

Davi Ludvig Gonçalves

**INFLUÊNCIA DOS TRANSPORTADORES DE AÇÚCARES NA
FERMENTAÇÃO DE XILOSE POR LINHAGENS
RECOMBINANTES DE *Saccharomyces cerevisiae***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Boris U. Stambuk.

Florianópolis
2014

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

Gonçalves, Davi Ludvig

Influência dos transportadores de açúcares na fermentação de xilose por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* / Davi Ludvig Gonçalves ; orientador, Boris Ugarte Stambuk - Florianópolis, SC, 2014.
127 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. *Spathaspora arborariae*. 4. Transporte de xilose. 5. Co-fermentação. I. Stambuk, Boris Ugarte. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

“Influência dos transportadores de açúcares na fermentação de xilose por
linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*”
por

Davi Ludvig Gonçalves


Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos
membros titulares da Banca Examinadora (Port.
09/PPGBQA/2014) do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica - UFSC, composta
pelos doutores:

Orientador:

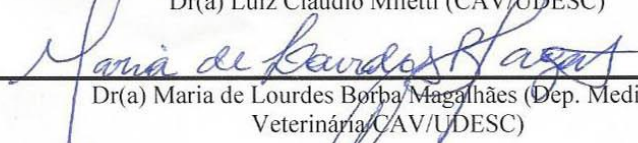


Dr(a) Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk (BQA/CCB/UFSC)


Banca examinadora:



Dr(a) Luiz Claudio Miletto (CAV/UDESC)



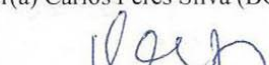
Dr(a) Maria de Lourdes Borba Magalhães (Dep. Medicina
Veterinária/CAV/UDESC)



Dr(a) Angélica Francesca Maris (BEG/CCB/UFSC)

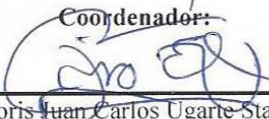


Dr(a) Carlos Peres Silva (BQA/CCB/UFSC)



Dr(a) Hernán Francisco Terenzi (BQA/CCB/UFSC)

Coordenador:



Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 13 de março de 2014

Esta tese é dedicada aos meus pais e à
minha esposa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Boris Stambuk pela orientação deste doutorado. Ao amigo e Professor da UFFS, Dr. Sérgio Luiz Alves Junior, pelas contribuições e discussões sobre o genoma de *Spathasphora arborariae*. Aos membros do AIST (Advanced Industrial Science and Technology; Hiroshima, Japão) Dr. Akinori Matsushika, Dr. Shinichi Yano, Dr. Tetsuya Goshima, Dr. Kinya Sakanishi e Dr. Tamotsu Hoshino, pelo auxílio e amizade durante o período em que fiz estágio no Japão.

Aos amigos, em especial Ayla Sant'Ana, Raquel Paredes, Rodrigo de Barros e Ricardo Sposina (UFRJ) e Andrés Posso (Colômbia). Aos colegas de laboratório, Augusto Bucker, Belisa Sales, Margareth Lagos, Ariane Schmitz, Luiz de Souza, Adriane Mouro, Vitor de Godoi, Marília Knychala e Denis Dall Agnolo pela amizade, cafés, parcerias e contribuições.

Aos meus pais pela educação, carinho e apoio em todas as decisões da minha vida, ter eles ao meu lado foi a primeira e maior conquista por mim já alcançada.

À minha tia Rose Gonçalves, por ter gentilmente fornecido hospedagem em Florianópolis durante meu doutoramento.

A minha esposa Kieu Pham, pelo amor, amizade e por ter dado um novo sentido a minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional e ao CNPq e JICA (Japan International Cooperation Agency) pelo apoio financeiro.

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”.

(Roger Von Oech)

RESUMO

A biomassa lignocelulósica é uma atrativa matéria prima para a produção de bioetanol, visto que este é um resíduo abundante, renovável e que não compete com a produção de alimento. *Saccharomyces cerevisiae*, entretanto, não é capaz de fermentar o principal açúcar presente nesta biomassa, a xilose. Para solucionar este problema é necessária a inserção da via para metabolismo de xilose nesta levedura, mas o transporte deste açúcar, todavia persiste como um dos passos limitantes para a sua eficiente fermentação. A levedura *Spathaspora arborariae*, por outro lado, é naturalmente capaz de fermentar xilose com alta capacidade. Neste trabalho analisamos diversas sequências no genoma de *S. arborariae*, relacionadas ao transporte e metabolismo de xilose. Paralelamente, estudamos o papel dos transportadores de hexose codificados pelos genes *HXT* no transporte de xilose em linhagens de *S. cerevisiae* deletadas para um dos genes *HXT1-HXT5* (linhagens *hxt-knockout*) ou para todos os genes *HXT1-HXT7* e *GAL2* (linhagem *hxt-null*). Avaliamos também o impacto da hidrólise extracelular de sacarose na co-fermentação de xilose em duas linhagens industriais recombinantes de *S. cerevisiae*. Os resultados indicaram que *S. arborariae* possui pelo menos dez sequências que codificam para possíveis transportadores de açúcar, embora possua apenas uma cópia dos genes para o metabolismo de xilose e via das pentose-fosfato. Com relação aos transportadores codificados pelos genes *HXT*, constatamos que somente através da sobre-expressão destes genes foi possível observar melhorias no desempenho fermentativo das linhagens *hxt-knock* ou *hxt-null*. Quando sobre-expresso na linhagem *hxt-null*, o transportador codificado pelo gene *HXT1* permitiu o máximo consumo de açúcar e produção de etanol, mas foi incapaz de permitir o consumo de somente xilose. O gene *HXT7* possibilitou a eficiente fermentação de xilose, mas em co-fermentações de glicose e xilose mostrou uma clara preferência por glicose. O gene *HXT5* não possibilitou a utilização de xilose, enquanto que *HXT2* codificou para o transportador que permitiu o consumo e fermentação de xilose com a mesma velocidade que glicose, mesmo em co-fermentações de glicose e xilose, embora tenha apresentado fermentações incompletas com consumo de apenas 58% da xilose. Com relação às linhagens industriais, foi observado que ambas as linhagens industriais consumiram xilose mais rapidamente nas co-fermentações, embora este consumo tenha sido mais eficiente em co-fermentações de sacarose com xilose. Foi observado ainda uma produção de etanol 23% superior para a linhagem que não hidrolisa sacarose extracelularmente nas co-fermentações de sacarose e xilose. Concluindo, os transportadores de açúcar de *S. arborariae* encontrados no genoma apresentam grande potencial para a expressão heteróloga em *S. cerevisiae*, e a sobre-expressão dos genes *HXT1*, *HXT2* ou *HXT7* endógenos de *S. cerevisiae*, aliado ao emprego de linhagens que hidrolizem a sacarose preferencialmente de maneira intracelular, permitirão a produção de etanol integrando as tecnologias de primeira e segunda geração no Brasil.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, *Spathaspora arborariae*, xilose, sacarose, transporte, co-fermentação.

