma ASY-3, a fim de evitar uma possível ubiquitinação dos transportadores a serem clonados nessa cepa.
7. Seria interessante também, futuramente, avaliar a capacidade fermentativa das linhagens ASY-3-Sut4 e ASY-3-Xut1 em meios contendo altas concentrações de xilose.

6 REFERÊNCIAS

- AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeasts, *Pichia stipitis*. **Biotechnol Letters**. v.30, p.1515–1524, 2008.
- AHMED, H.Z. **Genetic engineering of *S. cerevisiae* to confer xylose metabolism with a view to biofuel production**. Tese (Doutorado em Filosofia na Faculdade de Biologia, Medicina e Saúde - Escola de Ciências Biológicas). The University of Manchester, Manchester, UK, 2016.
- APEL, A.R.; OUELLET, M.; SZMIDT-MIDDLETON, H.; KEASLING, J.D.; MUKHOPADHYAY, A. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature Commun**. v.6, p.19512, 2016.
- AMORE, R.; WILHELM, M.; HOLLENBERG, C.P. The fermentation of xylose - an analysis of the expression of Bacillus and Actinoplanes xylose isomerase genes in yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.30, p.351-357, 1989.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J.V.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.91, p.1267-1275, 2011.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**. v.29, p.719-739, 2005.
- ATTFIELD, P.V.; BELL, P.J. Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source. **FEMS yeast research**. v.6, p.862-868, 2006.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. Ed. John Wiley & Son, 2003.
- BAMBA, T.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Disruption of *PHO13* improves ethanol production via the xylose isomerase pathway. **AMB Express**. v.6, p.4, 2016.

- BENGTSSON, O.; HAHN-HÄGERDALL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Xylose reductase from *Pichia stiptis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**. v.2, p.9, 2009.
- BOLEN, P.L.; DETROY, R.W. Induction of NADPH-linked D-xylose reductase and NAD-linked xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* by D-xylose, L-arabinose, or D-galactose. **Biotechnology and Bioengineering**. v.27, p.302-307, 1985.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p.248-254, 1976.
- BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.75, p. 2304-2311, 2009.
- BÜCKER, A. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a tolerância ao etanol**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2014.
- CADETE, R.M.; SANTOS, R.O; MELO, M.A; MOURO, A.; GONÇALVES, D.L.; STAMBUK, B.U.; GOMES, F.C.; 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.1338-1342, 2009.
- CADETE, R.M; MELO, M.A.; DUSSAN, K.J.; RODRIGUES, R.C.L.B; SILVA, S.S.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.; ROSA, C.A. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose- Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **Plos ONE**. v.7, p.43135, 2012.
- CADETE, R. M. ; MELO, M. A.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S. ; ; MOURO, A.; PROMPT, A. H.; GOMES, F. C. O.; STAMBUK, B.U.; LACHANCE, M-A; ROSA, C. A. *Spathaspora brasilienses* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov., *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel D-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 103, p. 421-23, 2013.

- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Status and Perspectives. **Bioresource Technology**. v.101, p.4754-4766, 2010.
- CHIANG, L., GONG, C.; CHEN, L.; TSAO, G.T. D-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.42, p.284-289, 1981.
- COLABARDINI, A.N.; RIES, L.N.A.; BROWN, N.A.; DOS REIS, T.F.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M.H.S.; MENINO, J.F., RODRIGUES, F.; GOLDMAN, G.H. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology for Biofuels**. v.7, p.46-64, 2014.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar. Safra 2015/2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf> Acesso em: 18 Jan. 2017.
- CORTEZ, L.A.B.; LORA, E.E.S.; GÓMEZ, E.O. Biomassa para Bioenergia. UNICAMP, Campinas, 2008.
- CUNHA-PEREIRA, F.D.; HICKERT, L.R.; SEHNEM, N.T.; SOUZA-CRUZ, P.B.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**. v.102, p. 4219-25, 2011.
- DALL AGNOLO, D. **Análise de Supressores da Fermentação de Xilose em *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2014.
- DARIO, M.G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, São Paulo, 2012.
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. **International Journal of Biological Sciences**. v.5, p.578-595, 2009.

