

Leonardo Gomes Kretzer

**CLONAGEM DE TRANSPORTADORES DE AÇÚCARES
ORIUNDOS DE *Spathaspora arborariae* EM LINHAGEM
RECOMBINANTE DE *Saccharomyces cerevisiae***

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: Prof. Dr. Boris Juan Carlos
Ugarte Stambuk

Florianópolis
2019

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

Kretzer, Leonardo
CLONAGEM DE TRANSPORTADORES DE AÇÚCARES ORIUNDOS
DE *Spathaspora arborariae* EM LINHAGEM RECOMBINANTE
DE *Saccharomyces cerevisiae* / Leonardo Kretzer ;
orientador, Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, 2019.
91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

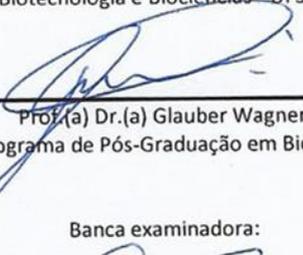
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Biotecnologia
e Biociências. 3. Etanol 2G. 4. Fermentação. 5.
Xilose. I. Ugarte Stambuk, Boris Juan Carlos . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III.
Titulo.

**"Clonagem de transportadores de açúcares oriundos de *Spathospora arborariae*
em linhagem recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*"**

Por

Leonardo Gomes Kretzer

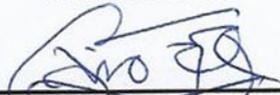
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da
Banca Examinadora (004/2019/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências – UFSC.



Prof. (a) Dr. (a) Glauber Wagner

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

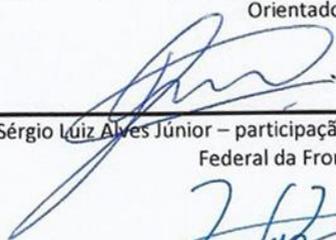
Banca examinadora:



Dr. (a) Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk (Universidade Federal de Santa Catarina)

Orientador(a)

Prof. Dr. Glauber Wagner
Coordenador do PPG em
Biotecnologia e Biociências
CCB/UFSC



Dr. (a) Sérgio Luiz Alves Júnior – participação por videoconferência (Universidade
Federal da Fronteira Sul)



Dr. (a) Rafael Diego da Rosa (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2019.

Este trabalho é dedicado aos meus
amigos da vida e família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Boris Stambuk, pela oportunidade, paciência e orientações durante todo o período que estive no laboratório.

Aos meus pais, Maurício Kretzer e Ivete Gomes Kretzer que me sustentaram, apoiaram, amaram e ensinaram durante toda a minha vida, permitindo que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos, Stefano e Isadora Gomes Kretzer, e todo o restante da família, que sempre estiveram presentes para dar conselhos e ouvir meus desabafos.

Aos meus amigos da vida (em especial o Theo C. Bräscher, Gabriela F. Gubert e Fabiola B. Eckert), parceiros em todas as festas, bares, estudos e todo o resto que o ambiente universitário proporciona, que, sem dúvida, são muito importantes para todo o desenvolvimento como pessoa.

Aos professores da graduação que, certamente, foram grandes estimuladores da minha curiosidade sobre o fascinante mundo biológico e que, com isso, me catapultaram até onde estou hoje.

A todo o pessoal do laboratório (Ângela A. dos Santos, Eduardo Zanella, Eduardo S. Ribeiro, Cristina Rios e Bruna R. de Souza) que, junto comigo, vibrou com os bons resultados e afogou as mágoas com os experimentos que não queriam funcionar.

Ao CNPq, FAPESC, CAPES e demais financiadores por todo o suporte concedido ao laboratório e pela oportunidade de receber bolsa de estudos durante todo o período que estive no mesmo.

Muito obrigado a todos vocês e a todos os outros que foram esquecidos por essa cabeça tumultuada e confusa, vocês todos são muito especiais para mim.

“O sucesso não é final, o fracasso não é fatal: é a coragem de continuar que conta.”
(Winston S. Churchill)

RESUMO

O etanol de 2ª geração (2G) é uma alternativa energética que diminui os impactos ambientais gerados pela utilização dos combustíveis fósseis. A xilose é o segundo monossacarídeo em abundância na biomassa lignocelulósica, sendo assim, sua eficiente fermentação é necessária para que se estabeleça a produção industrial de etanol 2G. Entretanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é o organismo melhor adaptado para as condições industriais, não é capaz de utilizar essa pentose. Assim, é necessária a utilização de uma cepa recombinante que possua as proteínas necessárias para a metabolização de xilose. O primeiro passo na via de metabolização é a internalização do sacarídeo, feito por meio de transportadores. Vários organismos metabolizam xilose eficientemente e possivelmente apresentam genes que codificam transportadores dessa pentose. Um desses organismos é a levedura *Spathaspora arborariae*, isolada no Brasil em troncos em decomposição. Essa levedura teve seu genoma sequenciado, revelando possuir dez possíveis transportadores de sacarídeos. Desses, quatro foram previamente caracterizados, não apresentando atividade sobre xilose, restando seis transportadores que possivelmente possuam atividade sobre esse monossacarídeo. O objetivo deste trabalho foi clonar genes de *Sp. arborariae* preditos como transportadores de sacarídeos e expressá-los em *S. cerevisiae*, caracterizando a capacidade de crescimento e fermentação das linhagens obtidas em diferentes sacarídeos (maltose, glicose, xilose e sacarose). Para tal, dois dos seis genes que codificam transportadores sacarídeos de *Sp. arborariae* que ainda não haviam sido caracterizados foram amplificados a partir do genoma dessa levedura. Em seguida, ambos os genes foram inseridos em plasmídeos que promovem expressão constitutiva. Cada plasmídeo foi inserido em linhagem de *S. cerevisiae* hxt-*null* capaz de metabolizar xilose, permitindo a caracterização desses transportadores com base em experimentos de crescimento e fermentação, determinando o consumo de sacarídeos, produção de etanol e outros metabólitos. As linhagens contendo os genes *SaXUT1* e *tSaXUT1* também foram testadas quanto à suas capacidades de fermentação simultânea de sacarose e xilose. A linhagem contendo o gene *SaT10* apresentou capacidade de crescimento e fermentação tanto de glicose quanto de xilose, indicando que esse transportador é um transportador de glicose não seletivo. A linhagem contendo o gene *SaT8* foi capaz de fermentar glicose apesar de seu crescimento nessa fonte de carbono não ter sido observado. Com o intuito de simular condições de produção de

etanol 2G integrada à produção convencional de etanol (1G), foram testadas as capacidades de co-fermentação de xilose e sacarose pelas linhagens de *S. cerevisiae* desenvolvidas, além das linhagens contendo o gene *SaXUT1* e sua versão truncada (*tSaXUT1*). Os resultados mostraram que a capacidade fermentativa tanto de glicose quanto de xilose é prejudicada em ambas as linhagens na presença de frutose no meio, proveniente da hidrólise extracelular da sacarose. Portanto, a capacidade de internalização de xilose por *Sp. arborariae* deve ser reflexo da atividade de algum de seus outros transportadores de açúcares.

Palavras-chave: Etanol 2G; biotecnologia; fermentação; xilose; leveduras.

ABSTRACT

Second-generation (2G) ethanol is an alternative energy that reduces the environmental impacts generated by the use of fossil fuels. Xylose is the second most abundant sugar present in the lignocellulosic biomass, thus, an efficient fermentation is necessary to establish an industrial production of 2G ethanol. However, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which is the best suited organism for utilization on industrial conditions, is not capable of using this pentose. So, it is necessary to use a recombinant strain which possesses the proteins necessary for the metabolism of xylose. The first step in the metabolization pathway is the internalization of sugar, which is done by transporters. Several organisms efficiently metabolize xylose, and possibly have genes encoding transporters of this pentose. One of this organisms is the yeast *Spathaspora arborariae*, isolated in Brazilian rotting wood. This yeast had its genome sequenced, revealing to have ten possible sugar transporters. Of these transporters, four were previously characterized and had no activity on xylose, remaining six transporters that possibly possess activity on this pentose. The objective of this work was to clone *Sp. arborariae* genes that possibly encode sugar transporters and to express them in *S. cerevisiae*, characterizing the growth and fermentation capacity of the resulting strains in different sugars (maltose, glucose, xylose and sucrose). For this, two of the six *Sp. arborariae* genes that encode transporters that had not yet been characterized was amplified from the yeast genome. Then, both genes were inserted into constitutive expression plasmids. Each plasmid was inserted into *S. cerevisiae* hxt-null strains capable of metabolizing xylose, allowing the characterization of these transporters based on growth and fermentation experiments, determining the sugar consumption and ethanol and other metabolites production. The strains containing the genes SaXUT1 and tSaXUT1 were also tested for their simultaneous fermentation of sucrose and xylose. The strain containing the gene *SaT10* showed growth and fermentation capacity of both glucose and xylose, indicating that this transporter is a non-selective glucose transporter. The lineage containing the gene *SaT8* was able to ferment glucose although no growth in this carbon source was observed. In order to simulate 2G ethanol production conditions integrated with the conventional ethanol production process (1G), the *S. cerevisiae* strains developed besides the strains containing the *SaXUT1* gene and truncated version (*tSaXUT1*) were tested in co-fermentation of xylose and sucrose. The results showed that the fermentative capacity of both glucose and

xylose is impaired in both strains in the presence of fructose (from the extracellular hydrolysis of sucrose). Therefore, the internalization capacity of xylose of *Sp. arborariae* should be a reflection of the activity of some of its other sugar transporters.

Keywords: 2G Ethanol; biotechnology; fermentation; xylose; yeasts.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação das vias de utilização de xilose através da via (I): xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH); e (II): xilose isomerase (XI), produzindo xilulose, que é convertida a xilulose-5-P pela xilucinaase (XK), que entra na Via das Pentoses Fosfato (PPP)..... 27
- Figura 2** - Filograma de transportadores de sacarídeos oriundos de leveduras, mostrando as relações de similaridade entre as sequências de *Sp. arborariae* que provavelmente codificam transportadores de sacarídeos (nomes em vermelho), e sequências de outros genes que codificam conhecidos transportadores em outras leveduras (nomes em preto). As sequências de *Sp. arborariae* que foram analisadas anteriormente estão destacadas em preto, enquanto as que ainda não foram analisadas estão destacadas em vermelho. 32
- Figura 3** - Representação esquemática do plasmídeo p426-GPD (<https://www.addgene.org/>) utilizado para clonagem e expressão dos genes utilizados neste trabalho. Os genes utilizados para seleção em bactéria (*Amp^r*) e em levedura (*URA3*) estão indicados e representados em vermelho. A localização do promotor pGPD e do terminador tCYC estão indicadas e representadas em laranja. As localizações de ambos os sítios de restrição utilizados para clonagem (*XhoI* e *BamHI*) estão apontadas no plasmídeo. 40
- Figura 4** – Eletroforeses em géis de agarose das amplificações (por PCR) de cada uma das sequências que codificam preditos transportadores de sacarídeos de *Spathaspora arborariae*. (a) *Seq1*, (b) *Seq2*, (c) *Seq5*, (d) *Seq8*, (e) *Seq9* e (f) *Seq10*. Os tamanhos de banda previstos para amplificação de cada sequência (indicados na parte superior de cada gel) confirmam a amplificação de cada sequência. 48
- Figura 9** - Crescimento da linhagem controle ASY3-GPD em 20 g L⁻¹ de maltose. Nos gráficos são observadas as (a) densidades óticas (DOs) a 600 nm, (b) padrão de consumo de maltose (g L⁻¹), e (c) produção de etanol e glicerol (g L⁻¹). 55

Figura 10 - Crescimento da linhagem ASY3-SaT8 em 20 g L ⁻¹ de maltose. Nos gráficos são observadas as (a) densidades óticas (DOs) a 600 nm, (b) padrão de consumo de maltose (g L ⁻¹), e (c) produção de etanol e glicerol (g L ⁻¹). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados individuais de cada um estão expostos e diferenciados como A, B e C.	56
Figura 11 - Crescimento da linhagem ASY3-SaT10 em 20 g L ⁻¹ de maltose. Nos gráficos são observadas as (a) densidades óticas (DOs) a 600 nm, (b) padrão de consumo de maltose (g L ⁻¹), e (c) produção de etanol e glicerol (g L ⁻¹). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados individuais de cada um estão expostos e diferenciados como A, B e C.	57
Figura 12 - Crescimento da linhagem ASY3-SaT10 em 20 g L ⁻¹ de glicose. Nos gráficos são observadas as (a) densidades óticas (DOs) a 600 nm, (b) padrão de consumo de glicose (g L ⁻¹), e (c) produção de etanol e glicerol (g L ⁻¹). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados individuais de cada um estão expostos e diferenciados como A, B e C.	59
Figura 13 - Crescimento da linhagem ASY3-SaT10 em 20 g L ⁻¹ de xilose. Nos gráficos são observadas as (a) densidades óticas (DOs) a 600 nm, (b) padrão de consumo de xilose (g L ⁻¹), e (c) produção de etanol e glicerol (g L ⁻¹). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados individuais de cada um estão expostos e diferenciados como A, B e C.	60
Figura 14 - Fermentação em batelada contendo 10 g L ⁻¹ de células da linhagem ASY3-SaT8. Nos gráficos são observadas as concentrações de sacarídeos, etanol e glicerol (g L ⁻¹). As fermentações foram realizadas em meio SC contendo inicialmente 20 g L ⁻¹ de glicose (a), xilose (b) e glicose e xilose (c).	61
Figura 15 - Fermentação em batelada contendo 10 g L ⁻¹ de células da linhagem ASY3-SaT10. Nos gráficos são observadas as concentrações de sacarídeos, etanol e glicerol (g L ⁻¹). As fermentações foram realizadas em meio SC contendo inicialmente 20 g L ⁻¹ de glicose (a), xilose (b) e glicose e xilose (c).	62

Figura 17 - Fermentação em batelada contendo 10 g L^{-1} de células da linhagem ASY3-SaT10. As fermentações foram realizadas com meio SC contendo inicialmente 20 g L^{-1} de sacarose e xilose. No gráfico são observadas as concentrações de sacarídeos, etanol e glicerol (g L^{-1}).
..... 65

Figura 18 - Fermentação em batelada contendo 10 g L^{-1} de células da linhagem DLG-SaXUT1. As fermentações foram realizadas com meio SC contendo inicialmente 20 g L^{-1} de sacarose e xilose. No gráfico são observadas as concentrações de sacarídeos, etanol e glicerol (g L^{-1}).
..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de microrganismos utilizados no trabalho....	37
Tabela 2 - Iniciadores utilizados. Os nucleotídeos sublinhados nas sequências correspondem aos sítios de restrição de cada uma das enzimas utilizadas (também sublinhadas).	40
Tabela 3 - Velocidades de consumo dos sacarídeos e rendimento de etanol observados durante os crescimentos das linhagens ASY3-GPD, ASY3-SaT8 e ASY3-SaT10 em maltose, glicose e xilose. Os parâmetros foram calculados através das Equações 1 e 2, respectivamente.	58

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Velocidade de consumo de sacarídeo.....	28
Equação 2 – Fator de rendimento de etanol.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. METODOLOGIA	37
3.1 SELEÇÃO DOS GENES E ANÁLISES COMPUTACIONAIS	37
3.2 LINHAGENS E PLASMÍDEOS.....	37
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	39
3.4 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE <i>Sp. arborariae</i>	39
3.5 INSERÇÃO DOS GENES NOS PLASMÍDEOS	40
3.6 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO....	42
3.7 TRANSFORMAÇÕES DE LEVEDURAS	42
3.8 EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS	43
3.9 ANÁLISE DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE	43
3.10 CRESCIMENTOS E FERMENTAÇÕES	43
3.11 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE SACARÍDEOS E PRODUÇÃO DE ETANOL.....	44
3.12 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DOS CRESCIMENTOS E FERMENTAÇÕES	44
3.12.1 Velocidade de consumo de sacarídeos	44
3.12.2 Fator de rendimento de etanol	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.2 CLONAGEM DOS TRANSPORTADORES	47
4.3 ANÁLISES <i>in silico</i>	47
4.4 CRESCIMENTOS CELULARES.....	49
4.5 FERMENTAÇÕES	55
5. CONCLUSÕES.....	69
6. REFERÊNCIAS:.....	71

1. INTRODUÇÃO

Apesar de possuírem uma elevada eficiência energética, os combustíveis fósseis apresentam várias desvantagens. Dentre as elas, destacam-se (1) a característica de serem não-renováveis, (2) são nocivos ao ambiente (desde sua extração até sua utilização como fonte energética), e (3) sua extração/produção ser restrita a alguns poucos países, fazendo com que esses sejam os responsáveis pelo abastecimento de todo o globo. O pequeno número de países responsáveis pela maior parte da produção mundial de petróleo, em conjunto a questões político-diplomáticas levou à crise do petróleo da década de 1970, em que o preço por barril se elevou quatro vezes, provocando uma grave crise econômica (LOVINS & ARANOW 2005).