ABSTRACT

The lignocellulosic biomass is an attractive feedstock for bioethanol production, since this is an abundant and renewable waste that does not compete with food production. *Saccharomyces cerevisiae*, however, is not able to ferment the main sugar present in this biomass, the xylose. To solve this problem the insertion of the pathway for xylose metabolism is required in this yeast, the transport of sugar, however, remains as one of the limiting steps for the efficient xylose fermentation. The yeast *Spathaspora arborariae*, on the other hand, is naturally capable of fermenting xylose with high capacity. In this work we analyzed several sequences in the genome of *S. arborariae* related to the transport and metabolism of xylose. Parallel to this, we have studied the role of hexose transporters encoded by the *HXT* genes for the transport of xylose in *S. cerevisiae* strains deleted for the *HXT1-5* genes (*hxt-knockout* strains) or all *HXT1-7* and *GAL2* genes (*hxt-null* strain). We also investigated the impact of extracellular hydrolysis of sucrose in fermentation and co-fermentation of xylose using two recombinant industrial strains of *S. cerevisiae*. Our results indicate that *S. arborariae* has at least ten sequences encoding for sugar transporters, although has only one copy of the genes for the metabolism of xylose and pentose phosphate pathway. Regarding the transporters encoded by the *HXT* genes, we saw that only by the overexpression of these genes it was observed improvements in the fermentation performance of the *hxt-knockout* or *hxt-null* strains. When overexpressed in the *hxt-null* strain, the transporter encoded by the *HXT1* gene achieved the higher sugar consumption and ethanol production, but was unable to grow on xylose only, *HXT7*, however, enabled the efficient fermentation of xylose, but in co-fermentation of glucose and xylose showed a clear preference for glucose. *HXT5* was not able to consume xylose, while the transporter encoded by *HXT2* gene allowed the consumption of xylose at the same rate as glucose, even in glucose and xylose co-fermentation, albeit exhibited truncated fermentation with less than 58% of the xylose consumption. Regarding the industrial strains, we observed a 23% higher ethanol production from the strain that does not hydrolyze sucrose extracellularly in sucrose and xylose co-fermentation assays. We also observed that both industrial strains consumed xylose faster in co- fermentations, although this consumption has been more efficient in sucrose co-fermentation rather than in glucose. In conclusion, the *S. arborariae* sugar transporters found here have great potential for heterologous expression in *S. cerevisiae*, furthermore the overexpression of the endogenous *HXT1*, *HXT2* or *HXT7* genes from *S. cerevisiae* and strategies employing strains that preferentially hydrolyze sucrose intracellularly will contribute in a scenario for ethanol production using technologies from the first and second generation in Brazil.

Keywords: *HXT*, *iSUC2*, *Saccharomyces cerevisiae*, xylose, co-fermentation, *Spathaspora arborariae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Participação no licenciamento total de veículos leves <i>flex-fuel</i>	21
Figura 2 - Representação esquemática da matriz de polímeros em que a celulose se encontra.....	24
Figura 3 - Representação das vias de captação de sacarose em <i>S. cerevisiae</i>	31
Figura 4 - Localização cromossômica dos 20 genes <i>HXT</i> de <i>S. cerevisiae</i>	33
Figura 5 – Esquema do metabolismo de xilose até etanol por leveduras, fungos filamentosos e bactérias.....	37
Figura 6 – Plasmídeos utilizados neste trabalho.	45
Figura 7 – Transformação das linhagens com os plasmídeos para metabolização de xilose (A) ou sobre-expressão dos genes <i>HXT</i> (B).....	48
Figura 8 - Filograma de transportadores de açúcar em leveduras.	53
Figura 9 – Verificação da presença do gene <i>XKSI</i> sobre-expresso em <i>S. cerevisiae</i>	60
Figura 10 – Ensaios fermentativos em meio rico (YP) contendo maltose (YPM), xilose (YPX) ou a mistura de ambos os açúcares (YPMX) utilizando-se a linhagem DLG-K1.	62
Figura 11 – Ensaios fermentativos em meio rico contendo glicose (YPD) ou xilose (YPX) utilizando-se as linhagens MA-B43, DLG-H1, DLG-H2, DLG-H3, DLG-H4 e DLG-H5.	64
Figura 12 – Ensaios fermentativos em meio rico contendo xilose (YPX) utilizando-se as linhagens MA-B43, DLG-H1, DLG-H2, DLG-H3, DLG-H4 e DLG-H5 com elevada densidade celular inicial.	66
Figura 13 – Ensaios fermentativos em meio rico contendo glicose e xilose (YPDX) utilizando-se as linhagens MA-B43, DLG-H1, DLG-H2, DLG-H3, DLG-H4 e DLG-H5.....	67
Figura 14 – Ensaios fermentativos em meio rico contendo glicose e xilose (YPDX) utilizando-se as linhagens MA-B43, DLG-H1, DLG-H2, DLG-H3, DLG-H4 e DLG-H5 com elevada densidade celular inicial.	69