- DEBUS, D.; METHNER, H.; SCHULZE, D.; DELLWEG, H.
Fermentation of Xylose with the Yeast *Pachysolen tannophilus*.
European journal of applied microbiology and biotechnology.
v.17, p.287-291, 1983.
- DOS SANTOS, L.V.; DE BARROS, G.M.C.; GALLARDO, J.C.M.;
PIROLA, R.A.S.; CALDERÓN, L.L.; DE CARVALHO-NETTO,
O.V.; PARREIRAS, L.S.; CAMARGO, E.L.O.; DREZZA, A.L.;
MISSAWA, S.K.; TEIXEIRA, G.S.; LUNARDI, I.; BRESSIANI, J.;
PEREIRA, G.A.G. Second-Generation Ethanol: The Need is
Becoming a Reality. **Industrial Biotechnology**. v.12, p.40-57, 2016.
- DU, J; LI, S.; ZHAO, H. Discovery and characterization of novel D-
xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia*
stipiti. **Molecular BioSystems**. v.6, p.2150-2156, 2010.
- 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,
p.360-364, 1986.
- DU PREEZ, J.C.; VAN DER WALT, J.P. Fermentation of D-xylose to
ethanol by a strain of *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**. v.5,
p.357-362, 1983.
- DUVAL, E.H.; ALVES Jr., S.L.; DUNN, B.; SHERLOCK, G.;
STAMBUK, B.U. Microarray karyotyping of maltose-fermenting
Saccharomyces yeasts with differing maltotriose utilization profiles
reveals copy number variation in genes involved in maltose and
maltotriose utilization. **Journal of Applied Microbiology**. v.109,
p.289-259, 2010.
- ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-
HÄGERDAL, B. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant
Saccharomyces cerevisiae Carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in
Mineral Medium Chemostat Cultures. **Applied and Environmental**
Microbiology. v.66, p.3381-3386, 2000.
- ELIASSON, A.; HOFMEYR, J.S.; PEDLERA,S.; HAHN-
HÄGERDAL, B. The xylose reductase/xylitol
dehydrogenase/xylulokinase ratio affects product formation in
recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme**
and Microbial Technology. v.29, p.288-297, 2001.
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE). **Análise de**
Conjuntura dos Biocombustíveis. 2015. Disponível em:

<<http://www.epe.gov.br/Petroleo/Documents/AnalisedeConjunturadosBiocombustveisboletinsperiódicos/AnalisedeConjunturadosBiocombustiveis-Ano2015.pdf>>.

- ENTIAN, K.D.; KOTTER, P. 23 yeast mutant and plasmid collections. **Methods in Microbiology**. v.26, p.431-449, 1998.
- FERREIRA, D.; NOBRE, A.; SILVA, M. L.; FARIA-OLIVEIRA, F.; TULHA, J.; FERREIRA, C.; LUCAS, C. *XYLH* encodes a xylose/H⁺ symporter from the highly related yeast species *Debaryomyces fabryi* and *Debaryomyces hansenii*. **FEMS Yeast Research**. v.13, p.585-596, 2013.
- FINLEY, D.; ULRICH, H.D.; SOMMER, T.; KAISER, P. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**. v.192, p.319-360, 2012.
- FRENCH, C.E. Synthetic biology and biomass conversion: a match made in heaven? **Journal of the Royal Society**. v.6, p.S547-S558, 2009.
- FUJITOMI, K.; SANDA, T.; HASUNUMA, T. KONDO, A. Deletion of the *PHO13* gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. **Bioresource Technology**. v.111, p. 161166, 2012.
- GALABOVA, D.; TULEVA, B.; VASILEVA-TONKOVA, E.; CHRISTOVA, N. Purification and properties of alkaline phosphatase with protein phosphatase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. **Zeitschrift für Naturforschung**. v.55, p.588-593, 2000.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.59, p.618-628, 2002.
- GÁRDONYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B. The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.32, p. 252-259, 2003.
- GARDONYI, M.; OSTERBERG, M.; RODRIGUES, C.; SPENCER-MARTINS, I.; HAHN-HAGERDAL, B. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Res.** v.3, p.45-52, 2003.