Dado o grande interesse econômico global e a dependência energética da nossa sociedade sobre o petróleo, o desenvolvimento de tecnologias que gerem alternativas ao uso de combustíveis fósseis é considerado uma necessidade estratégica da nação. Assim, durante a década de 1970, em virtude do programa PROALCOOL, os investimentos nacionais sobre o etanol combustível aumentaram significativamente. Esses investimentos foram focados na produção da cana-de-açúcar, produção industrial e desenvolvimento de uma frota automobilística movida (parcial ou completamente) a etanol (MICHELLON *et al.*, 2008). Tais investimentos e avanços fizeram com que o Brasil se tornasse um país destaque na produção e exportação desse combustível, sendo hoje o segundo maior produtor mundial de etanol, atingindo, em 2017, 27,7 bilhões de litros produzidos (BRASIL, 2018).

A larga escala de produção de etanol demanda uma grande área de plantio de cana-de-açúcar, que é a matéria-prima para a produção brasileira. Esse setor industrial gera uma quantidade imensa de resíduos de produção (palha e bagaço). Atualmente, a maior parte desses resíduos é queimada para a produção de energia elétrica nas próprias usinas produtoras (FERNANDES *et al.*, 2012; SOUZA, 2012).

Uma possível alternativa para mitigar ainda mais os problemas derivados do consumo de combustíveis fósseis é o chamado “etanol de segunda geração” (etanol 2G). Enquanto a produção atual (1G) utiliza apenas o caldo da cana-de-açúcar, o etanol 2G é produzido utilizando qualquer biomassa vegetal como matéria-prima, o que representa um destino economicamente mais rentável para resíduos agrícolas, como a biomassa residual da cana (PESSOA JR. *et al.*, 2005, MILANEZ *et al.*, 2012). Se utilizada de forma eficiente, a produção de etanol 2G pode

e elevar a produtividade industrial do etanol em cerca de 50% (STAMBUK *et al.*, 2008; SOCCOL *et al.*, 2010). Isso é possível graças à composição bioquímica dessa biomassa, que é formada principalmente por celulose e hemicelulose, que são polímeros constituídos por monossacarídeos, e lignina. Devido a sua composição, essa biomassa é chamada lignocelulósica (PEREIRA JR. *et al.*, 2008).

A lignina é um polímero heterogêneo de álcoois aromáticos (GUERRIERO *et al.*, 2015) e atualmente seu único destino é a queima para gerar calor e eletricidade necessários para a manutenção dos processos na própria indústria alcooleira. Porém, é possível produzir várias formas de hidrocarbonetos monoaromáticos que poderiam aumentar os lucros obtidos com a deslignificação da biomassa (FERNANDO *et al.*, 2006). A celulose é o maior componente dessa biomassa e é um polissacarídeo formado exclusivamente por monômeros de glicose, unidos por ligações $\beta(1-4)$. Este monossacarídeo, por sua vez, é de fácil utilização pela grande maioria dos organismos conhecidos (BÉGUIN & AUBERT, 1994; EBRINGEROVÁ & HEINZE, 2000; ARO *et al.*, 2005; SARKAR *et al.*, 2012).

A hemicelulose é o segundo maior componente dessa biomassa e é um polímero mais complexo e heterogêneo, contendo proporções diferentes de vários tipos de monossacarídeos, como xilose, arabinose, manose, glicose, galactose, ácido glicurônico e ácido galacturônico. Desses, a pentose xilose é o mais abundante (ARO *et al.*, 2005; POLIZELI *et al.*, 2005, JEFFRIES, 2006; 2010; SARKAR *et al.*, 2012). Assim sendo, este monossacarídeo é um dos maiores focos de estudo para a produção de etanol 2G (JEFFRIES, 2006; GÍRIO *et al.*, 2010).

A espécie de microrganismo majoritariamente utilizada para a produção de etanol na indústria é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ela é utilizada principalmente devido à grande robustez frente às condições fermentativas industriais, como o baixo pH, elevadas concentrações de etanol e ambiente hipertônico, além de ser uma ótima fermentadora, utilizando a via fermentativa mesmo na presença de oxigênio - levedura que sofre efeito *Crabtree* positivo (DEKEN, 1966). Além disso, esse microrganismo é muito conhecido e amplamente estudado, sendo utilizado pela humanidade há mais de nove mil anos (LANDRY *et al.*, 2006; MCGOVERN *et al.*, 2004; MÉRICO *et al.*, 2007). Porém, esta levedura não consegue metabolizar naturalmente a xilose, uma vez que não expressa as enzimas necessárias para sua metabolização. A metabolização (Figura 1) pode seguir a via de oxirredução, através da ação das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol

desidrogenase (XDH), ou então a via de isomerização, através da ação da enzima xilose isomerase (XI) (BATT *et al.*, 1986; PITKÄNEN *et al.*, 2003).

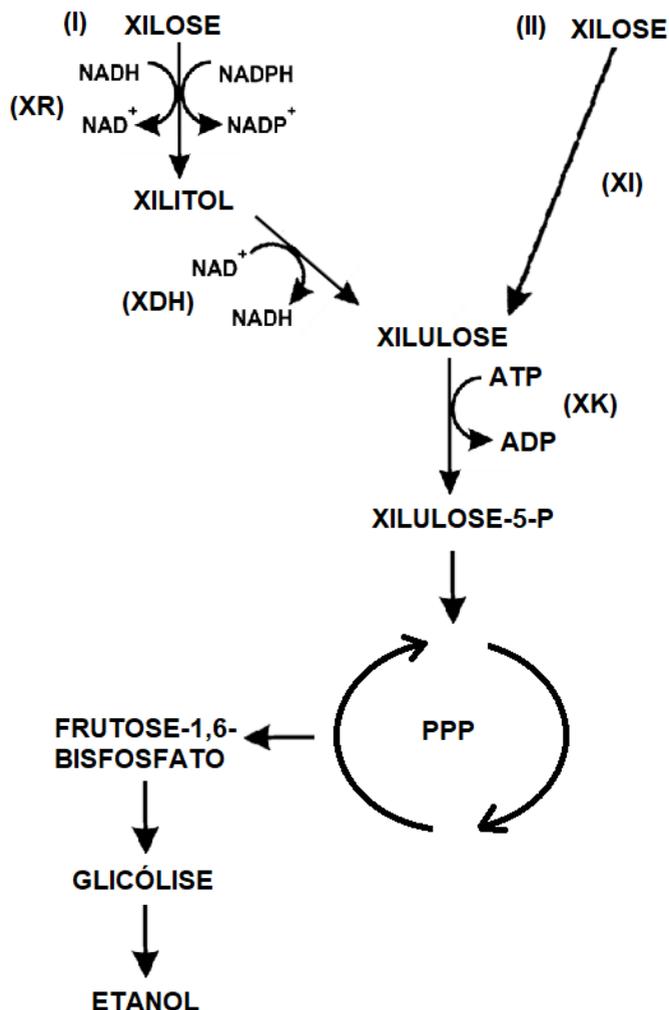


Figura 1 - Representação das vias de utilização de xilose através da via (I): xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH); e (II): xilose isomerase (XI), produzindo xilulose, que é convertida a xilulose-5-P pela xilulocinase (XK), que entra na Via das Pentoses Fosfato (PPP).

(Fonte: o autor)

A via de oxirredução é utilizada por diversas leveduras que expressam as enzimas XR e XDH (KÖTTER *et al.*, 1990; AMORE *et al.*, 1991; HO *et al.*, 1998; ELIASSON *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2010; PENG *et al.* 2012). Nessa via, a xilose é reduzida a xilitol (pela XR) utilizando preferencialmente NADPH à NADH como co-substrato. Em seguida, a XDH utiliza exclusivamente NAD⁺, regenerando NADH, para oxidar o xilitol a xilulose. Assim sendo, essa via leva a um acúmulo de xilitol e um desbalanço de cofatores (JEFFRIES *et al.* 2006). Em contrapartida, a via de isomerização é encontrada em bactérias e alguns fungos, e realiza a conversão de xilose a xilulose em uma única reação, mais simples e sem utilização de co-substratos (ZHOU *et al.*, 2012).

Diversos trabalhos desenvolveram linhagens de *S. cerevisiae* que expressam a via da XI, mais simples (WALFRIDSSON *et al.*, 1996; KUYPER *et al.*, 2003; BRAT *et al.*, 2009; DEMEKE *et al.*, 2013; KOBAYASHI, *et al.*, 2018). Porém, experimentos comparando ambas as vias sugerem que a expressão da via XR-XDH leva a um consumo de xilose mais rápido e uma maior taxa de produção de etanol (KARHUMAA *et al.*, 2007; MATSUSHIKA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2016a).

Na tentativa de melhorar a capacidade fermentativa de xilose por *S. cerevisiae*, tem-se realizado modificações genéticas específicas que alteram os níveis de expressão de certos genes ou então que introduzem novos genes no organismo alvo, metodologia essa chamada de engenharia metabólica (OSTERGAARD *et al.*, 2000). Neste sentido, as principais estratégias empregadas para este fim são (1) a expressão de genes heterólogos que codificam as enzimas XR e XDH, além da sobre expressão do gene endógeno que codifica a enzima xilulocinase (XK), essenciais para o metabolismo de xilose em uma etapa anterior à entrada na via das pentoses fosfato (PPP) (Figura 1), e (2) a sobre expressão de genes heterólogos e/ou endógenos que codificam transportadores de xilose. (KÖTTER *et al.*, 1990; ELIASSON *et al.*, 2000 e 2001; JEFFRIES & JIN, 2004; JEFFRIES, 2006).

Os transportadores de sacarídeos são proteínas pertencentes à super-família de transportadores *Major Facilitador Superfamily* (MFS) e possuem doze segmentos transmembranares (TMs) em α -hélice hidrofóbicos com extremidades N- e C-terminais voltadas ao citoplasma (HENDERSON, 1993; SAIER, 2000). Sabe-se que são nos TMs que se encontram os principais resíduos de aminoácidos responsáveis pelo

reconhecimento e transporte dos sacarídeos (IANCU *et al.*, 2013; YOUNG *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015). Apesar de sua grande importância metabólica e de bioprocessos, são poucos os dados tridimensionais disponíveis sobre transportadores, principalmente de eucariotos (KASAHARA & KASAHARA, 2003; KASAHARA *et al.*, 2004).

O transporte de sacarídeos ocorre de duas formas: (1) a favor do gradiente de concentração (difusão facilitada), ou (2) por meio de um transporte ativo, utilizando o co-transporte sacarídeo-próton (WEUSTHUIS *et al.*, 1994; HORÁK, 1997; STAMBUK *et al.*, 2008; REDDY *et al.*, 2012). Uma característica presente em membros da superfamília MFS, e essencial para que o co-transporte H⁺-sacarídeo ocorra, é a presença de resíduos de aminoácidos carregados negativamente (ácido aspártico ou ácido glutâmico) em algum dos domínios transmembrana do transportador. Esses resíduos serão responsáveis pela interação do transportador com o próton a ser internalizado, permitindo o co-transporte (IANCU *et al.*, 2013; WISEDCHAISRI *et al.*, 2014).

Além disso, o sistema de transporte via difusão facilitada é normalmente um sistema de baixa afinidade, com alto K_m e são expressos principalmente quando há abundância de sacarídeos. O sistema de co-transporte sacarídeo-próton geralmente é um sistema de alta afinidade (baixo K_m) que utiliza a força eletromotriz do gradiente de prótons entre o meio extracelular e o citoplasma para internalizar o sacarídeo, sendo expressos somente quando as células se encontram em ambientes com baixas concentrações de sacarídeos (DU PREEZ *et al.*, 1986; MCCLELLAN & BISSON, 1988; LEWIS & BISSON, 1991; KO *et al.*, 1993).

Diversos transportadores oriundos de *S. cerevisiae* e de outras leveduras selvagens foram caracterizados, sendo possível identificar regiões conservadas comuns aos transportadores de sacarídeos. A essas regiões conservadas se dá o nome de “motivos”. Alguns trabalhos mostram que esses motivos apresentam importante papel no transporte de sacarídeos (WEIERSTALL *et al.*, 1999; JOOST & THORENS, 2009; YOUNG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015). Um dos motivos mais bem estudados até o momento é o “motivo PESPR”, localizado logo após o 6^o TM e amplamente distribuído entre transportadores de sacarídeos da família SP (*Sugar Porter Family*), desde transportadores de glicose presentes em humanos, até transportadores de xilose presente em bactérias *E. coli* (SUN *et al.*, 2012). Dentre os transportadores que

possuem capacidade de transporte de xilose, um motivo que merece destaque é o chamado “motivo Young”, localizado no 1º TM (YOUNG *et al.*, 2014).

Com intenção de caracterizar o transporte de xilose por transportadores endógenos, em 2014, Gonçalves e colaboradores desenvolveram uma linhagem de *S. cerevisiae* deficiente nos principais transportadores de monossacarídeos (*HXT1-7* e *GAL2*), a chamada linhagem *hxt-null*, que possui expressão constitutiva da via XR-XDH de metabolização de xilose. Por ser incapaz de utilizar qualquer monossacarídeo e possuir uma via de metabolização de xilose, essa linhagem é uma plataforma ideal para estudos de transporte de xilose ou outros monossacarídeos. Diante disso, essa linhagem teve os transportadores *HXT1*, 2, 5 ou 7 sobre expressos e testados quanto às suas capacidades de transporte de glicose, xilose e glicose mais xilose, sendo constatado que nenhum dos transportadores apresenta eficiência de co-fermentação de glicose e xilose suficiente para produção de etanol 2G.

Apesar de *S. cerevisiae* não possuir transportadores específicos de xilose (LEE *et al.*, 2002; SUBTIL & BOLES, 2012, GONÇALVES *et al.*, 2014), são várias as espécies de fungos que utilizam a biomassa lignocelulósica como substrato para crescimento e nutrição. Sendo assim, muitos pesquisadores têm buscado nesses organismos genes que codificam transportadores de alta afinidade e eficiência por xilose, visando a expressão dos mesmos por *S. cerevisiae*. Até o momento, nenhum dos genes testados apresentou as características necessárias para uma eficiente utilização desta pentose (WEIERSTALL *et al.*, 1999; KATAHIRA *et al.*, 2008; LEANDRO *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2010; RUNQUIST *et al.*, 2010; YOUNG *et al.*, 2011; MOON *et al.*, 2013; SALES *et al.*, 2015; KRETZER, 2017; KNYCHALA, 2017).