Figura 15 – Ensaios fermentativos em meio sintético completo contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX) utilizando-se a linhagem MA-B43	73
Figura 16 – Ensaios fermentativos em meio sintético dropout (sem uracila), contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX), utilizando-se as linhagens DLG-K1T1 e DLG-H1T1.....	75
Figura 17 – Ensaios fermentativos em meio sintético dropout (sem uracila), contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX), utilizando-se as linhagens DLG-K1T2 e DLG-H2T2.....	77
Figura 18 – Ensaios fermentativos em meio sintético dropout (sem uracila), contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX), utilizando-se as linhagens DLG-K1T5 e DLG-H5T5.....	79
Figura 19 – Ensaios fermentativos em meio sintético dropout (sem uracila), contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX), utilizando-se a linhagem DLG-K1T7.	82
Figura 20 – Produção de biomassa celular, glicerol e xilitol durante os ensaios fermentativos em meio sintético dropout (sem uracila), contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX), utilizando-se as linhagens DLG-K1T1, DLG-K1T2, DLG-K1T5 e DLG-K1T7.....	87
Figura 21 – Produção de biomassa celular, glicerol e xilitol durante os ensaios fermentativos em meio sintético completo ou dropout (sem uracila), contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX), utilizando-se as linhagens MA-B43, DLG-H1T1, DLG-H2T2 e DLG-H5T5.....	88
Figura 22 – Ensaios fermentativos em meio rico contendo glicose (YPD) utilizando-se as linhagens MP-C5 e MP-G1.....	91
Figura 23 – Ensaios fermentativos em meio rico contendo xilose (YPX) utilizando-se as linhagens MP-C5 e MP-G1.....	93
Figura 24 – Ensaios fermentativos em meio rico contendo glicose e xilose (YPDX) utilizando-se as linhagens MP-C5 e MP-G1	94
Figura 25 – Ensaios fermentativos em meio rico contendo sacarose e xilose (YPSX) utilizando-se as linhagens MP-C5 e MP-G1	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas.....	43
Tabela 2- Plasmídeos utilizados.....	45
Tabela 3- Lista de Oligonucleotídeos Iniciadores.....	47
Tabela 4- Atividade de xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulocinase (XK) em extratos celulares de linhagens recombinantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
Tabela 5- Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se linhagens <i>hxt-knockout</i> e linhagem selvagem (MA-B43), transformadas com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR, em meio contendo glicose ou xilose.....	65
Tabela 6- Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se linhagens <i>hxt-knockout</i> e linhagem selvagem (MA-B43), transformadas com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR, em meios contendo glicose e xilose.....	70
Tabela 7- Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se linhagens <i>hxt-knockout</i> e <i>hxt-null</i> sobre-expressando algum gene <i>HXT</i> ou linhagem selvagem (MA-B43), transformadas com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR, em meios contendo glicose ou xilose.....	83
Tabela 8 - Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se linhagens <i>hxt-knockout</i> e <i>hxt-null</i> sobre-expressando algum gene <i>HXT</i> ou linhagem selvagem (MA-B43), transformadas com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR, em meios contendo glicose e xilose.....	85
Tabela 9- Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se as linhagens industriais MP-C5 e MP-G1, transformadas com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR, em meios contendo glicose, xilose ou sacarose.	90
Tabela 10- Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se as linhagens industriais MP-C5 e MP-G1, transformadas com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR , em meios contendo glicose e xilose. ...	95
Tabela 11- Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se as linhagens industriais MP-C5 e MP-G1, transformadas com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR, em meios contendo sacarose e xilose. ..	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
DO	Densidade óptica
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alto desempenho)
<i>hxt-knockout</i>	Linhagens deletadas para um dos genes <i>HXT</i> (<i>hxt1Δ</i> , <i>hxt2Δ</i> , <i>hxt3Δ</i> , <i>hxt4Δ</i> ou <i>hxt5Δ</i>)
<i>hxt-null</i>	Linhagem deletada para os principais transportadores de hexose (<i>hxt1-hxt7Δ</i> e <i>gal2Δ</i>)
kb	Quilo base (equivalente a 1000 pares de bases nitrogenadas)
kDa	Quilo Dalton
LDH	Lactato desidrogenase
Meio LB	Meio Lúria-Bertani
Meio SC	Meio sintético
Meio YP	Meio rico
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (em estado oxidado)
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (em estado reduzido)
NADP	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (em estado reduzido)
ORF	<i>Open reading frame</i> (sequência de leitura aberta)
pb	Pares de bases nitrogenadas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PK	Piruvato cinase
PPP	<i>Pentose phosphate pathway</i> (via das pentose- fosfato)
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
U	Unidade de Enzima
<i>w.t.</i>	<i>Wild type</i> (Linhagem selvagem)