- GIETZ, D.; ST JEAN, A.; WOODS, R.A.; SCHIESTL, S.H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. **Nucleic Acids Research**. v. 20, p.1425, 1992.
- 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.
- GÍRIO, F.M; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresour Technol**. 101: 4775-4800, 2010.
- GOLDEMBERG, J. The ethanol program in Brazil. **Environmental Research Letters**. v.1, 2006.
- GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**. v.1, p.6, 2008.
- GONÇALVES, D.L. **Influência dos transportadores de açúcares na fermentação de xilose por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2014.
- GONÇALVES, D.L.; MATSUSHIKA, A.; DE SALES, B.B.; GOSHIMA, T.; BON, E.P.; STAMBUK, B.U. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. **Enzyme and Microbial Technology**. v.63, p.13-20, 2014.
- GRABOWSKA, D.; CHELSTOWSKA, A. The *ALD6* gene product is indispensable for providing NADPH in yeast cells lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **The Journal of Biological Chemistry**. V.18, p.13984-13988, 2003.
- GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**. v.10, p141-146, 2006.
- HA, S.-J.; GALAZKA, J.M.; KIM, S.R.; CHOI, J.H.; YANG, X.; SEO, J.H.; GLASS, N.L.; CATE, J.H.; JIN, Y.S. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.108, p.504-509, 2010.
- HAMACHER, T.; BECKER, J.; GÁRDONYI, M.; HAHN-HAGERDAL, B.; BOLES, E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their

- influence on xylose utilization. **Microbiology**. v.148, p.2783-2788, 2002.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOGG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast. **Enzyme Microbial Technol.** v.16, p933-943, 1994.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; WAHLBOM, C. F.; GÁRDONYI, 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.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. v.108, p.147-177, 2007.
- HASUNUMA, T.; SANDA, D.; YAMADA, R.; YOSHIMURA, K.; ISHII, J.; KONDO, A. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**. v.10, p.2-14, 2011.
- HO, N.W.Y.; STEVIS, P.; ROSENFELD, S.; HUANG, J.J.; TSAO, G.T. Expression of the *E. coli* xylose isomerase gene by a yeast promoter. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**. v.13, p.245-250, 1983.
- HO, N.W.; LIN, F.P.; HUANG, S.; ANDREWS, P.C.; TSAO, G.T. Purification, characterization, and amino terminal sequence of xylose reductase from *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.12, p.33-39, 1990.
- HO, N. W.; CHEN, Z.; BRAINARD, A.P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of 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* Yeasts for Effective Cofermentation of Glucose and Xylose from Cellulosic Biomass to Fuel Etanol. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. v.65, p.163-192, 1999.

- HORAK J. Yeast nutrient transporters. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1331, p. 41-79, 1997.
- HOU. X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v 94, p. 205-214, 2012.
- JEFFRIES, T.W. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. **Biotechnology Letters.** v.3, p.213-218, 1981.
- JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology.** v.17, p.320-326. 2006.
- JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y.S.U.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology.** v.25, p.319-326, 2007.
- JEPPSSON, M.; JOHANSSON, B.; JENSEN, P.R.; HAHNHÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. The level of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity strongly influences xylose fermentation and inhibitor sensitivity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Yeast.** v.20, p.1263-1272, 2003.
- JIN, Y.S.; LEE, T. H.; CHOI, Y. D.; RYU, Y. W.; SEO, J. H. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing genes for xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Pichia stipitis*. **Microbial Biotechnology.** v.10, p564-567, 2000.
- JIN, Y.S.; NI, H.; LAPLAZA, J.M.; JEFFRIES, T.W. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. **Applied and Environmental Microbiology.** v.69, p.495-503, 2003.
- JIN, Y.S.; JEFFRIES, T.W. Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering.** v.6, p.229-238, 2004.
- 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 Microbiology and Biotechnology.** v.75, p.8249-8256, 2005.