Um clado que vem sendo muito explorado quanto à utilização de xilose é o do gênero *Spathaspora*, apresentando diversas espécies que possuem capacidade de consumo e fermentação dessa pentose. Apesar de apresentarem características fenotípicas semelhantes, como a utilização do códon CUG para codificar uma serina em vez de uma leucina durante a tradução (PAPON *et al.*, 2014), além da utilização de xilose, análises genômicas indicam que esse grupo não é monofilético (DANIEL *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2016; MORAIS *et al.*, 2017).

Dentre as espécies incluídas nesse grupo, destacam-se: *Sp. passalidarum*, *Candida. jeffriesii*, *Scheffersomyces stipitis*, *Sc. shehatae*, *Pachysolen tannophilus*, *Sp. arborariae*, *C. materiae*, *Sp. brasiliensis*, *Sp. roraimanensis*, *Sp. Suhii*, *Sp. xylofermentans* e *Sp. allomyrinae*, todas

caracterizadas como consumidoras de xilose (BARBOSA *et al.*, 2009; CADETE *et al.*, 2009; CADETE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016; CADETE & ROSA, 2017).

A elevada capacidade de utilização conjunta de glicose e xilose e elevados rendimentos a partir da fermentação desses monossacarídeos tem levado autores a propor que algumas leveduras do clado *Spathaspora* (como a *Sp. passalidarum*, por exemplo) possam ser boas candidatas à domesticação e produção de etanol 2G, muito embora as condições industriais sejam muito hostis a essas espécies (CADETE & ROSA, 2017).

Sendo assim, tem-se buscado genes dessas espécies que possibilitem a fermentação eficiente de xilose por linhagens modificadas de *S. cerevisiae* (uma vez que *S. cerevisiae* possui linhagens aptas às condições industriais). Para tal, é necessário que as espécies de onde os genes serão explorados tenham seu genoma sequenciado, como é o caso da espécie *Sp. arborariae* UFMG-HM19.1A^T (CADETE *et al.*, 2009; LOBO *et al.*, 2014), que foi isolada de troncos em decomposição presentes na mata atlântica e no cerrado brasileiro. Dentre outras características, *Sp. arborariae* possui reconhecida capacidade de produção de etanol por meio da fermentação de glicose e xilose, apresentando um rápido consumo de ambos os monossacarídeos (MOURO, 2012). Essa levedura também apresenta capacidade de fermentar hidrolisados lignocelulósicos de cana-de-açúcar, sendo parcialmente tolerante a inibidores (furfural e hidroximetilfurfural) formados durante o pré-tratamento da biomassa (NGUYEN *et al.*, 2006; CADETE *et al.*, 2009, 2012, 2013; CUNHA-PEREIRA *et al.*, 2011). Além disso, Mourou, em 2012, constatou que *Sp. arborariae* apresenta atividade de co-transporte H⁺-xilose de alta capacidade, o que possivelmente contribui para a performance fermentativa de xilose por essa espécie.

Com base nestas características interessantes para a produção do etanol 2G, o genoma dessa levedura foi analisado e constatou-se que dez sequências (Figura 2) no seu genoma apresentaram grande similaridade com genes que codificam conhecidos transportadores de sacarídeos (GONÇALVES, 2014).

As sequências representadas na Figura 2 como “seq3”, “seq7”, “seq4” e “seq6” foram clonadas e analisadas em trabalhos anteriores (SALES, 2015; KRETZER, 2017) e foram nomeados, respectivamente, como *SaHXT4*, *SaGET1*, *SaXUT1* e *SaSUT6*. Sales, em 2015, verificou que a proteína *SaGET1* é capaz de transportar glicose quando maltose está

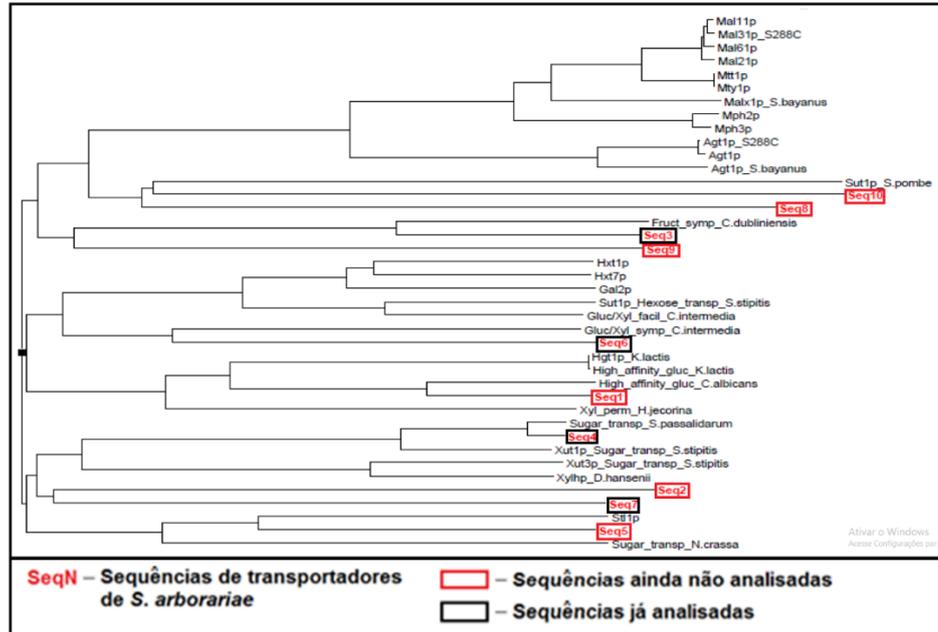


Figura 2 - Filograma de transportadores de sacarídeos oriundos de leveduras, mostrando as relações de similaridade entre as sequências de *Sp. arborariae* que provavelmente codificam transportadores de sacarídeos (nomes em vermelho), e sequências de outros genes que codificam conhecidos transportadores em outras leveduras (nomes em preto). As sequências de *Sp. arborariae* que foram analisadas anteriormente estão destacadas em preto, enquanto as que ainda não foram analisadas estão destacadas em vermelho.

(Modificado de GONÇALVES, 2014)

presente no meio, porém, não possui atividade sobre xilose. Além disso, foi verificado que o transportador *SaHXT4* não possui capacidade de transportar nenhuma das fontes de carbono testadas (dentre elas, glicose e xilose). Os genes *SaXUT1* e *SaSUT6* foram analisados por Kretzer, em 2017, tendo sido verificado que ambos os transportadores apresentaram atividade de transporte de glicose.

Apesar de possibilitar o transporte de glicose, o transportador *SaSUT6* possui um longo domínio C-terminal, o que o aproxima mais dos transceptores Snf3 e Rgt2 (KRETZER, 2017), que são proteínas integrais de membrana responsáveis pela regulação metabólica relacionada à concentração de glicose no meio, sendo o Snf3 um sensor de baixas concentrações e o Rgt2 um sensor de altas concentrações de glicose (OZCAN *et al.*, 1996; DLUGAI *et al.*, 2001). A linhagem que possuía o transportador *SaXUT1* não apresentou capacidade de consumo, crescimento ou fermentação de xilose (KRETZER, 2017).

A levedura *S. cerevisiae* possui maneiras de remover proteínas integrais de membrana que não estão sendo utilizadas. Quando as leveduras passam por escassez de substrato, transportadores de baixa afinidade são removidos da membrana, e o mesmo ocorre com transportadores de alta afinidade quando há excesso de substrato. (FINLEY *et al.*, 2012, O'DONNELL *et al.*, 2015; NIJLAND *et al.*, 2016).

Os resíduos de lisina que são ubiquitinados estão presentes nas regiões N- e/ou C-terminais dos transportadores (HORÁK, 2003). Essa internalização de transportadores atua diminuindo a quantidade dos transportadores presentes na membrana da levedura, diminuindo a internalização dos sacarídeos (LI *et al.*, 2016b; SEN *et al.*, 2016).

Como *S. cerevisiae* é incapaz de utilizar xilose, essa espécie não possui a capacidade de reconhecer a presença desse sacarídeo no meio (BATT *et al.*, 1986; PITKÄNEN *et al.*, 2003). Assim, possíveis transportadores heterólogos que possuem atividade sobre xilose podem ser ubiquitinados e endocitados (NIJLAND *et al.*, 2016).

Nesse sentido, em 2017, Knychala utilizou uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* contendo os genes para metabolização de xilose e expressando ou o transportador *SaXUT1* ou sua versão truncada, *tSaXUT1*, deficiente em resíduos de lisina nas porções N- e C-terminal citoplasmáticas. Nesse trabalho, a linhagem expressando o transportador inteiro não foi capaz de consumir xilose. A linhagem expressando o transportador modificado conseguiu consumir mais de 5 g L⁻¹ de xilose, produzindo aproximadamente 2 g L⁻¹ de etanol em condições fermentativas. Em condições de co-fermentação contendo 20 g L⁻¹ de

glicose e mais 20 g L^{-1} de xilose, ambas as linhagens consumiram rapidamente a glicose, porém apenas a linhagem expressando o transportador truncado foi capaz de consumir cerca de 5 g L^{-1} de xilose em 72 h de experimento, não sendo suficiente para sustentar uma produção industrial de etanol 2G.

Sendo assim, como atualmente nenhum dos transportadores de *Sp. arborariae* analisados anteriormente apresentaram um perfil eficiente para o transporte de xilose, é de grande interesse testar os demais genes de *Sp. arborariae* em *S. cerevisiae*, na tentativa de desenvolver uma linhagem de *S. cerevisiae* que tenha capacidade de consumir xilose de forma eficiente.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Visando otimizar a produção de etanol de segunda geração, o presente trabalho tem como objetivo clonar, expressar e caracterizar, em linhagem de *S. cerevisiae hxt-null* e recombinante para metabolização de xilose, transportadores de sacarídeos de *Spathaspora arborariae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir plasmídeos contendo genes que codificam transportadores de sacarídeos da levedura *Sp. arborariae* e expressá-los em *S. cerevisiae, hxt-null*, recombinante que expressa os genes de metabolização da xilose;
- Analisar o perfil de crescimento e fermentação de sacarídeos pelas leveduras *S. cerevisiae* recombinantes contendo os diferentes transportadores.

3. METODOLOGIA

3.1 SELEÇÃO DOS GENES E ANÁLISES COMPUTACIONAIS

Foi utilizada a ferramenta BLASTp, da NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para identificação dos genes da linhagem UFMG-HM19.1A^T de *Sp. arborariae* que foi isolada de madeira em decomposição e teve seu genoma sequenciado (CADETE *et al.*, 2009; LOBO *et al.*, 2014), apresentando dez genes com similaridade a transportadores de sacarídeos através da ferramenta BLAST da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Adicionalmente, foi utilizado o software ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para realizar o alinhamento das sequências, utilizando sequências no formato FASTA. O software MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/>), foi utilizado para fazer uma árvore filogenética, do tipo “máxima parcimônia”. Para tal, utilizou-se o alinhamento das sequências peptídicas codificadas pelos genes que apresentam similaridade com transportadores de sacarídeos, presentes no genoma de *Sp. arborariae*, em conjunto com genes presentes no banco de dados que possuem maior similaridade aos genes de *Sp. arborariae* e com alguns dos principais transportadores de sacarídeos previamente caracterizados.

Uma vez selecionados os genes, foram realizadas análises de bioinformática para alinhamento das sequências através do programa “PRALINE”, e identificação das doze regiões transmembranares através da variação “PRISPRED” e “HMMTOP”, disponível em <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/> (PIROVANO *et al.*, 2008; PIROVANO & HERINGA, 2010; SIMOSSIS & HERINGA 2005). Além disso, foi utilizado o programa “UbPred” (<http://www.ubpred.org/>) para identificação de resíduos de lisina das porções N- e C- terminais que podem sofrer ubiquitinação (RADIVOJAC *et al.*, 2010). Foi realizada também a verificação da presença de códons CTG em cada um dos genes com auxílio do programa “CLC Sequence Viewer”, da QUIAGEN (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/>).

3.2 LINHAGENS E PLASMÍDEOS

O presente estudo utilizou as linhagens de *S. cerevisiae*, *Sp. arborariae* e *Escherichia coli* que estão listadas na Tabela 1. A linhagem UFMG-HM19.1A^T, de *Sp. arborariae*, foi a linhagem de onde se extraiu o DNA genômico, utilizado para se amplificar os genes de interesse que codificam transportadores de sacarídeos (LOBO *et al.*, 2014).

Para se estudar transportadores de açúcares oriundos de leveduras que utilizam xilose como fonte de carbono, é necessário a

Tabela 1 - Linhagens de microrganismos utilizados no trabalho.

Linhagem	Genótipo	Referência
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
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-XKXDHR</i>	Gonçalves <i>et al.</i> (2014)
ASY3	Isogênica à DLG-K1, mas <i>pho13Δ::LoxP-Bler-LoxP</i>	Santos (2017)
DLG-SaXUT1	Isogênica à DLG-K1 + p426-GPD-SaXUT1	Knychala (2017)
DLG-tSaXUT1	Isogênica à DLG-K1 + p426-GPD-tSaXUT1	Knychala (2017)
ASY3-SaT8	Isogênica à ASY3 + p426-GPD-SaT8	Este trabalho
ASY3-SaT10	Isogênica à ASY3 + p426-GPD-SaT10	Este trabalho
<i>Spathaspora arborariae</i>		
UFMG-HM19.1A ^T	Linhagem selvagem	Lobo <i>et al.</i> (2014)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>F' endA1hsdR17 (rK-mK+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (NaIr) relA1Δ (lacZYA-argF) U169 deoR Φ80dlac Δ (LacZ) M15</i>	Meselson & Yuan (1968)

utilização de uma linhagem de *S. cerevisiae* que seja deficiente em transportadores endógenos que possuam atividade de transporte de xilose. Também é necessário que essa linhagem possua expressão das enzimas necessárias para o metabolismo inicial da xilose (ausente em *S. cerevisiae*) para que essa fonte de carbono consiga entrar na PPP e posteriormente na via glicolítica (Figura 1). Outra estratégia que vem sendo adotada para uma fermentação mais eficiente de xilose é a deleção do gene *PHO13*, que codifica para uma fosfatase alcalina envolvida na regulação da PPP (KIM *et al.*, 2015; BAMBÁ *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2016). Dessa forma, a linhagem de *S. cerevisiae* ASY-3, desenvolvida por Santos, em 2017, foi selecionada como plataforma para a caracterização dos transportadores. Essa linhagem apresenta deleção do gene *Pho13*, levando a uma melhora na utilização de xilose pois esse gene está envolvido na modulação das enzimas da PPP (KIM *et al.*, 2013 e 2015; NI *et al.*, 2007). Além disso, essa linhagem teve os principais genes que codificam transportadores de glicose e xilose (*HXT1-HXT7* e *GAL2*)

deletados. A ASY-3 também não possui capacidade de crescimento em meios sem uracila, pois não possui o gene *URA3*. Além disso, essa linhagem apresenta integrado em seu genoma o plasmídeo pAUR-XKXDHR, que lhe garante resistência ao antibiótico Aureobasidina A e ainda lhe permite sobre-expressar as enzimas responsáveis pela metabolização inicial da xilose: XR, XDH e XK.

As linhagens DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1 de *S. cerevisiae*, desenvolvidas por Knychala em 2017, foram testadas quanto às suas capacidades de co-fermentação por possuírem os genes *SaXUT1* e *tSaXUT1*, respectivamente. Essas linhagens são derivadas da cepa DLG-K1, que também possui integrado no seu genoma o plasmídeo pAUR-XKXDHR, também teve os transportadores HXT1-7 e GAL2 deletados e não possui capacidade de síntese endógena de uracila.