LISTA DE SÍMBOLOS

\approx	Aproximadamente
K_m	Constante de Michaelis-Menten
V_E	Velocidade de produção volumétrica máxima de etanol
V_S	Velocidade de consumo volumétrico máximo de açúcar
$Y_{E/S}$	Rendimento baseado em g de etanol produzido por g de açúcar consumido
V_G	Velocidade de consumo volumétrico máximo de glicose
V_X	Velocidade de consumo volumétrico máximo de xilose
V_{SE}	Velocidade de consumo volumétrico máximo de sacarose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	19
1.1.1 <i>Objetivo Geral</i>	19
1.1.2 <i>Objetivos Específicos</i>	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 O ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO NO BRASIL	20
2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	22
2.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LEVEDURAS <i>SPATHASPORA ARBORARIAE</i> E <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	27
2.4 UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES POR <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	29
2.4.1 <i>Utilização de Sacarose</i>	29
2.4.2 <i>Utilização de xilose</i>	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 SEQUENCIAMENTO E ANOTAÇÃO DO GENOMA DA LEVEDURA FERMENTADORA DE D-XILOSE <i>SPATHASPORA ARBORARIAE</i>	41
3.2 CEPAS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> UTILIZADAS, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	41
3.3 PLASMÍDEOS E INICIADORES UTILIZADOS	44
3.4 TRANSFORMAÇÃO DAS LEVEDURAS	46
3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA XILOSE REDUTASE, XILITOL DESIDROGENASE E XILULOCINASE	48
3.6 ENSAIOS FERMENTATIVOS	49
3.7 DETERMINAÇÃO DOS SUBSTRATOS E PRODUTOS DAS FERMENTAÇÕES	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 SEQUENCIAMENTO E ANOTAÇÃO DO GENOMA DA LEVEDURA FERMENTADORA DE D-XILOSE <i>SPATHASPORA ARBORARIAE</i>	50
4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE XILOSE REDUTASE, XILITOL DESIDROGENASE E XILULOCINASE E CONFIRMAÇÃO DO GENE <i>XKS1</i> SOBRE-EXPRESSO EM LINHAGENS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	56
4.3 ENSAIOS FERMENTATIVOS DE XILOSE POR LINHAGENS RECOMBINANTES DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	60
4.3.1 <i>Linhagem de laboratório hxt-null</i>	60
4.3.2 <i>Linhagens de laboratório hxt-knockout e linhagem MA-B43</i>	63

<i>4.3.3 Linhagens de laboratório com genes HXT sobre-expressos e linhagem MA-B43</i>	71
<i>4.3.4 Linhagens industriais recombinantes</i>	88
<i>4.3.4 Linhagens industriais recombinantes</i>	89
5 CONCLUSÃO	100
6. REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis desempenham ainda um importante e estratégico papel na sociedade. Esta fonte de energia, no entanto, embora eficiente energeticamente apresenta diversas desvantagens, tais como a constante oscilação de preço, incerteza sobre o real volume das reservas no mundo, poluição (causada pela queima destes combustíveis) e grande dependência dos países compradores em relação aos poucos países produtores. Estes fatores foram decisivos para que a sociedade moderna procurasse por novas alternativas para combustíveis menos poluentes, tal como o etanol.

No Brasil, o surgimento do Pro-álcool nos anos 70 contribuiu para que o Brasil se tornasse recentemente o maior produtor mundial de etanol a partir de cana-de-açúcar e o segundo maior produtor mundial em volume (Amorim et al., 2011) e embora a produção deste etanol (conhecido como etanol de primeira geração) tenha alcançado níveis de rendimento altíssimos no Brasil, com valores entre 90% e 92% do teórico máximo (Andrietta et al., 2007), esforços tem sido feitos a fim de alcançar também a sustentabilidade da produção deste combustível nas usinas brasileiras, visando proteger as reservas naturais e reduzir a emissão de gases provenientes da queima de cana (Leal e Walter, 2010).

Aliado ao desejo de um combustível sustentável reside também o fato de que nem todos os países são capazes de produzir etanol a partir de milho ou cana-de-açúcar (principais fontes utilizadas atualmente) em quantidades suficientes, seja pela carência de matéria prima e/ou tecnologia. Neste sentido surge o etanol de segunda geração que utiliza como matéria-prima fontes lignocelulósicas (tais como bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e arroz, gramíneas e madeira em geral) que são renováveis e abundantes (Caspeta et al., 2013; Cheng et al., 2008). É de notar, entretanto, que o sucesso do etanol de segunda geração no Brasil dependerá também da aplicação dos conhecimentos adquiridos com o etanol de primeira geração (Soccol et al., 2010).

Desta forma o uso da biomassa lignocelulósica como matéria prima na usina brasileira poderá proporcionar, além do ganho em volume de produção de etanol, também uma alternativa ao período entressafra visto que por aproximadamente 4 a 6 meses por ano, as destilarias brasileiras ficam ociosas (Amorim et al., 2011). É sabido ainda que o emprego em uma escala maior do etanol irá requer certamente a produção de etanol a partir de matéria-prima lignocelulósica (Sims et al., 2010).

A biomassa lignocelulósica é composta de diversos açúcares, dentre estes açúcares a glicose e a xilose merecem destaque por ser respectivamente o primeiro e o segundo açúcar mais abundante nesta biomassa (Cardona et al., 2010; Carroll e Somerville 2009; Matsushika et al., 2009b). Apesar das inúmeras vantagens proporcionadas pelo uso de um substrato desta natureza, um dos grandes desafios para o emprego desta tecnologia reside no fato de que a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, principal microrganismo utilizado pela indústria de etanol, não é capaz de fermentar a xilose (Matsushika et al., 2008b). Neste sentido, embora *S. cerevisiae* seja capaz de fermentar glicose com alta eficiência, a eficiente conversão não apenas de glicose, mas também de xilose em etanol é descrita como uma etapa fundamental para um processo economicamente viável de produção de etanol de segunda geração (Oreb et al., 2012).

Considerando-se que *S. cerevisiae* apresenta diversas vantagens para a indústria em relação ao emprego de outros organismos (Amarin et al., 2011), o uso da tecnologia de DNA recombinante aparece desta forma como uma importante ferramenta a fim de conferir novas habilidades a este organismo sem abrir mão das características que o tornaram preferido. Assim, com os adventos da genética os custos da produção de etanol de segunda geração podem ser significativamente reduzidos no futuro (Cardona et al., 2010).