- JOHANSSON, B.; CHRISTENSSON, C.; HOBLEY, T.; HAHNHÄGERDAL, B. Xylulokinase overexpression in two Strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, p.4249-4255, 2001.
- KANEKO, Y.; TOH-E, A.; BANOO, I.; OSHIMA, Y. Molecular characterization of a specific p-nitrophenylphosphatase gene, *PHO13*, and its mapping by chromosome fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular & General Genetics**. v.220, p.133-139, 1989.
- KANEKO, Y.; TOH-E, A.; OSHIMA, Y. Identification of the genetic locus for the structural gene and a new regulatory gene for the synthesis of repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**. v.2, p.127-137, 1982.
- KARHUMAA, K.; SANCHEZ, R.G.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND M.F. Comparison of the xylose reductasexylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**. v.6, p.5, 2007a.
- KARHUMAA, K.; FROMANGER, R.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.73, p.1039-1046, 2007b.
- KRUGER, N.J.; VON SCHAEWENY, A. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. **Current Opinion in Plant Biology**. v.6, p236-246, 2003.
- KATAHIRA, S.; ITO, M.; TAKEMA, H.; FUJITA, Y.; 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, p.115-119, 2008.
- 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, p.336-343, 2012.

- KIM, S.R.; SKERKER, J.M.; KANG, W.; LESMANA, A.; WEI, N.; ARKIN, A.P.; JIN, Y.S. Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**. v.8,p.e57048, 2013.
- KIM S.R.; XU, H.; LESMANA, A.; KUZMANOVIC, U.; AU, M.; FLORENCIA, C.; OH, E.J.; ZHANG, G.; KIM, K.H.; JIN, Y.S. Deletion of *PHO13*, encoding haloacid dehalogenase type IIA phosphatase, results in upregulation of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.81, p.1601-1609, 2015.
- KILIAN, S.G.; VAN UDEN, N. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.27, p.545-548, 1988.
- KIM, S. R.; PARK, Y. C.; JIN, Y. S.; SEO, J. H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnol. Adv.**, v. 31, p. 851-861, 2013.
- KONISHI, J.; FUKUDA, A.; MUTAGUCHI, K.; UEMURA, T. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using endogenous xylose-assimilating genes. **Biotechnology letters**. v.37, p.1623-1630, 2015.
- KOPPRAM, R.; OLSSON, L. Combined substrate, enzyme and yeast feed in simultaneous saccharification and fermentation allow bioethanol production from pretreated spruce biomass at high solids loadings. **Biotechnology for Biofuels**. v.7, p.54, 2014.
- KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, n. 5, p. 776-783, 1993.
- KUHN, A.; VAN ZYL, C.; VAN TONDER, A.; PRIOR, B.A. Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, p.1580-1585, 1995.
- KUYPER, M.; HARHANGI, H.R.; STAVE, A.K.; WINKLER, A.A.; JETTEN, M.S.; DE LAAT, W.T.; DEN RIDDER, J.J.; OP DEN CAMP, H.J.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? **FEMS Yeast Research**. v.4, p.69-78, 2003.

- LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**. v.10, 229-242, 1993.
- LANDRY, C.R.; TOWNSEND, J.P.; HARTL, D.L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**. v.15, p.575-591, 2006.
- LAROCHELLE, M., DROUIN, S.; ROBERT, F.; TURCOTTE, B. Oxidative Stress-Activated Zinc Cluster Protein Stb5 Has Dual Activator/repressor Functions Required for Pentose Phosphate Pathway Regulation and NADPH Production. **Molecular and Cellular Biology**. v.26, p.6690–6701, 2006.
- LEANDRO, M. J.; SPENCER-MARTINS, I; GONÇALVES, P. The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/xylose facilitador. **Microbiology**. v. 154, p. 1646-1655, 2008.
- LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS Yeast Research**. v.9, p.511-525, 2009.
- LEE, W. -J.; KIM, M. -D.; RYU, Y. -W.; BISSON, L.F.; SEO, J. -H. Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol** 60: 186–191, 2002.
- LEE, S.M.; JELLISON, T.; ALPER, H.S. Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields. **Biotechnology for Biofuels**. v.7, p.122, 2014.
- LI, X.; WENG, J.-K.; CHAPPLE, C. Improvement of biomass through lignin modification. **The Plant Journal**. v.54, p.569-581, 2008.
- LI, Y.C.; GOU, Z.X.; LIU, Z.S.; TANG, Y.Q.; AKAMATSU, T.; KIDA, K. Synergistic effects of TAL1 over-expression and *PHO13* deletion on the weak acid inhibition of xylose fermentation by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Biotechnology Letters**. v.36, p.2011-2021, 2014.
- LIEW, W.H.; HASSIM, M.H.; NG, D.K.S. Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. **Journal of Cleaner Production**. v.71, p.11-29, 2014.