Para propagação dos plasmídeos, foi selecionado a linhagem DH5 α , de *E. coli*, que é não patogênica e propícia para ser utilizada em métodos de biologia molecular, apresentando o seguinte genótipo: F[']/*endA1hsdR17* (rK-mK+) *glnV44 thi-1 recA1 gyrA* (NaIr) *relA1* Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR* Φ 80*dlac* Δ (*LacZ*) M15 (MESELSON & YUAN, 1968).

Foi escolhido o plasmídeo p426-GPD (Figura 3) para clonagem em bactéria e expressão em levedura. Esse vetor possui um sítio múltiplo de clonagem localizado entre um promotor constitutivo forte, oriundo do gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD), e um terminador constitutivo oriundo do gene que codifica o citocromo C (CYC), responsáveis por garantir a sobre-expressão de cada um dos genes clonados. Além disso, esse plasmídeo possui o marcador auxotrófico *URA3* (para seleção das linhagens derivadas da ASY-3), além do gene para resistência à ampicilina (*Amp^r*), para seleção em bactérias.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico da linhagem UFMG-HM19.1A^T, de *Sp. arborariae*, foi realizada utilizando-se o kit da ZIMO RESEARCH (YeaStarTM Genomic DNA Kit), seguindo as instruções do fabricante. O DNA purificado foi armazenado a -20°C.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE *Sp. arborariae*

Os genes de *Sp. arborariae* foram amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se o DNA genômico da linhagem UFMG-HM19.1A^T e iniciadores sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT) (www.idtdna.com), que hibridizam

em banho-maria a 37°C por um período de 4 horas. Em seguida, os

Tabela 2 - Iniciadores utilizados. Os nucleotídeos sublinhados nas sequências correspondem aos sítios de restrição de cada uma das enzimas utilizadas (também sublinhadas).

Iniciador	Sequência	Enzima de restrição
Seq8_F	<u>GGATCC</u> ATCGATATGACCACTACACCCA AACAA	<u>BamHI</u>
Seq8_R	CTC <u>GAGAT</u> CGATCTAAAACTAGCTTTAC CTCGTG	<u>XhoI</u>
Seq10_F	<u>GGATCC</u> ATCGATATGACTTATGCAGCTAC AGTA	<u>BamHI</u>
Seq10_R	CTC <u>GAGAT</u> CGATCTACTCTTGAACAATTT CTAAATCG	<u>XhoI</u>
GPD.2_F	CGGCCGAAATCATTATCAATACTCGCCAT TTC	-
CYC.2_R	CGGCCGAAAGCAAATTAAGCCTTCGAG C	-
seq1_F	AA <u>AGGATCC</u> AAGCTTATGTCTTCTAAATT AGATCGTG	BamHI
seq1_R	AA <u>ACTCGAGA</u> AAGCTTTTAAACCTTGGTTT CAGAGT	XhoI
seq2_F2	G <u>TAGGATCC</u> ATGCCTCCACCTTATCAACA	BamHI
seq2_R2	ATT <u>CTCGAGT</u> TATGTTTCCACGTGACTAC TATAAC	XhoI
seq5_F2	G <u>TAGGATCC</u> ATGAAGAATTGGTTAACAG ATAGA	BamHI
seq5_R2	ATT <u>CTCGAGT</u> TAGACTTGTTCGAGGTTT	XhoI
seq9_F2	G <u>TACCCGGGAT</u> GAGTAAAATAATGGAAA GTTCTAGTG	XmaI
seq9_R2	AT <u>CTCGAGC</u> TATTTCTGTTCAACATGAG TAGTT	XhoI

plasmídeos p426-GPD (Figura 3) e os genes tratados com as enzimas de restrição foram incubados a 15°C na presença de T4 DNA ligase, para que os fragmentos fossem inseridos e ligados nos plasmídeos. Os plasmídeos

ligados foram transformados em *E. coli* DH5 α através do método de cloreto de cálcio e choque térmico (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

As enzimas de restrição utilizadas são da *New England Biolabs* (*NEB*). A T4 DNA ligase utilizada para construção dos plasmídeos contendo os genes *Sat8* e *Sat10* são da *NEB*, enquanto para os plasmídeos contendo os genes *Seq1*, 2, 5 e 9 foram utilizadas T4 DNA ligases da ProMega.

3.6 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O cultivo da linhagem *E. coli* DH5 α foi realizado em meio LB (Luria-Bertani), com adição de 100 mg L⁻¹ de Ampicilina quando necessário. O pH foi ajustado para 7,0, utilizando-se NaOH. Quando necessário o cultivo em meio sólido, se adicionou 15 g L⁻¹ de bacto-ágar no meio de cultura.

O cultivo da linhagem *S. cerevisiae* ASY-3 foi realizado em meio YPM (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de maltose). Quando necessário, foi adicionado 0,5 mg L⁻¹ de Aureobasidina A (Takara Bio, Kyoto, Japan) ao meio. O pH foi ajustado para 5,0, utilizando-se HCl.

O cultivo das linhagens transformantes de *S. cerevisiae* foi realizado em meio sintético (SC), com 6,7 g L⁻¹ de bases nitrogenadas de leveduras (sem aminoácidos); 1,92 g L⁻¹ de suplemento de aminoácidos e bases nitrogenadas (sem uracila); e 20 g L⁻¹ de cada um dos sacarídeos a serem analisados (maltose, glicose ou xilose). O pH foi ajustado para 5,0, utilizando-se HCl.

Quando necessário o crescimento de leveduras em meio sólido, foi adicionado 20 g L⁻¹ de bacto-ágar nos meios de cultivo. Todos os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave, a 120 °C, por 15 min. Tanto para meios líquidos quanto para meios sólidos, os crescimentos das bactérias foram realizados em estufas a 37 °C, enquanto o das leveduras foram a 28 °C. Quando em meio líquido, utilizou-se agitação de 160 rpm.

3.7 TRANSFORMAÇÕES DE LEVEDURAS

Para as transformações da linhagem ASY-3 foi utilizado o método de acetato de lítio (GIETZ & WOOD, 2006). A linhagem foi pré-crescida em tubo de ensaio contendo 3 mL de meio YPM e incubados sob agitação durante 16 h. Em seguida, 1 mL da solução foi utilizada como inóculo para 50 mL de meio YPM acondicionados em Erlenmeyer de 250 mL de volume total. A cultura foi encubada sob agitação até que as células atingissem aproximadamente 1,5 unidades de absorvância a 600 nm (fase

exponencial de crescimento). Em seguida, as células foram centrifugadas (3000 g, por 5 min), o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 1 mL de solução estéril de acetato de lítio 0,1 M. As células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 400 μ L de solução de acetato de lítio 0,1 M. Depois disso, 50 μ L da suspensão celular foram transferidos a um tubo estéril, no qual se adicionou 300 μ L de uma solução contendo acetato de lítio 0,1 M e 40% de polietileno glicol (PEG). Também foram acrescentado 5 μ L de DNA fita simples (ssDNA) e mais 30 μ L do plasmídeo de interesse. A solução foi incubada por 30 min a 28 °C e em seguida adicionados 40 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). As células foram levadas a banho-maria (42 °C) por 30 min, resfriadas em gelo e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de YPM e incubadas por 3 h. Por fim, a solução foi centrifugada, o sobrenadante foi mais uma vez descartado e as células ressuspensas em 200 μ L de água destilada estéril. Todo o volume foi plaqueado em placas contendo meio SC maltose 2%.

3.8 EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS

Para a extração dos plasmídeos de bactérias, foi realizado o método “miniprep” (GREEN & SAMBROOK, 2012), enquanto as extrações de plasmídeos de leveduras foram realizadas com o kit da *ZIMO RESEARCH* (Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II). O DNA purificado foi armazenado a -20 °C.

3.9 ANÁLISE DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Tanto os fragmentos de DNA gerados por PCR e digestão com enzimas de restrição quanto os plasmídeos extraídos das bactérias foram analisados de acordo com seu padrão de corrida em géis de agarose. Para tal, os géis foram preparados com 1 g de agarose em 100 mL de tampão TBE 0,5X (Sambrook & Russel, 2001), sendo adicionado 2,5 μ g/mL de brometo de etídeo para observação em luz UV.

3.10 CRESCIMENTOS E FERMENTAÇÕES

Anteriormente aos crescimentos, as células foram pré-crescidas em meio SC contendo 2% de maltose durante 36 h, até atingirem a fase exponencial. Então as leveduras do pré-cultivo foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio SC com fontes de carbono específicas (maltose, glicose ou xilose) e incubados como descrito no item 3.6. Esse ensaio foi realizado durante 240 h, com retirada de alíquotas em intervalos pré-estabelecidos para análise de densidade celular, consumo de sacarídeos e produção de etanol e outros metabólitos.

Para as fermentações as células foram pré-crescidas em meio SC contendo 2% de maltose durante 36 h, até atingirem a fase exponencial. Em seguida, as células foram centrifugadas e lavadas com água destilada estéril (resfriada a 4 °C). Na seqüência, as células foram ressuspensas em água destilada estéril de forma que sua concentração atingisse 20 g L⁻¹. Alíquotas de 10 mL dessa solução de células foram então inoculadas em frascos de 40 mL contendo 10 mL de meio SC contendo glicose ou xilose, ou então, em meios co-fermentativos, contendo xilose e glicose ou xilose e sacarose (2x concentrado em relação ao item 3.6). Dessa forma, as fermentações se deram sob condições de microaerobiose e com altas densidades celulares (10 g L⁻¹), simulando as condições industriais. As fermentações foram realizadas com duração de 120 h, com retirada de alíquotas em intervalos pré-estabelecidos para análise de densidade celular, consumo de sacarídeos e produção de etanol e outros metabólitos. A partir das amostras retiradas durante os crescimentos e fermentações, foram realizadas leituras das densidades celulares em espectrofotômetro Cary 60 UV-VIS (Agilent Technologies), utilizando comprimento de onda de 600 nm.

3.11 DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE SACARÍDEOS E PRODUÇÃO DE ETANOL

A partir das amostras retiradas durante os crescimentos e fermentações, as determinações de concentração de sacarídeos, etanol e outros metabólitos foram realizadas através do aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com coluna para ácidos orgânicos Aminex HPX-87H (Biorad), fase móvel com ácido sulfúrico 5 mM, fluxo de 0,6 mL/min durante 30 min, temperatura da coluna de 50°C e detecção por índice de refração (IR-2031 plus, Jasco) (GOUVEIA *et al.*, 2009).

3.12 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DOS CRESCIMENTOS E FERMENTAÇÕES

3.12.1 Velocidade de consumo de sacarídeos

As velocidades de consumo de sacarídeos foram calculadas através da razão de cada um dos sacarídeos consumidos em função do tempo necessário para o consumo dos mesmos. A velocidade de consumo é expressa em g L⁻¹ h⁻¹ e é calculada de acordo com a equação 1.

$$V = \frac{Açúcar\ inicial - Açúcar\ final}{Tempo} \quad \text{Equação (1)}$$

3.12.2 Fator de rendimento de etanol

O fator de rendimento é obtido através da razão entre a concentração de etanol produzido e a concentração de substrato consumido. O rendimento é expresso em gramas de etanol por gramas de substrato (g/g) e é calculado de acordo com a equação 2.

$$Y_{E/S} = \frac{\text{Etanol final} - \text{Etanol inicial}}{\text{Açúcar inicial} - \text{Açúcar final}} \quad \text{Equação (2)}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2 CLONAGEM DOS TRANSPORTADORES

Os seis genes selecionados foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *Sp. arborariae* (UFMG-HM19.1A^T) utilizando iniciadores específicos que anelam no início e no final de cada um dos genes (Tabela 2; Figura 4).

As sequências *Seq8* e *Seq10* foram selecionadas para posteriores análises e foram nomeadas *Spathaspora arborariae transporter 8 (SaT8)* e *Spathaspora arborariae transporter 10 (SaT10)*, respectivamente, por serem oriundos da espécie *Sp. arborariae*, realizarem transporte de sacarídeo(s) e terem sido inicialmente anotados com os números 8 e 10, respectivamente.

Para confirmação da correta inserção dos genes nos plasmídeos, foram realizadas reações de PCR utilizando iniciadores que hibridizam com o início e o final do gene e nas regiões promotora e terminadora do plasmídeo (Tabela 2 e Figura 5 e 6). A linhagem de levedura contendo o plasmídeo com o gene *SaT8* foi nomeada ASY3-SaT8 enquanto a linhagem contendo o gene *SaT10* foi nomeada ASY3-SaT10. Também foi desenvolvida uma linhagem contendo o plasmídeo p426-GPD original (sem inserção de nenhum gene), que foi utilizada como controle negativo (ASY3-GPD).

4.3 ANÁLISES *IN SILICO*

Foi construído um filograma de máxima parcimônia (Figura 7) utilizando a sequência proteica de todos os dez genes de *Sp. arborariae* que apresentam similaridade a transportadores de sacarídeos e dos principais transportadores de sacarídeos caracterizados.

O alinhamento das sequências está ilustrado na Figura 8. Nele é possível observar as doze regiões transmembranares dos transportadores, cada uma composta por uma sequência de resíduos de aminoácidos que formam uma α -hélice hidrofóbica, o que é considerado uma característica estrutural de transportadores de sacarídeos (REDDY *et al.*, 2012). Também é possível observar a localização dos resíduos de lisina que podem sofrer ubiquitinação (dois presentes na região N-terminal do transportador codificado pelo gene *SaT8*, e um único presente na região C-terminal do transportador codificado pelo gene *SaT10*).

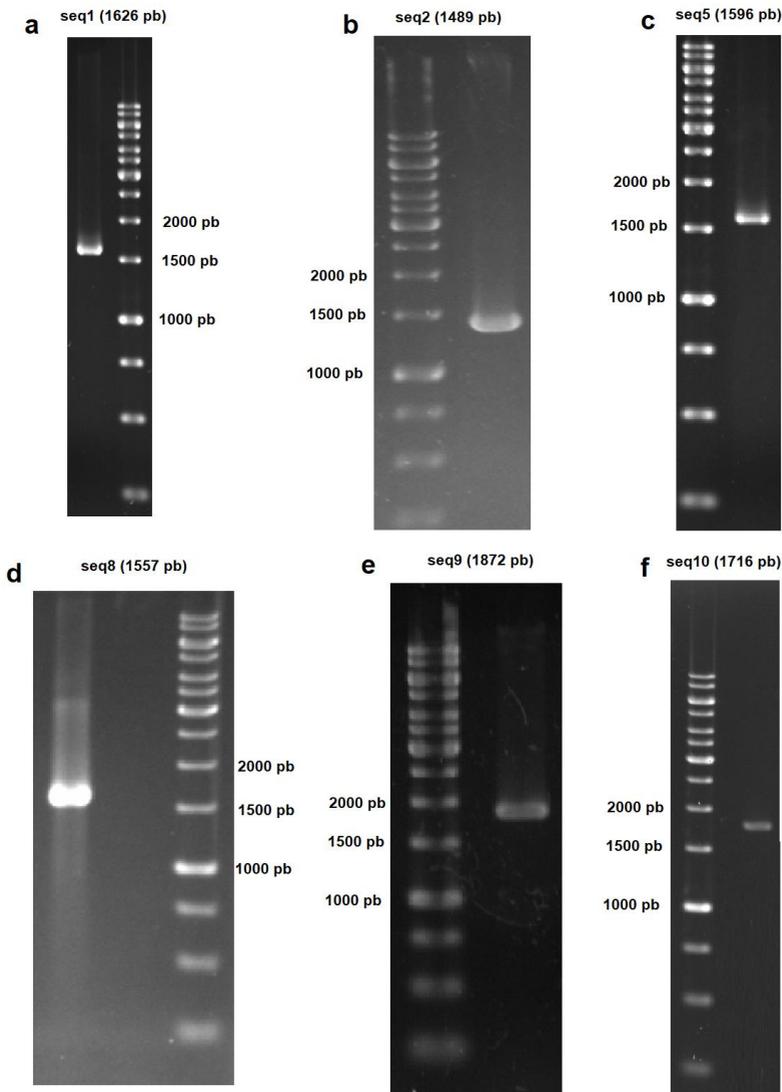


Figura 4 – Eletroforeses em géis de agarose das amplificações (por PCR) de cada uma das sequências que codificam preditos transportadores de sacarídeos de *Spathaspora arborariae*. (a) *Seq1*, (b) *Seq2*, (c) *Seq5*, (d) *Seq8*, (e) *Seq9* e (f) *Seq10*. Os tamanhos de banda previstos para amplificação de cada sequência (indicados na parte superior de cada gel) confirmam a amplificação de cada sequência.