Muitos pesquisadores tem se dedicado para tornar possível a utilização de xilose por *S. cerevisiae* (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Kim et al., 2013a; Matsushika et al., 2008b; 2009a; Nielsen et al., 2013; van Vleet e Jeffries, 2009). Entretanto, o principal foco tem sido o desenvolvimento e a melhoria de vias intracelulares de utilização de xilose em *S. cerevisiae* através da sobre-expressão das enzimas envolvidas no catabolismo de xilose (Kim et al., 2013a; Matsushika et al., 2008c; 2009a; van Vleet e Jeffries, 2009). É sabido, no entanto que o transporte de xilose para o interior da célula pela levedura constitui um gargalo, visto que este transporte é realizado por transportadores de hexose com baixa afinidade por xilose (Oreb et al., 2012; Parachin et al., 2011; Sedlak e Ho, 2004; Young et al., 2010). Assim, a expressão heteróloga de transportadores de xilose em *S. cerevisiae* tem sido uma das alternativas apontadas por pesquisadores para contornar este problema, embora apenas alguns poucos transportadores heterólogos de xilose foram expressos com sucesso em *S. cerevisiae* devido a problemas de modificações pós-traducionais (Leandro et al., 2006; 2008; Wieczorke et al., 2003). Com relação aos transportadores endógenos de *S. cerevisiae*, a sobre-expressão dos genes *HXT* (*HXT1*-

HXT17 e *GAL2*) que codificam para transportadores de hexose tem mostrado resultados promissores (Hamacher et al., 2002; Saloheimo et al., 2007; Sedlak e Ho, 2004; Young et al., 2011; 2012). Infelizmente a influência na fermentação de xilose pelos transportadores Hxt expressos individualmente ainda é desconhecida, visto que os trabalhos citados acima têm focado principalmente nas velocidades de consumo e/ou crescimento em xilose ou ainda o estudo do transporte de xilose marcada radioativamente (^{14}C -xilose), através do uso de linhagens recombinantes que apresentam ainda crescimento bastante lento em xilose.

No presente trabalho de doutoramento sequenciamos o genoma da levedura fermentadora de xilose *Spathaspora arborariae* e a partir das informações obtidas selecionamos sequências que possivelmente codificam para proteínas relacionadas ao transporte e metabolismo de xilose, a fim de compreender a origem e a evolução sobretudo dos transportadores de açúcar presentes nesta levedura. Analisamos também o impacto dos transportadores codificados pelos genes *HXT*, presentes em *S. cerevisiae*, em fermentações e co-fermentações de xilose por linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* de laboratório. Finalmente, empregando duas linhagens industriais recombinantes de *S. cerevisiae*, analisamos o impacto da localização celular da invertase (responsável pela hidrólise de sacarose) nas co-fermentações de sacarose e xilose.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver, através da engenharia genômica, estratégias para melhorar a captação e fermentação de xilose em linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*, buscando desta forma contribuir para o desenvolvimento de linhagens melhor adaptadas à produção de etanol de segunda geração no Brasil.

1.1.2 Objetivos Específicos

-Analisar o genoma de *Spathaspora arborariae*: após o sequenciamento, localizar no genoma de *S. arborariae* sequências que possam codificar para proteínas relacionadas ao transporte e metabolismo de xilose.

-Inserir a via para metabolismo de xilose em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*: construir linhagens de *S. cerevisiae* com os genes necessários para o metabolismo de xilose integrados no seu genoma.

-Analisar a fermentação de xilose por linhagens sobre-expressando genes *HXT*: construir plasmídeos para sobre-expressar os genes *HXT* (*HXT1*, *HXT2*, *HXT5* ou *HXT7*) em linhagens de laboratório de *S. cerevisiae* recombinantes.

-Analisar a fermentação de xilose por linhagens industriais recombinantes: verificar a influência da localização celular da invertase na co-fermentação de xilose e sacarose por linhagens industriais capazes de metabolizar esta pentose.

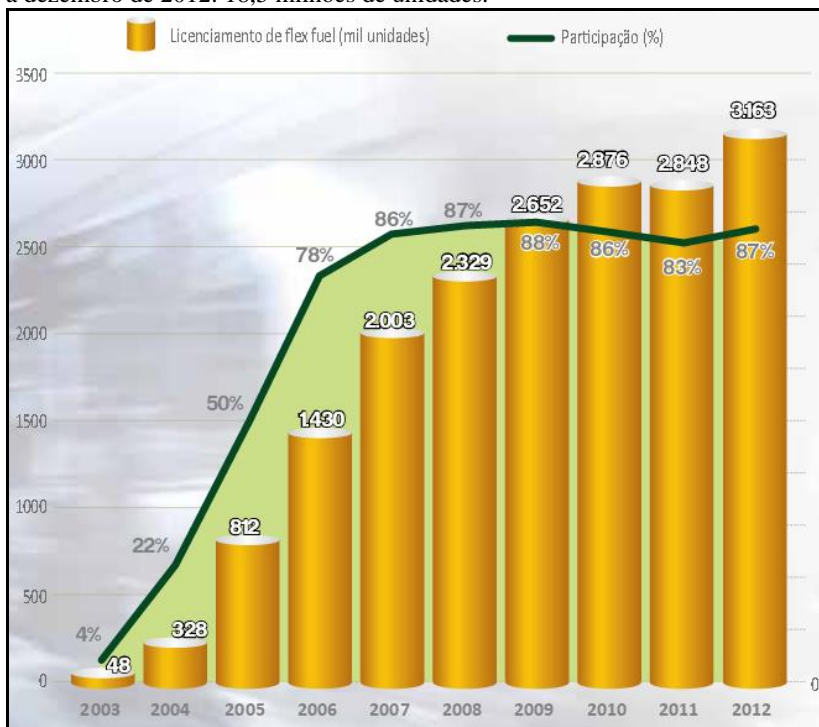
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO NO BRASIL