- LOBO, F.P.; GONÇALVES, D.L.; ALVES Jr. S.L.; GERBER, A.L.; DE VASCONCELOS, A.T.; BASSO, L.C.; FRANCO, G.R.; SOARES, M.A.; CADETE, R.M.; ROSA, C.A.; STAMBUK, B.U. Draft Genome Sequence of the D-Xylose-Fermenting Yeast *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1AT. **Genome Announcements**. v.2, p.e01163-13, 2014.
- LONG, T.M.; SU, Y.K.; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L.B.; JEFFRIES, T.W. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Appl Environ Microbiol**. v.70, p.5494-5500, 2012.
- LUCAS, C.; VAN UDEN, N. Transport of hemicellulose monomers in the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.23, p.491-495, 1986.
- LYND, R.L.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.66, p.506-577, 2002.
- MA, M., LIU, Z.L.; MOON, J. Genetic Engineering of Inhibitor-Tolerant *Saccharomyces cerevisiae* for Improved Xylose Utilization in Ethanol Production. **BioEnergy Research**. v.5, p.459-469, 2012.
- MACRELLI, S; GALBE, M.; WALLBERG, O. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. **Biotechnology for Biofuels**. v.7, p.26, 2014.
- MARTIN-GALIANO, A.J.; FRISHMAN, D. Defining the fold space of membrane proteins: the CAMPS database. **Proteins**. v.64, p.906-922, 2006.
- MATSUSHIKA, A & SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* requires high activity of xylose reductase and moderate xylulokinase activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.106, p.306-309, 2008.
- 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*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 81: 243–255, 2008a.

- MATSUSHIKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP+-dependent xylitol dehydrogenase, and xyluloquinase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.105, p.296-299, 2008b.
- MATSUSHIKA, A.; HIROYUKI, I.; TSUTOMU, K.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.84, p.37-53, 2009a.
- MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAIKINO, K.; SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production by a recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain with a genome-integrated NADP+-dependent xylitol dehydrogenase gene. **Applied and environmental microbiology**. v.75, p.3818-3822, 2009b.
- MEADEN, P.G.; DICKINSON, F.M.; MIFSUD, A. The *ALD6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cytosolic, Mg²⁺ activated acetaldehyde dehydrogenase. **Yeast**. v.13, p.1319-1327, 1997.
- MÉRICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS Journal**. v.274, p.976-989, 2007.
- MOES, C.J.; PRETORIUS, I.S.; VAN ZYL, W.H. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**. v.18, p.269-274, 1996.
- MOON, J.; LIU, Z.L.; MA, M.; SLININGER, P.J. New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.2, p.247-254, 2013.
- MOURO, A. **Clonagem e expressão em *Saccharomyces cerevisiae* de xilose redutases e xilitol desidrogenase das leveduras brasileiras *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum***. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2016.