(Fonte: o autor)

No alinhamento (Figura 8) também é possível observar a região onde normalmente está presente o motivo conservado PESPR. Porém, apesar de ambos os genes codificarem proteínas muito similares a transportadores pertencentes à família SP, o transportador codificado pelo gene *SaT10* não apresenta esse motivo. O transportador codificado pelo gene *SaT8* apresenta uma variação nesse motivo, tendo um resíduo de leucina (L) substituído o primeiro resíduo de prolina (P) da sequência.

Ambos os genes clonados estão destacados na Figura 7 e, apesar de apresentarem uma similaridade relativamente baixa com outros genes que codificam transportadores presentes no filograma, o gene *SaT8* apresentou uma maior relação com alguns genes que codificam os transportadores *AGT1* e *MAL21*, que transportam maltose em *S. cerevisiae* (CHOW *et al.*, 1989; HAN *et al.*, 1995). O gene *SaT10* apresentou uma maior relação com um gene que codifica um transportador de lactose (*LAC12*) de *Kluyveromyces lactis* (SREEKRISHNA & DICKSON, 1985) e com o *HXT2.6*, de *Sc. stipitis*, uma permease que transporta tanto glicose quanto xilose com baixa eficiência (SALES *et al.*, 2015). Como a levedura *Sp. arborariae* pertence ao clado CTG (PAPON *et al.*, 2014), foi verificado se algum dos genes possuía algum códon CTG. Foi identificado a presença de apenas um códon no meio do segundo segmento transmembrana do gene *SaT10*. O resíduo de leucina que será codificado por *S. cerevisiae* no lugar do resíduo de serina codificado por *Sp. arborariae* está destacado na Figura 8.

4.4 CRESCIMENTOS CELULARES

Após sua construção, as linhagens foram testadas quanto às suas capacidades de crescimento em maltose, glicose e xilose. Como esperado de acordo com o fenótipo da linhagem parental, as linhagens desenvolvidas mantiveram a capacidade de crescimento em maltose (Figura 9a, 10a e 11a). As linhagens contendo os transportadores clonados apresentaram melhor capacidade de crescimento em maltose, provavelmente em virtude do consumo mais rápido desse dissacarídeo quando comparado ao controle (Figura 9b, 10b e 11b; Tabela 3). Houve produção de etanol por todas as linhagens (Figura 9c, 10c e 11c), sendo que a linhagem ASY3-SaT8 teve uma produção de aproximadamente 6 g L⁻¹ (Figura 10c), enquanto a linhagem controle produziu cerca de 8 g L⁻¹ (Figura 9c), e a ASY3-SaT10 produziu cerca de 7 g L⁻¹ (Figura 11c). A linhagem controle apresentou o melhor rendimento de etanol (Tabela 3).

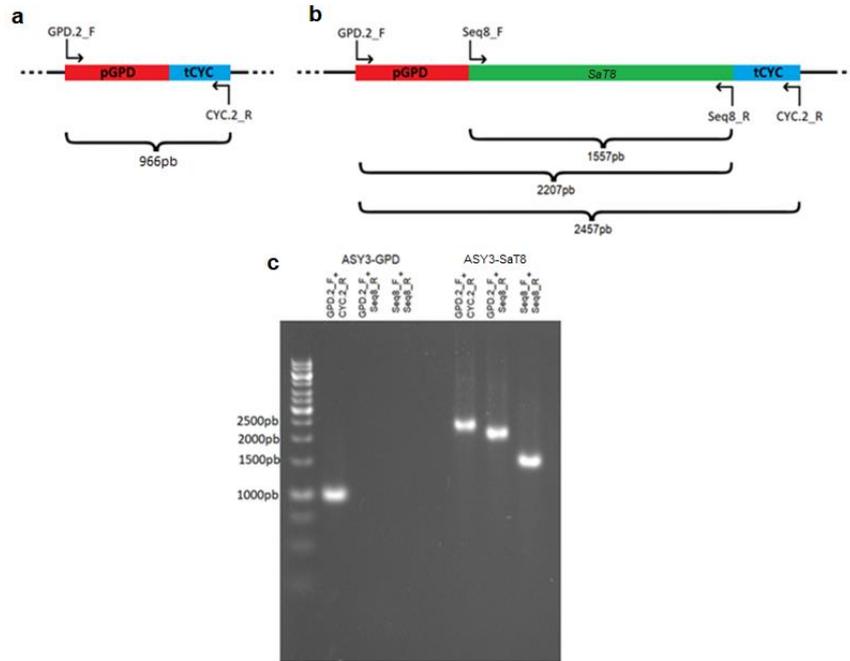


Figura 5 - Representação esquemática do posicionamento dos iniciadores e comprimento do fragmento de DNA amplificado por cada conjunto de iniciadores no plasmídeo sem o inserto (a) e com o gene *SaT8* (b). Em (c) eletroforese em gel de agarose representativa do produto de PCR com cada uma das combinações de iniciadores; nas três primeiras raias estão os produtos obtidos através do plasmídeo controle (GPD) e nas três últimas estão os produtos obtidos através do plasmídeo contendo o gene *SaT8*.

(Fonte: o autor)

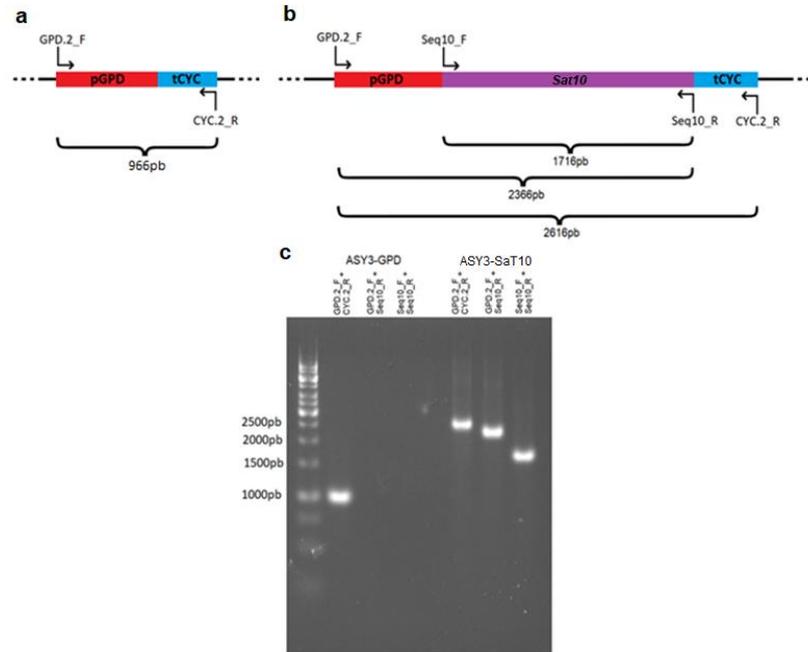


Figura 6 - Representação esquemática do posicionamento dos iniciadores e comprimento do fragmento de DNA amplificado por cada conjunto de iniciadores no plasmídeo sem o inserto (a) e com o gene *Sat10* (b). Em (c) eletroforese em gel de agarose representativa do produto de PCR com cada uma das combinações de iniciadores; nas três primeiras raias estão os produtos obtidos através do plasmídeo controle (GPD) e nas três últimas estão os produtos obtidos através do plasmídeo contendo o gene *Sat10*. (Fonte: o autor)

Todas as linhagens produziram glicerol durante o experimento em maltose, porém sua concentração não ultrapassou os $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 9c, 10c e 11c).

A linhagem ASY3-SaT10 foi a única que apresentou capacidade de crescimento em glicose (Figura 12), com uma extensa fase *lag* e produção de aproximadamente 4 g L^{-1} de etanol após decorridos mais de 160 h de experimento.

O longo período em que as células se mantêm em fase *lag* durante o crescimento em glicose indica que essas provavelmente não estavam aptas a crescer sob as condições do meio (ROBINSON *et al.*, 2001; MCKELLAR *et al.*, 2002) apesar de todos os inóculos terem sido realizados com as células em fase exponencial de crescimento.

Diversos fatores influenciam para o comprimento da fase adaptativa de crescimento: estado fisiológico das células no momento do inóculo, quantidade de células que foram inoculadas, temperatura do meio de cultivo, entre outros (MACKEY & DERRICK, 1984; ALBERTSON *et al.*, 1990; BRÉAND *et al.*, 1999).

Apenas a linhagem ASY3-SaT10 apresentou capacidade de crescimento em xilose (Figura 13a). A produção de etanol durante o crescimento da linhagem ASY3-SaT10 foi de $0,22 \text{ g L}^{-1}$, em média (Figura 13c), sendo que o consumo de xilose foi de aproximadamente $1,3 \text{ g L}^{-1}$. Os resultados de crescimento indicam que apenas o gene *SaT10* codifica uma proteína com capacidade de transporte de monossacarídeos. Esse transportador teria característica de ser mais eficiente para glicose, porém não seletivo, tendo ação também sobre xilose. Essas mesmas características foram observadas em diversos outros transportadores (WAHLBOM *et al.*, 2003; SEDIK & HO, 2004; LEANDRO *et al.*, 2006 e 2008; KATAHIRA *et al.*, 2008; RUNQUIST *et al.*, 2010; KRETZER, 2017), o que indica que as características necessárias para que um transportador internalize glicose permitem também o transporte de xilose (SHIN *et al.*, 2017).

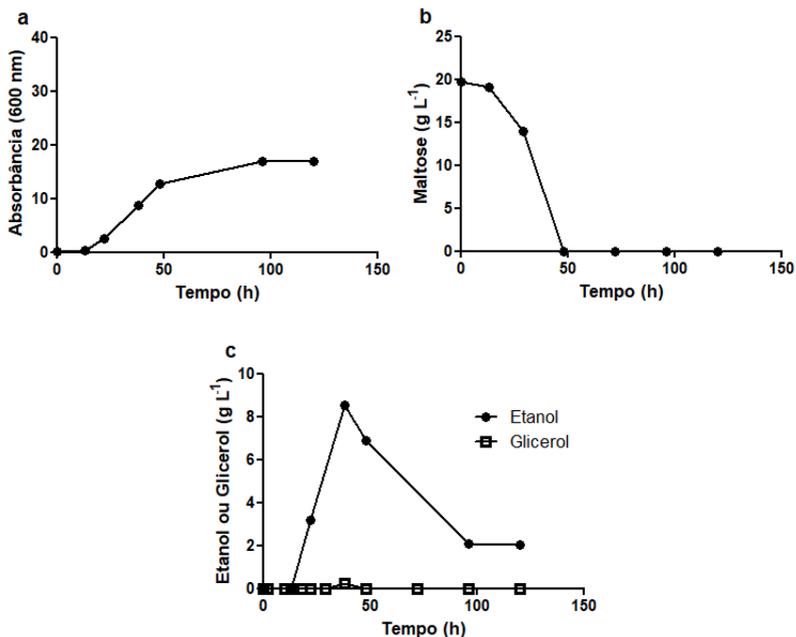


Figura 5 - Crescimento da linhagem controle ASY3-GPD em 20 g L⁻¹ de maltose. Nos gráficos são observadas as (a) densidades óticas (DOs) a 600 nm, (b) padrão de consumo de maltose (g L⁻¹), e (c) produção de etanol e glicerol (g L⁻¹).

(Fonte: o autor)

4.5 FERMENTAÇÕES

Uma vez realizados os crescimentos e tendo sido constatada a capacidade de crescimento celular lento da linhagem ASY3-SaT10 em meios contendo tanto glicose quanto xilose, foram realizadas fermentações em batelada contendo glicose, xilose e glicose e xilose como fontes de carbono com as linhagens ASY3-SaT8 (Figura 14) e ASY3-SaT10 (Figura 15). Todas as fermentações foram realizadas com altas densidades celulares (10 g L⁻¹) e microaerobiose.

Durante as fermentações em batelada utilizando a linhagem ASY3-SaT8 em qualquer um dos meios que continham glicose, foi observado o consumo parcial desse monossacarídeo

(Figura 14a e 14c). Esse resultado é interessante pois essa mesma linhagem não apresenta capacidade de crescimento nessa fonte de carbono. Apesar desse fenótipo ser incomum dentre linhagens de *S. cerevisiae*, a capacidade de consumir e fermentar um sacarídeo, porém não crescer no mesmo foi reportado anteriormente (DE SOUZA, 2017). Apesar de conseguir consumir glicose, o consumo se dá apenas nas primeiras horas da fermentação e é incompleto, com aproximadamente 14 g L⁻¹ de glicose presentes no final do experimento (Figura 14).