A crescente necessidade de novas fontes renováveis de energia e a diminuição da dependência em relação aos combustíveis fósseis tem encorajado há décadas diversos pesquisadores ao redor do mundo na busca por novas alternativas sustentáveis e menos poluentes. Neste sentido o Brasil encontra-se em uma situação privilegiada, seja pela sua localização geográfica ou ainda pelo seu pioneirismo no emprego em larga escala do etanol de cana-de-açúcar. No Brasil, o desenvolvimento desta área teve grande incentivo logo após a crise mundial do petróleo em 1979, quando o governo brasileiro passou a encorajar a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar. O programa Pro-álcool tinha como objetivo primário a diminuição da dependência aos combustíveis fósseis, através da adição de 20-25% de álcool anidro na gasolina. Desta forma, e devido também aos subsídios oferecidos pelo governo, houve o consequente aumento da frota de veículos que utilizavam somente este combustível (Amorin et al., 2011).

No entanto, apesar do sucesso em um primeiro momento, devido à grande volatilidade do mercado sucroalcooleiro do Brasil o etanol passou a faltar nos postos de combustível (Amorin et al., 2011). Isto porque a produção de açúcar ou etanol era priorizada de acordo com a maior ou menor atratividade econômica de um destes produtos, prejudicando desta forma o consumidor dotado de carro movido somente a etanol. A desconfiança dos consumidores deu início ao que seria o fim do Pró-álcool no fim da década de 80 (Amorin et al., 2011; Goldemberg, 2008; Mussato et al., 2010). A situação começou a mudar apenas em meados de 2003 com a introdução dos carros *flex-fuel*, trazendo a opção ao proprietário de utilizar álcool ou gasolina ou ainda qualquer mistura destes combustíveis (Amorin et al., 2011; Mussato et al., 2010). Como mostrado na Figura 1, o licenciamento de veículos *flex-fuel* apresentou grande crescimento desde o lançamento desta tecnologia no Brasil. Aliado a oferta de etanol para carros dotados desta tecnologia, o etanol anidro também está presente na composição da gasolina atualmente vendida nos postos de combustível do Brasil, sendo que a concentração de etanol na gasolina geralmente é de 20% a 25% (Amorin et al., 2011). Nos dias atuais o Brasil ocupa a posição de maior produtor mundial de etanol de cana-de-açúcar, e o segundo maior em volume total deste biocombustível atrás somente dos Estados Unidos.

Figura 1 – Participação no licenciamento total de veículos leves *flex-fuel*. Total de licenciamento acumulado de veículos *flex-fuel* de Março de 2003 a dezembro de 2012: 18,5 milhões de unidades.



FONTE: Anfavea (2013).

O sucesso do etanol no Brasil pode ser explicado em grande parte pela escolha do substrato utilizado na produção deste combustível. Comparado com outros cultivos utilizados para a obtenção de etanol de primeira geração, a cana-de-açúcar é classificada como aquela com menor custo de produção em todo o mundo e maior produtividade (Amorin et al., 2011, Andrieta et al., 2007; Musato et al., 2010; Nogueira et al., 2008). Esta produtividade alcança atualmente em torno de 6800 L de etanol por hectare no Brasil sendo, portanto, maior que àquela obtida pelo etanol de milho cuja produtividade por hectare fica em torno de 4000 L (Dantas et al., 2013; Nogueira et al., 2008). Estes números, embora possam variar de acordo com a região e o período de análise, justificam, entretanto o fato de a cana-de-açúcar ser considerada o melhor substrato para produção de etanol (Walter et al., 2008),

fazendo com que o etanol de cana-de-açúcar obtido no Brasil seja considerado totalmente competitivo com a gasolina (Goldemberg e Guardabassi, 2010; Leal e Walter, 2010). Além das vantagens de produção, a cana-de-açúcar é considerada benevolente ao solo, pois permite interações simbióticas com microrganismos fixadores de nitrogênio, trazendo desta forma, vantagens ao solo em que é cultivada (Goldemberg, 2007).

No Brasil, o processo de produção de etanol ou açúcar tem início com a colheita da cana-de-açúcar que é então moída para a extração do caldo. Este caldo é basicamente composto de água (78% a 86%), sacarose (10% a 20%), açúcares redutores (0,1% a 2%), cinzas (0,3% a 0,5%) e de compostos nitrogenados (0,5% a 1%; Lima et al., 2001). Após a extração, o caldo é processado para a obtenção do açúcar refinado ou utilizado na produção de etanol. O melaço, subproduto do beneficiamento do açúcar, apresenta ainda grande quantidade de açúcares e é por este motivo também utilizado na produção de etanol. Desta forma, o mosto utilizado na obtenção do etanol brasileiro é composto do caldo de cana-de-açúcar, de melaço ou da mistura destes dois substratos. Este mosto contém em média 180 g L⁻¹ de açúcares totais (composto principalmente por sacarose) que podem ser fermentados com um rendimento que alcança 90% a 92% do teórico máximo. Aliado a este alto rendimento o emprego de vários ciclos, que duram entre seis e dez horas cada, confere grande dinamismo e produtividade à usina brasileira (Amorim et al., 2011; Andrietta et al., 2007).