- MOYSÉS, D.N.; REIS, V.C.; DE ALMEIDA, J.R.; DE MORAES, L.M.; TORRES, F.A. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. **International Journal of Molecular Sciences**. v.17, p.207, 2016.
- MÜLLER, G. **Engenharia genômica da linhagem de levedura industrial CAT-1 visando melhorar o rendimento da Produção de etanol combustível**. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2013.
- NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Tradução Fabiana Horn e colaboradores. Revisão técnica Carla Dalmaz e Sandra E. Farias. 6 ed. Artmed, Porto Alegre, 2014.
- NGUYEN, N; SUH, S.; 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 jeffriesse* sp.nov. **Mycological Research**. v. 110, p. 1232-1241, 2006.
- NI, H.; LAPLAZA, J.M.; JEFFRIES T.W. Transposon Mutagenesis to Improve the Growth of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on D-Xylose. **Applied and Environmental Microbiology**. v.73, p.2061-2066, 2007.
- NIJLAND, J.G.; SHIN, H.Y.; DE JONG, R.M.; DE WAAL, P.P.; KLAASSEN, P.; DRIESSEN, A.J. Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific d-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**. v.7, p.168, 2014.
- NIJLAND, J.G.; VOS, E.; SHIN, H.Y.; DE WAAL, P.P.; KLAASSEN, P.; J.; DRIESSEN, A.J.M.; Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* **Biotechnology for Biofuels**. v.9, p.158, 2016.
- SÀNCHEZ NOGUÉ, V.; KARHUMAA, K. Xylose fermentation as a challenge for commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. **Biotechnology Letters**. v.37, p.761-772, 2014.
- O'DONNELL, A.F.; MCCARTNEY, R.R.; CHANDRASHEKARAPPA, D.G.; ZHANG, B.B.; THORNER, J.; SCHMIDT, M. 2-Deoxyglucose impairs *Saccharomyces cerevisiae* growth by stimulating Snf1-regulated and α -arrestin-mediated

- trafficking of hexose transporters 1 and 3. **Molecular and Cellular Biology**. v.35, p.939-955, 2015.
- OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**. v.1, p.7, 2008
- PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibitors and mechanisms of inhibition **Bioresource Technology**. v.74, p.17-24, 2000.
- PARACHIN, N.S.; BERGDAHL, B.; VAN NIEL, E.W.J.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Kinetic modelling reveals current limitations in the production of ethanol from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**. v.13, p.508-517, 2011.
- PEREIRA Jr., N.; COUTO, M.A.P.G.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of Lignocellulosic Composition for Fuel Ethanol Production within the Context of Biorefinery. In: **Series on Biotechnology**. Editora: Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v.2, 45p. 2008.
- PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I.C.; MENOSSI, M.; DOS SANTOS, R.R.; FILHO, S.O.; PENNA, T.C. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.121-124, p.59-70, 2005.
- PITKÄNEN, J.P.; ARISTIDOU, A.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metab. Eng.** v.5, p.16-31, 2003.
- RICHARD, P.; TOIVARI, M.H.; PENTTILÄ, M. The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism. **FEMS Microbiology Letters**. v.190, p.39-43, 2000.
- RIZZI, M.; HARTWART, K.; BUI THANH, N. A.; DELLWEG, H. A kinetic study of the NAD⁺ xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. **Journal of Fermentation & Bioengineering**. v.67, p.25-30, 1989.
- RODRIGUEZ-PEÑA, J.M.; CID, V.J.; ARROYO, J.; NOMBELA, C. The YGR194c (*XKS1*) gene encodes the xylulokinase from the

- budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**. v.162, p.155-160, 1998.
- RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RÅDSTRÖM, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**. v.3, p.5, 2010.
- SARITHA, M.; ARORA, A.; LATA. Biological pretreatment of lignocelulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility. **Indian Journal of Microbiology**. v.52, p.122-130, 2012.
- SAKIHAMA, Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Improved ethanol production from xylose in the presence of acetic acid by the overexpression of the HAA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.119, p.297-302, 2014.
- SALES, B.B. **Clonagem e expressão heteróloga de transportadores de xilose em linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante**. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2015.
- SALES, B.B.; SCHEID, B.; GONÇALVES, D.L.; KNYCHALA, M.M.; MATSUSHIKA, A.; BON, E.P.S.; STAMBUK, B.U. Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing D-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Lett**. v.10, p.1973-1982, 2015.
- SALKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**. v.37, p.19-27, 2012.
- 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, p. 1041-1052, 2007.
- SCHNEIDER, H.; WANG, P. Y.; CHAN, Y. K.; MALESZKA, R. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**. v.3, p.89-92, 1981.
- SCHNEIDER, H.; MALESZKA, R.; NEIRINCK, L. G.; VELIKY, I. A.; WANG, P. Y.; CHAN, Y. K. Ethanol production from Dxylose and several other carbohydrates by *Pachysolen tannophilus* and other