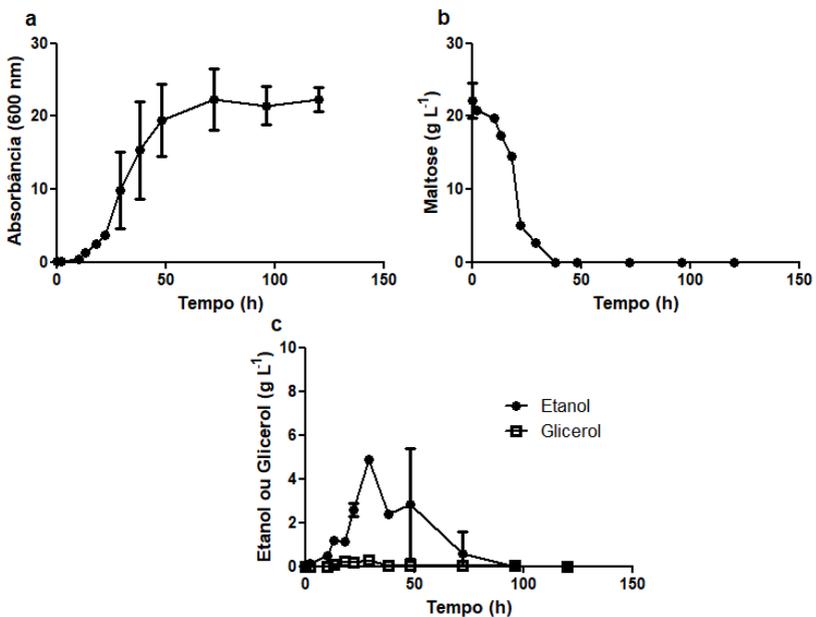


Figura 6 - Crescimento da linhagem ASY3-SaT8 em 20 g L⁻¹ de maltose. Nos gráficos são observadas as (a) densidades óticas (DOs) a 600 nm, (b) padrão de consumo de maltose (g L⁻¹), e (c) produção de etanol e glicerol (g L⁻¹). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados individuais de cada um estão expostos e diferenciados como A, B e C. (Fonte: o autor)

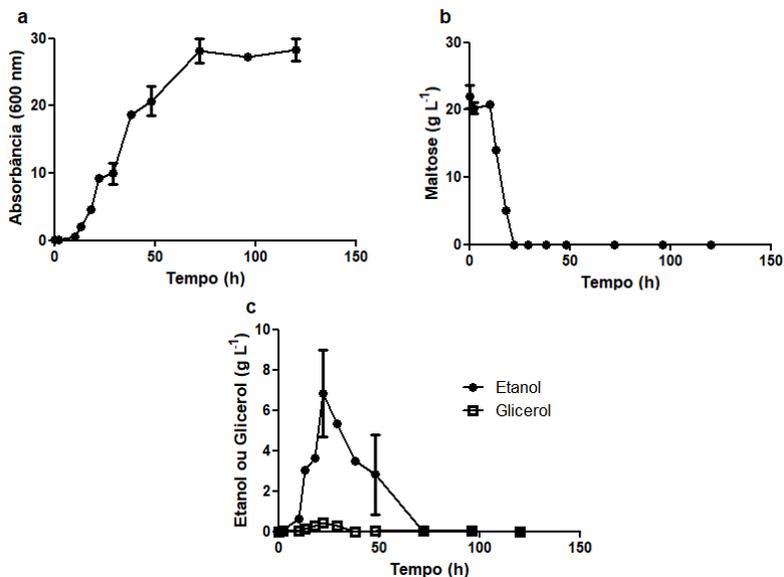


Figura 7 - Crescimento da linhagem ASY3-SaT10 em 20 g L⁻¹ de maltose. Nos gráficos são observadas as (a) densidades óticas (DOs) a 600 nm, (b) padrão de consumo de maltose (g L⁻¹), e (c) produção de etanol e glicerol (g L⁻¹). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados individuais de cada um estão expostos e diferenciados como A, B e C. (Fonte: o autor)

A incapacidade de crescimento e baixa eficiência de fermentação de glicose permanece inexplicada, porém, uma possível causa para esse fenômeno pode ser a retirada dos transportadores da membrana plasmática de forma precoce, através do processo de endocitose mediada por ubiquitinação que ocorre em uma ampla quantidade de transportadores (HORÁK, 2003). A ubiquitinação ocorre em alguns resíduos de lisina específicos que estão presentes nas porções citoplasmáticas dos transportadores (HORÁK, 2003, FINLEY *et al.*, 2012; SEN *et al.*, 2016;). Para que ocorra a ubiquitinação e posteriormente a endocitose, a célula realiza uma

Tabela 3 - Velocidades de consumo dos sacarídeos e rendimento de etanol observados durante os crescimentos das linhagens ASY3-GPD, ASY3-SaT8 e ASY3-SaT10 em maltose, glicose e xilose. Os parâmetros foram calculados através das Equações 1 e 2, respectivamente.

Parâmetro	Maltose			Glicose			Xilose		
	ASY3-GPD	ASY3-SaT8	ASY3-SaT10	ASY3-GPD	ASY3-SaT8	ASY3-SaT10	ASY3-GPD	ASY3-SaT8	ASY3-SaT10
Velocidade de consumo de sacarídeo (g L⁻¹ h⁻¹)	0,41	0,58	0,99	-	-	0,10	-	-	0,01
Rendimento de etanol (g/g)	0,43	0,22	0,31	-	-	0,19	-	-	0,01

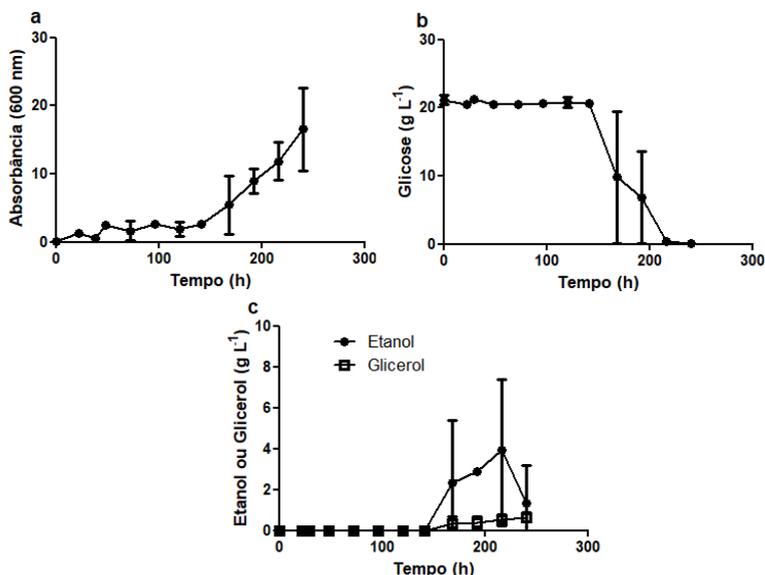


Figura 8 - Crescimento da linhagem ASY3-SaT10 em 20 g L⁻¹ de glicose. Nos gráficos são observadas as (a) densidades óticas (DOs) a 600 nm, (b) padrão de consumo de glicose (g L⁻¹), e (c) produção de etanol e glicerol (g L⁻¹). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados individuais de cada um estão expostos e diferenciados como A, B e C. (Fonte: o autor)

complexa cadeia de sinalização, em que não apenas a ubiquitinação, mas também a fosforilação do transportador são importantes (GADURA *et al.*, 2006; FINLEY *et al.*, 2012). Em condições naturais, a ubiquitinação seguida de endocitose ocorre como forma de reciclar os transportadores expressos pelas células, principalmente quando esses não são mais necessários (FINLEY *et al.*, 2012).

Como os clados a que pertencem as espécies *S. cerevisiae* e *Sp. arborariae* são evolutivamente distantes um do outro

(PAPON *et al.*, 2014), é possível que as duas espécies tenham formas diferentes de regulação e manutenção de suas proteínas de membrana, de forma que um transportador oriundo de *Sp. arborariae* seja funcional e esteja exercendo corretamente sua função de transporte em *S. cerevisiae*, porém, mesmo assim seja removido da membrana, o que explicaria a interrupção no consumo de glicose durante as fermentações.

As fermentações em batelada de glicose e xilose utilizando a linhagem ASY3-SaT10 (Figura 15) revelaram que essa linhagem apresenta capacidade de consumo quase total de glicose em todos os meios testados que possuem essa fonte de

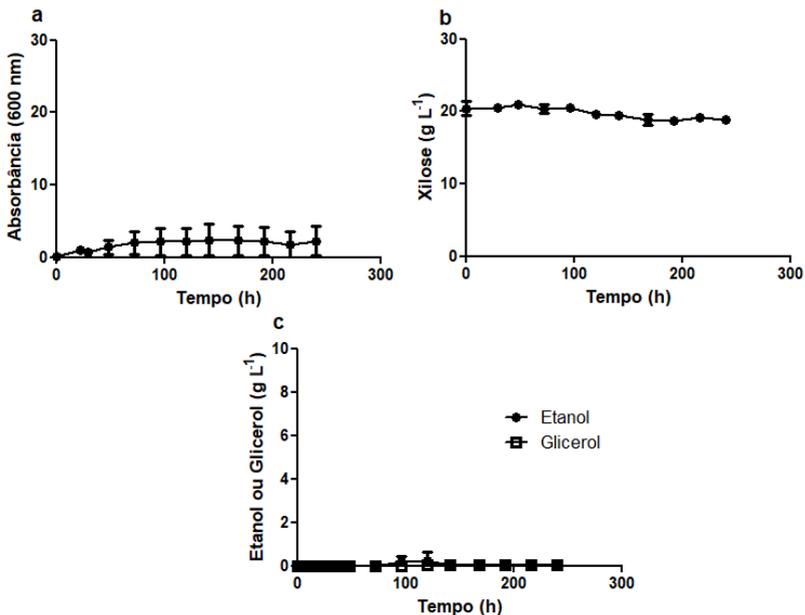


Figura 9 - Crescimento da linhagem ASY3-SaT10 em 20 g L⁻¹ de xilose. Nos gráficos são observadas as (a) densidades óticas (DOs) a 600 nm, (b) padrão de consumo de xilose (g L⁻¹), e (c) produção de etanol e glicerol (g L⁻¹). O experimento foi realizado em triplicata e os resultados individuais de cada um estão expostos e diferenciados como A, B e C. (Fonte: o autor)

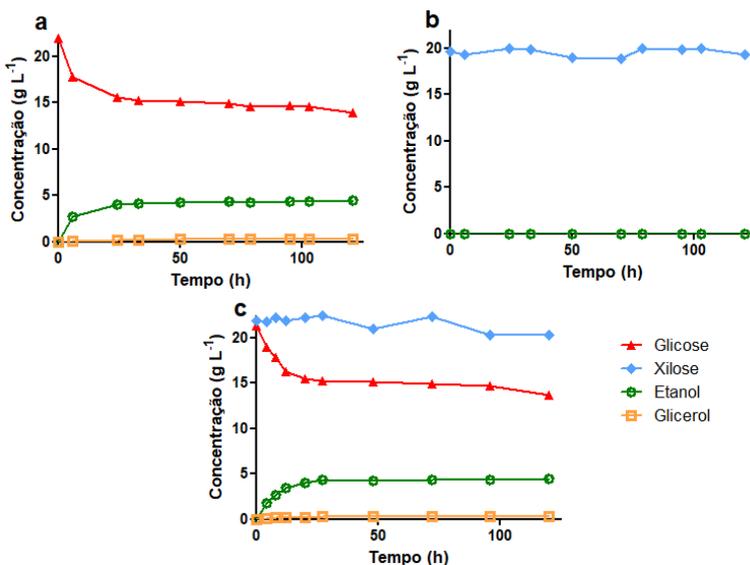


Figura 104 - Fermentação em batelada contendo 10 g L⁻¹ de células da linhagem ASY3-SaT8. Nos gráficos são observadas as concentrações de sacarídeos, etanol e glicerol (g L⁻¹). As fermentações foram realizadas em meio SC contendo inicialmente 20 g L⁻¹ de glicose (a), xilose (b) e glicose e xilose (c).
(Fonte: o autor)

carbono. A capacidade de consumo de glicose por essa linhagem foi muito superior à apresentada pela linhagem ASY3-SaT8 (Figura 14). As fermentações confirmaram a capacidade da linhagem ASY3-SaT10 fermentar xilose (Figura 15b), sendo observado o consumo de aproximadamente 3 g L⁻¹ de xilose e produção de aproximadamente 0,8 g L⁻¹ de etanol.

Um ponto interessante observado no trabalho foi que o transportador *SaT10* não apresenta o motivo PESPR (Figura 8) e nem o motivo Yung (SUN *et al.*, 2012; YOUNG *et al.*, 2014), comuns a transportadores de xilose, porém, mesmo assim apresenta capacidade de transporte tanto de glicose quanto de xilose.

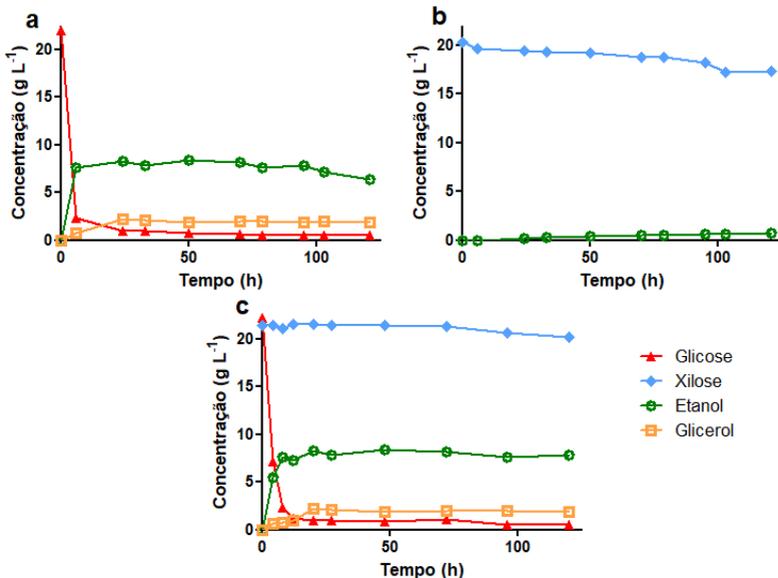


Figura 115 - Fermentação em batelada contendo 10 g L⁻¹ de células da linhagem ASY3-SaT10. Nos gráficos são observadas as concentrações de sacarídeos, etanol e glicerol (g L⁻¹). As fermentações foram realizadas em meio SC contendo inicialmente 20 g L⁻¹ de glicose (a), xilose (b) e glicose e xilose (c).

(Fonte: o autor)

Os resultados obtidos pela co-fermentação de glicose e xilose indicam que o consumo de xilose pela linhagem contendo o gene *SaT10* é afetado pela presença de glicose (Figura 15c). Quando existe glicose no meio, mesmo que de forma residual (menos de 1 g L⁻¹), o consumo de xilose é cerca de três vezes inferior do que quando xilose é o único monossacarídeo presente no meio. Esses resultados estão de acordo com a afirmação de que ocorre inibição competitiva no transporte de xilose quando há glicose no meio, como diversos trabalhos demonstram (HAMACHER *et al.*, 2002; SALOHEIMO *et al.*, 2006; HECTOR *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2010; RUNQUIST *et al.*, 2010; SUBTIL & BOLES, 2011).

A baixa eficiência de consumo e fermentação de xilose apresentada pela linhagem ASY3-SaT10 também pode ser explicada por uma possível ubiquitinação dos transportadores, seguida de sua conseqüente endocitose (HORÁK, 2003). Apesar de todo conhecimento sobre a regulação metabólica envolvendo glicose, ainda falta muito a ser elucidado sobre os mecanismos de regulação envolvendo xilose (SATO *et al.*, 2016). Como *S. cerevisiae* não utiliza xilose de forma natural, a espécie não possui capacidade de detecção do consumo dessa pentose, removendo assim eventuais transportadores de sua membrana, mesmo esses sendo funcionais (NIJLAND *et al.*, 2016).

Alguns trabalhos (ROY *et al.*, 2014; NIJLAND *et al.*, 2016) mostram que a remoção de alguns resíduos de lisina específicos do domínio N-terminal dos transportadores *HXT1*, *HXT5* e *HXT36* (fusão entre transportador *HXT3* e *HXT6*) aumentam a permanência dos mesmos na membrana plasmática, permitindo uma maior eficiência no consumo de xilose pelas cepas expressando esses transportadores modificados. Tendo em vista que o transportador codificado pelo gene *SaT8* possui dois resíduos de lisina passíveis de ubiquitinação presentes em seu domínio N-terminal, e o transportador codificado pelo gene *SaT10* possui um em seu domínio C-terminal (Figura 8), é possível que ambos os transportadores permitam um maior crescimento celular e produção de etanol do que o observado nos ensaios, porém estão sendo removidos da membrana plasmática de forma precoce, comprometendo a utilização desse sacarídeo.

Uma alternativa metodológica para forçar a permanência dos transportadores na membrana plasmática pode ser a truncagem dos genes nas regiões que codificam os domínios N- ou C-terminais dos transportadores, excluindo os resíduos de lisina que podem ser ubiquitinados, de forma semelhante ao realizado por Knychala em 2017, que removeu parte do domínio C-terminal do transportador *SpXUT1*, de *Sp. passalidarum*, e parte dos domínios N- e C-terminal do transportador *SaXUT1*, de *Sp. arborariae*, deixando ambos os transportadores sem resíduos de lisina que estivessem sujeitos à ubiquitinação. Após a truncagem dos genes que codificam ambos os transportadores, as linhagens contendo as

versões truncadas apresentaram uma melhoria no consumo e na produção de etanol a partir de xilose quando comparadas com as linhagens portando os transportadores inteiros.