2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Embora o etanol de primeira geração resulte de um processo amadurecido, consolidado e com alto rendimento como visto na seção anterior, a necessidade de aumentar a eficiência deste processo através do melhor emprego dos resíduos da destilaria, aliado a busca por um destino mais nobre à grande quantidade de biomassa lignocelulósica (lignocelulose é um polímero complexo composto de celulose, hemicelulose e lignina) que se acumula não apenas nas usinas, mas também ao redor do planeta sob diferentes formas (Cerqueira et al., 2007) acabou por focar a atenção de pesquisadores e autoridades na eficiente produção do etanol de segunda geração, visto que este etanol, diferente do etanol de primeira geração, pode ser obtido a partir de praticamente qualquer fonte lignocelulósica (bagaço de cana-de-açúcar, gramíneas, palha de milho ou de arroz, etc.), tornando desta forma o

etanol de segunda geração extremamente atraente, uma vez que os materiais lignocelulósicos são renováveis, abundantes, com baixo custo e não competem com a produção de alimento para consumo humano ou animal (Cardona e Sánchez, 2007; Caspeta et al., 2013; Cheng et al., 2008).

Especialmente no caso do bagaço de cana-de-açúcar, este chama a atenção por ser um resíduo produzido em grande quantidade nas próprias usinas sucroalcooleiras do Brasil (Amorin et al., 2011). Além do Brasil, outros países tais como Índia, Cuba, China, México, Indonésia e Colômbia (Chandel et al., 2007; Cheng et al., 2008; Hernández-Salas et al., 2009; Martínez et al., 2003; Quintero et al., 2008; Restuti e Michaelowa, 2007) também produzem etanol a partir de cana-de-açúcar, estando sujeitos ao grande acúmulo de resíduos lignocelulósicos. Estes resíduos poderiam ser utilizados diretamente pela usina para a obtenção do etanol de segunda geração, sendo que no caso do Brasil os custos desta matéria-prima estariam restritos à estocagem apenas (Leal e Walter 2010).

Atualmente parte desta biomassa lignocelulósica produzida pelas usinas brasileiras já é utilizada na co-geração de energia, através da queima do bagaço, conferindo autossustentabilidade energética para as usinas e destilarias que podem ainda vender o excedente de energia elétrica obtida (Dantas et al., 2013; Quintero et al., 2008; Raj et al., 2011). No entanto, estima-se que em torno de 10% do bagaço ainda seja desprezado pelas usinas, podendo causar problemas ambientais, além da perda de uma fonte de potencial valor (Soccol et al., 2010).

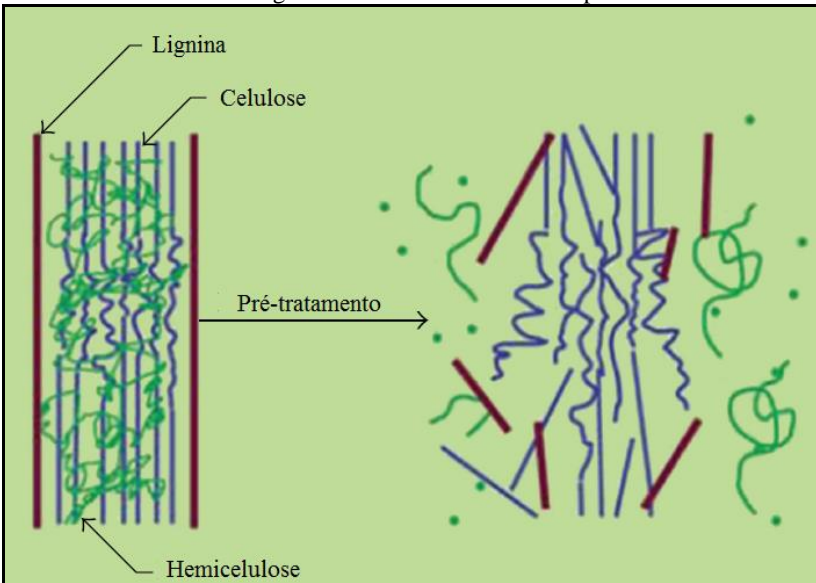
O bagaço e a palha da cana-de-açúcar, assim como outras fontes lignocelulósicas, constituem fontes de potencial valor visto que apresentam grande quantidade de açúcares fermentáveis embora não prontamente disponíveis. Estes açúcares estão organizados principalmente na forma de celulose (um homopolímero de D-glicose unido por ligações glicosídicas do tipo β -1-4) ou hemicelulose (um heteropolímero amorfo que contém hexoses e pentoses). Os açúcares que compõem a hemicelulose são as pentoses D-xilose e L-arabinose e as hexoses D-manose, D-glicose e D-galactose. No entanto, glicose e xilose são respectivamente a hexose e a pentose predominante nesta biomassa lignocelulósica (Carroll e Somerville, 2009; Matsushika et al., 2009b; Oreb et al., 2012; Saritha et al., 2012).

Na biomassa lignocelulósica a celulose aparece organizada em fibras e microfibrilas estabilizadas por pontes de hidrogênio, tendo ainda a hemicelulose e a lignina (um polímero complexo de fenóis) que conferem rigidez à lignocelulose. Devido, a esta complexa estrutura da

biomassa, faz-se necessário o tratamento deste material a fim de se obter os açúcares mais simples (oligo ou monossacarídeos) que poderão ser então fermentados (Brodeur et al., 2011).

O processo de tratamento da biomassa geralmente tem início com uma etapa de pré-tratamento ou pré-hidrólise, onde através do emprego de um processo físico, químico, físico-químico ou biológico, busca-se a quebra e/ou desestabilização da estrutura da biomassa lignocelulósica (Figura 2) a fim de proporcionar o acesso das enzimas celulolíticas ao seu substrato durante a etapa posterior de hidrólise enzimática (Ferreira-Leitão et al., 2010; Saritha et al., 2012).

Figura 2 - Representação esquemática da matriz de polímeros em que a celulose se encontra. O pré-tratamento da biomassa por diferentes métodos remove a hemicelulose e lignina desta matriz antes da etapa de hidrólise.