- yeasts. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. v.27, p.57-71, 1983.
- SEDLAK, M.; HO, N. W. Y. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. **Yeast**. v.21, p.671-684, 2004.
- SHEN, Y.; CHEN, X.; PENG, B.; CHEN, L.; HOU, J.; BAO, X. An efficient xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained through adaptive evolution and its global transcription profile. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.96, p.1079-1091, 2012.
- SHERMAN, F. An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. (2001). Disponível em: <<https://www.uni-marburg.de/fb20/cyto/lehre/praktikumsunterlagen/vl/hefe/sherman01>> Acesso em: 15 Jan. 2017.
- SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; LOMON, J. M.; BOTHAST, R. J.; LADISCH, M. R.; OKOS, M. R. Evaluation of a Kinetic Model for Computer Simulation of Growth and Fermentation by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* Fed D-Xylose. **Biotechnology and Bioengineering** v.111, p.1532-1540, 2014.
- SMILEY, K. L.; BOLEN, P. L. Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**. v.4, p.607-610, 1982.
- STAMBUK, B.U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BOM, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of scientific and industrial research**. v. 67, p.918-926, 2008.
- STAMBUK, B.U.; FRANDEN, M.A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.105-108, p.255-263, 2003.
- SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.; MEDEIROS, A.B.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.; FERRARA, M.A.; DA SILVA BON, E.P.; DE MORAES, L.M.; ARAÚJO JDE,

- A.; TORRES, F.A. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**. v. 101, p.4820-4825, 2010.
- SUBTIL, T.; BOLES, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**. v.5, p.14, 2012.
- TANTIRUNGKIJ, M.; NAKASHIMA, N.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.75, p.83-88, 1993.
- TAVARES, J.M.; 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 Microb. Technol.** v.26, p.743-747, 2000.
- TOIVARI, M.H.; ARISTIDOU, A.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: importance of xylulokinase (*XKS1*) and oxygen availability. **Metabolic engineering**. v.3, p.236-249, 2001.
- TOIVARI, M.H.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Endogenous Xylose Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, p.3681-3686, 2004.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (UNICA). Disponível em: <<http://www.unica.com.br/colunas/470156692036979688/bioeletrici-dade-por-cento-o-que-falta-para-esta-alternativa/>>. Acesso em: 11 Set. 2016.
- VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Letters**. v.32, p.199-224, 1986.
- VAN MARIS, A.J.; WINKLER, A.A.; KUYPER, M.; DE LAAT, W.T.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: Xylose isomerase as a key component. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. v.108, p.179-204, 2007.
- VAN VLEET, J.H.; JEFFRIES, T.W.; OLSSON, L. Deleting the paranitrophenyl phosphatase (pNPPase), *PHO13*, in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* improves growth and ethanol production on D-xylose. **Metabolic Engineering**. v.10, p.360-369, 2008.

- VERDUYN, C., VAN KLEEF, R., FRANK, J., SCHREUDER, H., VAN DIJKENJ, P., SCHEFFERS, W. A. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Biochemical Journal**. v.226, p.669-677, 1985.
- WAHLBOM, C.F.; CORDERO OTERO, R.R.; VAN ZYL, W.H.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L.J. Molecular analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with improved ability to utilize xylose shows enhanced expression of proteins involved in transport, initial xylose metabolism, and the pentose phosphate pathway. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, p.740-746, 2003.
- WALFRIDSSON, M.; BAO, X.; ANDERLUND, M.; LILIUS, G.; BÜLOW, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Ethanolic fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus xylA* gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, p.4648-4651, 1996.
- WALFRIDSSON, M.; ANDERLUND, M.; BAO, X.; HAHNHÄGERDAL, B. Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* *XYL1* and *XYL2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilisation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 48, p.218-224, 1997.
- WANG, Y., REN, Y. C., ZHANG, Z. T., KE, T., & HUI, F. L. *Spathaspora allomyrinae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from a scarabeid beetle *Allomyrina dichotoma*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. v.66, p.2008-2012, 2016.
- WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Complete Reversal of Coenzyme Specificity of Xylitol Dehydrogenase and Increase of Thermostability by the Introduction of Structural Zinc. **The Journal of Biological Chemistry**. v.11, p.10340-10349, 2005.
- WATANABE, S.; PACK, S.P.; SALEH, A.A.; ANNALURU, N.; KODAKI, T.; MAKINO, K. The positive effect of the decreased NADPH-preferring activity of xylose reductase from *Pichiastipitis* on ethanol production using xylose-fermenting recombinant

- Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.71, p.1365-1369, 2007a.
- WATANABE, S.; PACK, S.P.; SALEH, A.A.; ANNALURU, N.; KODAKI, T.; MAKINO, K. The positive effect of the decreased NADPH-preferring activity of xylose reductase from *Pichia stipitis* on ethanol production using xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v.71, p.1365-1369, 2007b.
- WATANABE, S.; SALEH, A.A.; PACK, S.P.; ANNALRU, N.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase. **Journal of Biotechnology**. v.130, p.316319, 2007c.
- WEIERSSTALL, T.; HOLLENBERG, C.P.; BOLES, E. Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. **Mol Microbiol**. v. 31, p.871-83, 1999.
- WEUSTHUIS, R.A.; PRONK, J.T.; VAN DEN BROEK, P.J.A.; VAN DIJKEN, J.P. Chemostat Cultivation as a Tool for Studies on Sugar Transport in Yeasts. **Microbiological Reviews**. v.58, p.616-630, 1994.
- WOHLBACH, D. J.; KUO, A.; SATO, T. K.; POTTS, K. M.; SALAMOV, A. A.; LABUTTI, K. M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGILINAN, J. L.; LINDQUIST, E. A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; JIN, M.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. D.; JEFFRIES, T. W.; ZINKEL, R.; BARRY, K. W.; GRIGORIEV, C.; GASH, A. P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v.108, p.13212-13217, 2011.
- XIONG, M.; CHEN, G.; BARFORD, J. Alteration of xylose reductase coenzyme preference to improve ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* from high xylose concentrations. **Bioresource Technology**. v.102, p.9206-9215, 2011.
- XU, H., KIM, S.; SOREK, H.; LEE, Y.; JEONG, D.; KIM, J.; OH, E.J.; YUN, E.J.; WEMMER, D.E.; KIM, K.H.; KIM, S.R.; JIN, Y.S. *PHO13* deletion-induced transcriptional activation prevents sedoheptulose accumulation during xylose metabolism in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**. v.34, p.88-96, 2016.

- YANG, V.W.; JEFFRIES, T.W. Regulation of phosphotransferases in glucose- and xylose-fermenting yeasts. **Applied biochemistry and biotechnology**. v.63-65, p.97-108, 1997.
- YOUNG, E.; POUCHER, A.; COMER, A.; BAILEY, A.; ALPER, H. Functional Survey for Heterologous Sugar Transport Proteins, Using *Saccharomyces cerevisiae* as a Host. **Applied and Environmental Microbiology**. v.77, p.3311-3319, 2011.
- YOUNG, 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.
- YU, S.; JEPSSON, H.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylulose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and xylose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.44, p.314-320, 1995.
- YOKOYAMA, S.; KINOSHITA, Y.; SUZUKI, T.; KAWAI, K.; HORITSU, H.; TAKAMIZAWA, K. Cloning and sequencing of two d-xylose reductase genes (*xyrA* and *xyrB*) from *Candida tropicalis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.80, p.603-605, 1995.
- ZANIN, G. M. et al. Brazilian Bioethanol Program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.84-86, p.1147-1161, 2000.
- ZHANG, Z.; DONALDSON, A.A.; MA, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advances**. v.30, p.913-919, 2012.