Paralelamente às fermentações apresentadas anteriormente, foram realizadas co-fermentações com 20 g L⁻¹ de sacarose e de xilose, com intuito de simular condições de produção industrial de etanol 2G em que as pentoses presentes no hidrolisado lignocelulósico são fermentadas em conjunto com sacarose proveniente do caldo da cana. Estudos apontam que a produção de etanol utilizando a fermentação convencional de caldo de cana (1G) em conjunto com a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos (2G) é a estratégia mais rentável para produção de etanol na atualidade (DIAS *et al.*, 2009; MACRELLI *et al.*, 2012; JOELSSON *et al.*, 2016; RAJENDRAN *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2018). Para esses ensaios, além da utilização das linhagens ASY3-SaT8 e ASY3-SaT10, foram utilizadas as linhagens DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1.

Durante a co-fermentação de sacarose com xilose pela linhagem ASY3-SaT8 (Figura 16), toda a sacarose é degradada durante as primeiras horas de experimento, porém a concentração de frutose permanece constante a partir desse momento, indicando que o transportador *SaT8* possui capacidade de transporte de glicose, mas é incapaz de transportar xilose ou frutose nessas condições. Esses dados suportam o que foi observado durante a co-fermentação de glicose e xilose pela mesma linhagem, em que há consumo parcial de glicose, mas não de outra fonte de carbono.

A co-fermentação de sacarose com xilose realizada com a linhagem ASY3-SaT10 (Figura 17) mostra que, da mesma forma que a linhagem expressando o transportador *SaT8*, toda a sacarose é degradada nas primeiras horas de experimento, indicando presença de enzimas invertase no meio extracelular.

De forma parecida ao ocorrido durante a co-fermentação de glicose com xilose (Figura 15c), praticamente toda glicose é consumida nas primeiras horas de experimento, reafirmando a capacidade de transporte dessa hexose pelo transportador *SaT10*.

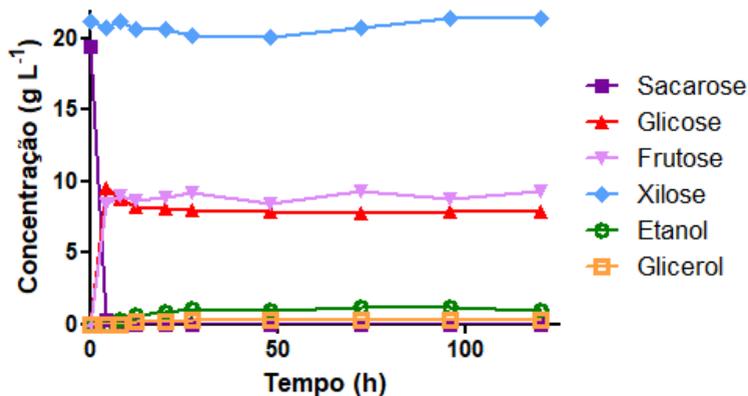


Figura 16 - Fermentação em batelada contendo 10 g L^{-1} de células da linhagem ASY3-SaT8. As fermentações foram realizadas com meio SC contendo inicialmente 20 g L^{-1} de sacarose e xilose. No gráfico são observadas as concentrações de sacarídeos, etanol e glicerol (g L^{-1}). (Fonte: o autor)

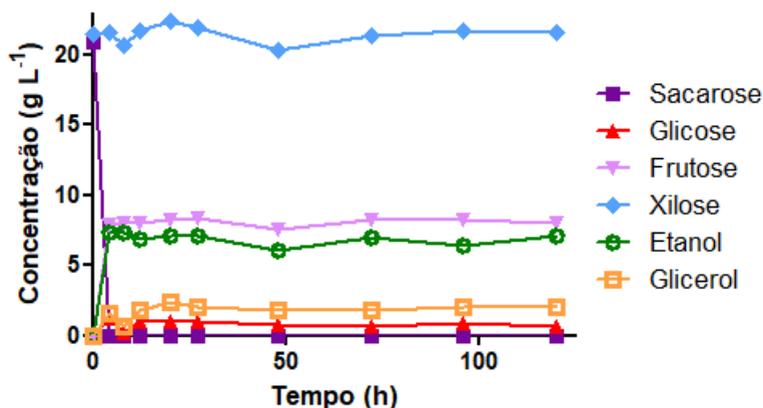


Figura 127 - Fermentação em batelada contendo 10 g L^{-1} de células da linhagem ASY3-SaT10. As fermentações foram realizadas com meio SC contendo inicialmente 20 g L^{-1} de sacarose e xilose. No gráfico são observadas as concentrações de sacarídeos, etanol e glicerol (g L^{-1}). (Fonte: o autor)

Como observado na Figura 17, a co-fermentação com sacarose inibe o consumo de xilose durante o período decorrido do experimento. É possível que essa inibição esteja ocorrendo pela presença de frutose no meio. Quando comparados aos experimentos realizados por Knychala, em 2017, nota-se que os desempenhos de consumo e fermentação de glicose durante a co-fermentação de sacarose e xilose pelas linhagens DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1 são prejudicados em ambas as linhagens (Figuras 18 e 19).

A linhagem DLG-SaXUT1 (Figura 18) consome apenas cerca de 2 g L⁻¹ de glicose, produzindo 1 g L⁻¹ de etanol. O perfil de consumo de glicose da linhagem contendo o transportador truncado (DLG-tSaXUT1) (Figura 19) é muito melhor, consumindo cerca de 75% da glicose nas primeiras horas de experimento, atingindo uma concentração de 5 g L⁻¹ de etanol.

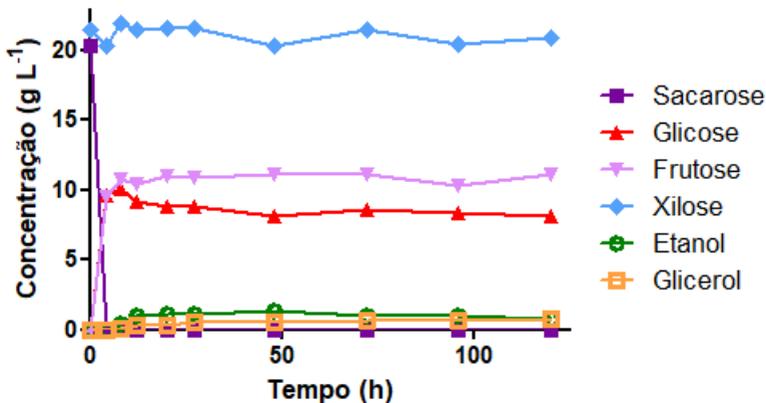


Figura 138 - Fermentação em batelada contendo 10 g L⁻¹ de células da linhagem DLG-SaXUT1. As fermentações foram realizadas com meio SC contendo inicialmente 20 g L⁻¹ de sacarose e xilose. No gráfico são observadas as concentrações de sacarídeos, etanol e glicerol (g L⁻¹). (Fonte: o autor)

A única diferença entre os dois transportadores (*SaXUT1* e *tSaXUT1*) é a ausência de parte dos domínios citoplasmáticos das extremidades dos mesmos. Em 2017, Knychala realizou fermentações de glicose e xilose utilizando as mesmas linhagens, sob as mesmas condições utilizadas no presente trabalho, assim, a principal diferença entre os experimentos é a presença de frutose no meio fermentativo. Portanto, supõe-se que moléculas de frutose devam interagir com a estrutura tridimensional do transportador *SaXUT1*, dificultando o transporte de glicose. Esse fenômeno provavelmente é evitado quando o transportador é truncado.

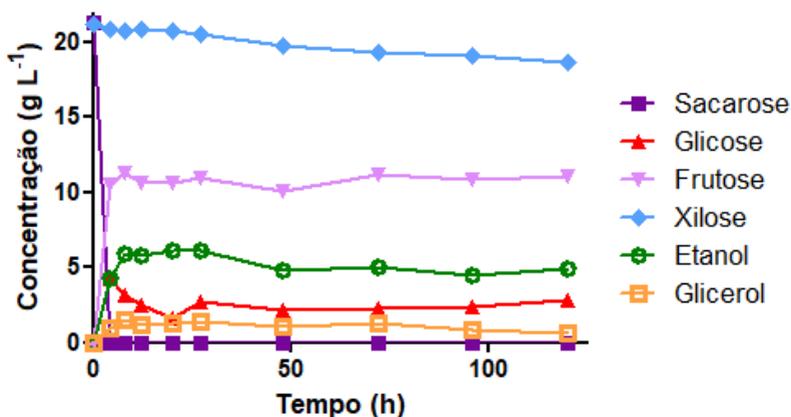


Figura 19 - Fermentação em batelada contendo 10 g L⁻¹ de células da linhagem DLG-tSaXUT1. As fermentações foram realizadas com meio SC contendo inicialmente 20 g L⁻¹ de sacarose e xilose. No gráfico são observadas as concentrações de sacarídeos, etanol e glicerol (g L⁻¹). (Fonte: o autor)

Outra alternativa para explicar a piora no consumo de glicose por parte da linhagem DLG-SaXUT1 é a possível indução de endocitose do transportador pela presença de frutose no meio. Durante todas as fermentações, de todas as linhagens, as densidades celulares se mantiveram constantes independente das fontes de carbono.

5. CONCLUSÕES

- A linhagem contendo o transportador *SaT8* não possui capacidade de crescimento em glicose, mas é apta a fermentar essa fonte de carbono.

- A linhagem ASY3-*SaT10* possui capacidade de crescimento e fermentação em xilose, apesar de ser muito mais eficiente quando crescendo e fermentando glicose.

- Algum dos outros quatro preditos transportadores de sacarídeos de *Sp. arborariae* possivelmente possui capacidade de transportar xilose com maior eficiência.

- Uma alternativa possível para melhorar a produção de etanol a partir de xilose utilizando o gene *SaT10*, seria utilizar a metodologia de truncagem gênica empregada por Knychala, em 2017, e remover parte do gene *SaT10* que codifica a parte final do domínio C-terminal do transportador, de forma que a proteína codificada não possua resíduos de lisina que possam sofrer ubiquitinação, forçando sua permanência na membrana plasmática de *S. cerevisiae*. A mesma metodologia pode ser empregada ao gene *SaT8* para investigar a súbita interrupção no consumo de glicose durante a fermentação.

- A co-fermentação de sacarose com xilose prejudica o consumo de xilose e de glicose tanto pela linhagem contendo o transportador *SaXUT1* quanto sua forma truncada (*tSaXUT1*). Mais experimentos são necessários para elucidar o motivo do prejuízo fermentativo.

6. REFERÊNCIAS:

ALBERTSON, N. H.; NYSTROM, T.; KJELLEBERG, S. Macromolecular synthesis during recovery of the marine *Vibrio* sp. S4 from starvation. **Microbiology**, v. 136, p. 2201–2207, 1990.

AMORE, R.; KÖTTER, P.; KÜSTER, C.; CIRIACY, M.; HOLLENBERG, C. P. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the NAD(P)H-dependent xylose reductase-encoding gene (XYL1) from the xylose-assimilating yeast *Pichia stipitis*. **Gene**, v. 109, n. 1, p.89-97, 1991.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p.719-739, 2005.

BAMBA, T.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Disruption of *PHO13* improves ethanol production via the xylose isomerase pathway. **AMB Express**. v.6, p.4, 2016.

BARBOSA, A. C.; CADETE, R. M.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. *Candida materiae* sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood in the Atlantic Rain Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 8, p.2104-2106, 2009.

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

BÉGUIN, P & AUBERT, J. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p.25-58, 1994.

BRASIL. MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. (Org.). **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis**: ano 2017. Rio de Janeiro: Ministério de Minas e Energia, 65 p. 2018.

BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 8, p.2304-2311, 2009.

BRÉAND, S.; FARDEL, G.; FLANDROIS, J. P., ROSSO, L.; & TOMASSONE, R. A model describing the relationship between 128 regrowth lag time and mild temperature increase for *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 251-261, 1999.

CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D. L.; STAMBUK, B. U.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 8, p.1338-1342, 2009.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; DUSÁN, K.J.; RODRIGUES, R. C. L. B.; SILVA, S. S.; ZILI, 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, n. 8, e43135, 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.; ROSA, C. A. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel d-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 2, p.421-431, 2013.

CADETE, R. M. & ROSA, C. A. The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. **Yeast**, v. 35, n. 2, p.191-199, 2017.

CHEN, S.; XU, Z.; LI, X.; JU, J.; CAI, M.; JIN, M. Integrated bioethanol production from mixtures of corn and corn stover. **Bioresource Technology**, v. 258, p.18-25, 2018.

CHOW, T. H. C.; SOLLITTI, P.; MARMUR, J. Structure of the multigene family of MAL loci in *Saccharomyces*. **MGG - Molecular & General Genetics**, v. 217, n. 1, p.60-69, 1989.

CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L. R.; SEHNEN, 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, n. 5, p.4218-4225, 2011.

DANIEL, H.; LACHANCE, M.; KURTZMAN, C. P. On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p.67-84, 2014.

DE SOUZA, B. R. **Análise da Tolerância aos Ácidos Carboxílicos por Leveduras Potencialmente Utilizadas na Produção de Etanol de Segunda Geração**. Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

DEKEN, R. H. de. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. **Journal of General Microbiology**, v. 44, n. 2, p.149-156, 1966.

DEMEKE, M. M.; DIETZ, H.; LI, Y.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R., MUTTURI, S., DEPREZ, S., ABT, T. D., BONINI, B. M., LIDEN, G., DUMORTIER, F., VERPLAETSE, A., BOLES, E., THEVELEIN, J. M. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic

and evolutionary engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p.89-113, 2013.

DIAS, M. O. S.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A.; FILHO, R. M.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL, M. R. W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, n. 9, p.1206-1216, 2009.

DLUGAI, S.; HIPPLER, S.; WIECZORKE, R.; BOLES, E. Glucose-dependent and -independent signalling functions of the yeast glucose sensor Snf3. **FEBS Letters**, v. 505, n. 3, p.389-392, 2001.

DU, J.; LI, S.; ZHAO, H. Discovery and characterization of novel d-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 11, 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, n. 6, p. 360-364 1986.

ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, C. F.; HAHNHÄGERDAL, B. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p.3381-3386, 2000.

ELIASSON, A.; HOFMEYR, J. S.; PEDLERA, S.; HAHNHÄGERDAL, B. The xylose reductase/xylylitol dehydrogenase/xylylulokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 4-5, p.288-297, 2001.

EBRINGEROVÁ, A. & HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p.542-556, 2000.

FERNANDES, D. L. A.; PEREIRA, S. R.; SERAFIM, L. S.; EVTUGUIN, D. V.; XAVIER, A. M. R. B. Second Generation Bioethanol from Lignocellulosics: Processing of Hardwood Sulphite Spent Liquor. **IntechOpen**, p.123-152, 2012.

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S.; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 4, p.1727-1737, 2006.

FINLEY, D.; ULRICH, H. D.; SOMMER, T.; KAISER, P. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 19, n.12, p. 319-360, 2012.

GADURA, N.; ROBINSON, L. C.; & MICHELS, C. A. *Glc7-Reg1* phosphatase signals to *Yck1, 2* casein kinase 1 to regulate transport activity and glucose-induced inactivation of *Saccharomyces* maltose permease. **Genetics**, v. 172, n. (3), p. 1427-1439, 2006.

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-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4775-4800, 2010.

GONÇALVES, D. L.; MATSUSHIKA, A.; BELISA, 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.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T. do; SOUTO-MAIOR, A. M. Validação de Metodologia para a Caracterização Química de Bagaço de Cana-de-Açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p.1500-1503, 2009.

GREEN, M. R. & SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. Cap. 1. p. 11-28. 2012.

GUERRIERO, G.; HUSMAN, J.; STRAUS, J.; ERTAN, H.; SIDDIQUI, K. S. Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 1, p.1-16, 2015.

HAMACHER, T.; BECKER, J.; GARDONYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BOLES, E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v. 148, n. 9, p.2783-2788, 2002.

HAN, E. K.; COTTY, F.; SOTTAS, C.; JIANG, H.; MICHELS, C. A. Characterization of *AGT1* encoding a general alpha-glucoside transporter from *Saccharomyces*. **Molecular Microbiology**, v. 17, n. 6, p.1093-1107, 1995.

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

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

HO, N. W. Y., CHEN, Z., BRAINARD, A. P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p.1852–1859, 1998.

HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1331, n. 1, p.41-79, 1997.

HORÁK, J. The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v. 1614, n. 2, p.139-155, 2003.

IANCU, C. V.; ZAMOON, J.; WOO, S. B.; ALESHIN, A.; CHOE, J. Crystal structure of a glucose/H⁺ symporter and its mechanism of action. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 44, p.17862-17867, 2013.

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

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

JOELSSON, E.; ERDEI, B.; GALBE, M.; WALLBERG, O. Techno-economic evaluation of integrated first- and second-generation ethanol production from grain and straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p.1-16, 2016.

JOOST, H. & THORENS, B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. **Molecular Membrane Biology**, v. 18, n. 4, p.247-256, 2009.

KARHUMAA, K.; GARCIA SANCHEZ, R.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Comparison of the xylose reductase-xylytol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by *recombinant Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, p.5-15, 2007.

KASAHARA T. & KASAHARA M. Transmembrane segments 1, 5, 7 and 8 are required for high-affinity glucose transport by *Saccharomyces cerevisiae Hxt2* transporter. **Biochemical Journal**, v. 372, p. 247-252, 2003.

KASAHARA T.; ISHIGURO M.; KASAHARA M. Comprehensive chimeric analysis of amino acid residues critical for high affinity glucose transport by Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 30274-30278, 2004.

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, n. 2, p.115-119, 2008.

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, n. (2), p. 57048, 2013.

KIM, S. R.; XU, H.; LESMANA, A.; KUZMANOVIC, U.; AU, M.; FLORENCIA, C.; 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, n. (5), p. 1601-1609, 2015.

KNYCHALA, M. M. **TRANSPORTE E FERMENTAÇÃO DE XILOSE, CELOBIOSE E XILOBIOSE POR LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae* RECOMBINANTES**. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

KO, C. H.; LIANG, H.; GABER, R. F. Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 1, p.638-648, 1993.

KOBAYASHI, Y.; SAHARA, T.; OHGIYA, S.; KAMAGATA, Y.; FUJIMORI, K. E. Systematic optimization of gene expression of pentose phosphate pathway enhances ethanol production from a glucose/xylose mixed medium in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p.1-11, 2018.

KÖTTER, P.; AMORE, R.; HOLLENBERG, C. P.; CIRIACY, M. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, *XYL2*, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. **Current Genetics**, v. 18, n. 6, p.493-500, 1990.

KRETZER, L. G. **Clonagem, Expressão e Análise de Transportadores de Açúcares em Linhagens Recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae***. Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

KUYPER, M.; HARHANGI, H.; STAVE, A.; WINKLER, A.; JETTEN, M.; DELAAT, W.; DENRIDDER, J.; OPDENCAMP, H.; VANDIJKEN, J.; PRONK, J. 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, n. 1, p.69-78, 2003.

LANDRY, C. R.; TOWNSEND, J. P.; HARTL, D. L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 3, p.575-591, 2006.

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

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

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*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p.186-191, 2002.

LEWIS, D. A. & BISSON, L. F. The HXT1 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is a new member of the family of hexose transporters. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 7, p.3804-3813, 1991.

LI, X.; PARK, A.; ESTRELA, R.; KIM, S-R.; JIN, Y-S.; CATE, J. H. D. Comparison of xylose fermentation by two high-performance engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Reports**, v. 9, p.53-56, 2016a.

LI, H.; SCHMITZ, O.; ALPER, H. S. Enabling glucose/xylose co-transport in yeast through the directed evolution of a sugar transporter. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 23, p.10215-10223, 2016b.

LOBO, F. P.; GONÇALVES, D. L.; ALVES-JR, S. L.; GERBER, A. L.; DE VASCONCELOS, A. T. R.; 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, n. 1, p.1-13, 2014.

LOPES, M. R.; MORAIS, C. G.; KOMINEK, J.; CADETE, R. M.; SOARES, M. A.; UETANABARO, A. P. T.; FONSECA, C.; LACHANCE, M.; HITTINGER, C. T.; ROSA, C. A. Genomic analysis and D-xylose fermentation of three novel *Spathaspora* species: *Spathaspora girioi* sp. nov., *Spathaspora hagerdaliae* f. a., sp. nov. and *Spathaspora gorwiae* f. a., sp. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 4, p.1-12, 2016.

LOVINS, A. B.; DATTA, E. K.; BUSTNESS, O. -E.; KOOMEY, J. G.; GLASGOW, N. J. **Winning the Oil Endgame (The Energy Reader)**. Snowmass, Colorado, Usa: Rocky Mountain Institute. Cap. 18. p. 282-286 2005

LOVINS, A. B. Winning the Oil Endgame. In: LOVINS, A. B.; DATTA, E. K.; BUSTNESS, O. E.; KOOMEY, J.G.; GLASGOW, N.J. **The Energy Reader**. Snowmass, Colorado, USA: Rocky Mountain Institute. Cap. 18. p. 282-286. 2005.

MACKAY, B. M. & DERRICK, C. M. Conductance measurements of the lag phase of injured *Salmonella typhimurium*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 57, p. 299–308, 1984.

MACRELLI, S.; MOGENSEN, J.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p.5-22, 2012.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, 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, n. 11, p.3818-3822, 2009.

MCCLELLAN, C. J. & BISSON, L. F. Glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* grown under anaerobic conditions: effect of null mutations in the hexokinase and glucokinase structural genes. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. (11), p. 5396-5400, 1988.

MCGOVERN, P. E.; ZHANG, J. Z.; TANG, J. G.; ZHANG, Z.; Hall, G. R.; MOREAU, R. A; NUÑEZ, A.; BUTRYM, E. D.; RICHARDS, M. P.; WANG, C-S.; CHENG, G.; ZHAO, Z.; WANG, C. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 51, p.17593-17598, 2004.

MCKELLAR, R. C.; LU, X.; KNIGHT, K. P. Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology** v. 73, n. (2), p. 127 – 135, 2002.

MÉRICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS Journal**, v. 274, n. 4, p.976-989, 2007.

MESELSON, M. & YUAN, R. DNA Restriction Enzyme from *E. coli*. **Nature**, v. 217, n. 5134, p.1110-1114, 1968.

MICHELLON, E.; SANTOS, A. A. L.; RODRIGUES, J. R. A. Breve Descrição do Proálcool e Perspectivas Futuras para o Etanol Produzido no Brasil. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, n. 46, Rio Branco. 2008.

MILANEZ, A. Y.; NYKO, D.; GARCIA, J. L. F.; REIS, B. L. S. O déficit de produção de etanol no Brasil entre 2012 e 2015: determinantes, consequências e sugestões de política. **Bndes Setorial**, n. 35, 25 p. 2012.

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, n. 3, p.247-254, 2013.

MORAIS, C. G.; BATISTA, T. M.; KOMINEK, J.; BORELLI, B. M.; FURTADO, C.; MOREIRA, R. G.; FRANCO, G. R.; ROSA, L. H.; FONSECA, C.; HITTINGER, C. T.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. *Spathaspora boniae* sp. nov., a D-xylose-fermenting species in the *Candida albicans/Lodderomyces* clade. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 10, p.3798-3805, 2017.

MOURO, A. **Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira**. Dissertação (Mestrado) Curso de Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

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

NI, H.; LAPLAZA, J. M.; & JEFFRIES, T. W. Transposon mutagenesis to improve the growth of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on Dxylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. (7), p. 2061-2066, 2007.

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, n. 1, p.158-168, 2016.

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

OZCAN, S.; DOVER, J.; ROSENWALD, A. G.; WÖLFL, S.; JOHNSTON, M. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 22, p.12428-12432, 1996.

PAPON, N.; COURDAVALT, V.; CLASTRE, M. Biotechnological potential of the fungal CTG clade species in the synthetic biology era. **Trends in Biotechnology**. v. 32, p.167-168, 2014.

PENG, B.; SHEN, Y.; LI, X.; CHEN, X.; HOU, J.; BAO, X. Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 1, p.9-18, 2012.

PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G.; ANNA, L. M. M. S. Series on biotechnology: BIOMASS OF LIGNOCELLULOSIC COMPOSITION FOR FUEL ETHANOL PRODUCTION WITHIN THE CONTEXT OF BIOREFINERY. Rio de Janeiro, **Amigadigital press**, 47 p. 2008.

PESSOA JR, A.; ROBERTO, I. C.; MENOSSI, M.; SANTOS, R. R.; FILHO, S.O.; PENNA, T. C. V. Perspectives on Bioenergy and Biotechnology in Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, n. 124, p.59-70, 2005.

PIROVANO, W.; FEENSTRA, K. A.; HERINGA, J. PRALINE™: a strategy for improved multiple alignment of transmembrane proteins. **Bioinformatics**, v. 24, n. (4), p. 492-497, 2008.

PIROVANO, W. & HERINGA, J. Protein secondary structure prediction. **Data Mining Techniques for the Life Sciences**, v. 609, n p. 327-348, 2010.

PITKÄNEN, J. P.; ARISTIDOU, A.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metabolic Engineering**, v. 5, n. 1, p.16-31, 2003.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; Jorge, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p.577-591, 2005.

RAJENDRAN, K.; RAJOLI, S.; TAHERZADEH, M. Techno-Economic Analysis of Integrating First and Second-Generation Ethanol Production Using Filamentous Fungi: An Industrial Case Study. **Energies**, v. 9, n. 5, p.359-372, 2016.

REDDY, V. S.; SHLYKOV, M. A.; CASTILLO, R.; SUN, E. I.; SAIER, M. H. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. **FEBS Journal**, v. 279, n. (11), p. 2022-2035, 2012.

ROBINSON, T. P.; ABOABA, O. O.; KALOTI, A.; OCIO, M. J.; BARANYI, J.; MACKEY, B. M. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. **International journal of food microbiology**, v. 70, n. (1), p. 163-173, 2001.

ROY, A.; KIM, Y. B.; CHO, K. H.; KIM, J. H. Glucose starvation induced turnover of the yeast glucose transporter *Hxt1*.

Biochimica et Biophysica Acta, v. 1840, n. (9), p. 2878-2885, 2014.

RUNQUIST, D.; HAHN-HAGERDAL, B.; RADSTROM, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p.5-12, 2010.

SAIER, M. H. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. (2), p. 354-411, 2000.

SALES, B. B. **Clonagem e expressão heteróloga de transportadores de xilose em linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante**. Tese (Doutorado) – Curso de Bioquímica. Universidade Federal de Santa Catarina, 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*. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 10, p.1973-1982, 2015.

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

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

SANTOS, A. A. dos. **DESENVOLVIMENTO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE SACCHAROMYCES**

CEREVISIAE COMO PLATAFORMAS DE ANÁLISE DE ENZIMAS E TRANSPORTADORES ENVOLVIDOS NA METABOLIZAÇÃO DE XILOSE. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p.19-27, 2012.

SATO, T. K.; TREMAINE, M.; PARREIRAS, L. S.; HEBERT, A. S.; MYERS, K. S.; HIGBEE, A. J.; NARASIMHAN, R. A. Directed evolution reveals unexpected epistatic interactions that alter metabolic regulation and enable anaerobic xylose use by *Saccharomyces cerevisiae*. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 10, p.1-31, 2016.

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, n. 8, p.671-684, 2004.

SEN, A.; ACOSTA-SAMPSON, L.; AHN, J.; CATE, J.; THORNER, J. W. Internalization of Heterologous Sugar Transporters by Endogenous α -Arrestins in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 24, p.7074-7085, 2016.

SHARMA, N. K.; BEHERA, S.; ARORA, R.; KUMAR, S.; K. SANI, R. K. Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 3, p.259-267, 2018.

SHIN, H. Y.; NIJLAND, J. G.; DE WAAL, P. P.; & DRIESSEN, A. J. The amino-terminal tail of Hxt11 confers membrane stability to the *Hxt2* sugar transporter and improves xylose fermentation in

the presence of acetic acid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 9, p.1937-1945, 2017.

SIMOSSIS, V. A. & HERINGA, J. PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. **Nucleic acids research**, v. 33, p. 289-294, 2005.

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

SOUZA, Z. J. BIOELETRICIDADE: O QUE FALTA PARA ESTA ALTERNATIVA ENERGÉTICA DESLANCHAR. **Revista Mercado Empresarial**, v. 41, n. 7, p.52-54, 2012.

SREEKRISHNA, K. & DICKSON, R. C. Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 23, p.7909-7913, 1985.

STAMBUK, B. U.; PANEK, A. D.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; ARAUJO, P. S. Expression of high-affinity trehalose-H⁺ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1379, p. 118-128, 1998.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BON, 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, n. 11, p.918-926, 2008.

SUBTIL, T. & BOLES, E. Improving L-arabinose utilization of pentose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells by heterologous expression of L-arabinose transporting sugar transporters. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p.38-48, 2011.

SUBTIL, T. & BOLES, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p.14-26, 2012.

SUN, L.; ZENG, X.; YAN, C.; SUN, X.; GONG, X.; RAO, Y.; YAN, N. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. **Nature**, v. 490, n. (7420), p. 361-366, 2012.

WANG, Y., SHI, W. L., LIU, X. Y., SHEN, Y., BAO, X. M., BAI, F. W., QU, Y. B. Establishment of a xylose metabolic pathway in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 11, p.885-890, 2004.

WANG, C.; BAO, X.; LI, Y.; JIAO, C.; HOU, J.; ZHANG, Q.; SHEN, Y. Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. **Data in Brief**, v. 4, p.119-126, 2015.

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, n. 5, p.2008-2012, 2016.

WAHLBOM, C. F.; OTERO, R. R. C.; 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, n. 2, 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**, Vol. 62, No. 12, p. 4648–4651. 1996.

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

WEUSTHUIS, R. A.; PRONK, J. T.; VAN DEN BROEK, P. J.; VAN DIJKEN, J. P. Chemostat Cultivation as a Tool for Studies on Sugar Transport in Yeasts. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 4, p.616-630, 1994.

WISEDCHAI SRI, G.; PARK, M.; IDANZA, M. G.; ZHEMG, H.; GONEN, T. Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein *XylE*. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p.1-11, 2014.

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.

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, n. 10, p.3311-3319, 2011.

YOUNG, E. M.; TONG, A.; BUI, H.; SPOFFORD, C.; ALPER, H. S. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. (1), p. 131-136, 2013.

ZHANG, X. R., SHEN, Y., SHI, W. L., BAO, X. M. Ethanol fermentation with glucose and xylose by the recombinant industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* NAN-127 and the effect of furfural on xylitol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 18, p.7093-7099, 2010.

ZHOU, H.; CHENG, J.; WANG, B. L.; FINK, G. R.; STEPHANOPOULOS, G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 6, p.611-622, 2012.