FONTE: Adaptado de Mosier et al., 2005.

Contudo, é fundamental para o sucesso do pré-tratamento que este processo preserve a integridade dos monossacarídeos, visto que práticas rotineiras de pré-tratamento como àquelas que empregam altas temperaturas (200-240°C) aliadas ao uso de compostos oxidantes (Na_2CO_3 , por exemplo) ou ácidos (HCL ou H_2SO_4) podem ocasionar a degradação de açúcares. Em condições de alta temperatura e pressão a xilose pode ser degradada à furfural e as hexoses (manose, galactose e

glicose) podem ser degradadas a 5-hidroximetil furfural (HMF). Furfural e HMF são inibidores do crescimento microbiano e podem ser degradados ainda a outro composto tóxico às células, o ácido fórmico. Além destes compostos, ácidos fracos e compostos fenólicos também podem ser gerados durante a etapa de pré-tratamento (provenientes da degradação de carboidratos ou lignina), sendo também prejudiciais às células (Brodeur et al., 2011; Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000).

A etapa de hidrólise, realizada após o pré-tratamento, pode ser realizada pelo emprego de ácido (diluído ou concentrado) ou enzimas. Embora este processo não esteja totalmente desenvolvido, é atualmente aceito que o emprego de enzimas possibilita o melhor aproveitamento dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica, visto que as enzimas, ao contrário dos ácidos diluídos, catalisam apenas reações de hidrólise e não degradam os açúcares (Cardona et al, 2010; Dantas et al, 2013; Silva et al., 2010).

As enzimas utilizadas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica são geralmente uma mistura de três grupos de enzimas conhecidas como xilanases, que atuam na porção hemicelulósica; celulasas, que atuam na porção celulósica, e as β -glicosidases responsáveis pela liberação das moléculas de glicose. Enquanto que as xilanases envolvem diversas enzimas que tem com um dos produtos a xilose, as celulasas podem ser ainda subdivididas em *endo*- β -1,4-glucanohidrolases e *exo*- β -1,4-glucanocelobiohidrolases. O processo de hidrólise da celulose inicia com as celulasas que atuam quebrando a celulose em celobiose, esta celobiose será então hidrolisada pelas β -glicosidases em duas moléculas de glicose (Parisi, 1989).

Um dos principais desafios na obtenção do etanol de segunda geração reside no fato de que, embora *S. cerevisiae* consuma hexoses com grande eficiência, esta levedura é incapaz de consumir pentoses tais como a xilose (Bertilsson et al., 2008; Cardona et al., 2010; Matsushika et al., 2009b; Saloheimo et al., 2007). Sabe-se, entretanto que o microrganismo ideal para a produção de etanol deve ser capaz de utilizar as pentoses e hexoses geradas pela hidrólise dos materiais lignocelulósicos (Chandel et al., 2007; Oreb et al., 2012). Neste sentido, uma alternativa seria o emprego de outros microrganismos que naturalmente utilizem pentoses, no entanto a produtividade exibida por estes microrganismos é geralmente muito inferior àqueles que utilizam somente hexoses (Cardona et al., 2010).

Alguns fungos filamentosos, de gêneros tais como *Chalara*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Neurospora*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* são capazes de fermentar xilose, sendo que algumas outras espécies podem

inclusive fermentar substratos celulósicos mais complexos, tais como *Monilia sp.*, *Neocallimastix sp.*, *Trichoderma reesei* e *Fusarium oxysporum* que possuem a capacidade de converter cellulose/hemicelulose em etanol/ácido acético (Xu et al., 2009). Estes fungos, no entanto, apresentam várias desvantagens ao seu emprego direto na indústria tais como baixa produção de etanol, caldo de fermentação altamente viscoso, necessidade de níveis baixíssimos de oxigênio e formação de outros bioprodutos em grandes quantidades (Kuhad et al., 2011).

Algumas espécies de leveduras como *Scheffersomyces stipitis* (denominada anteriormente como *Pichia stipitis*), *Kluyveromyces marxianus*, *Candida succiphila* e *Spathaspora arborariae* (Cadete et al., 2009; Hahn-Hägerdal et al., 1994; Jeffries et al., 2007; Stambuk et al., 2003) utilizam a xilose e a fermentam com diferentes graus de rendimento de etanol. Essas leveduras, entretanto, apresentam desempenho fermentativo inferior ao de *S. cerevisiae*, sobretudo em condições que simulam àquelas encontradas na indústria. Estas leveduras, diferentemente de *S. cerevisiae*, geralmente apresentam baixa tolerância a compostos inibidores presentes nos hidrolisados, como aqueles citados anteriormente neste trabalho. Elas são em geral sensíveis às altas concentrações de etanol e a meios de cultivo com pH ácido, requerendo muitas vezes condições microaeróbias para a eficiente fermentação e produção de etanol, além disso, nem sempre o etanol é o principal produto obtido por elas (Hahn-Hägerdal et al., 2001; 2007; Kuhad et al., 2011).

Para possibilitar que os principais açúcares presentes na biomassa possam ser fermentados com alto rendimento, diversos pesquisadores têm sugerido o emprego da tecnologia do DNA recombinante em *S. cerevisiae* como a melhor alternativa para a obtenção de um microrganismo com as características ideais para a produção de etanol de segunda geração (Matsushika et al., 2009a).

Se *S. cerevisiae* for capaz de fermentar os açúcares presentes na porção celulósica e hemicelulósica da biomassa com rendimento de $\approx 90\%$ (próximo àquele obtido para o etanol de primeira geração no Brasil), calcula-se que isso promoveria um ganho de mais de 50% na quantidade de etanol obtido por tonelada de cana-de-açúcar (Pessoa-jr et al., 2005; Van Maris et al., 2006). Aliado a isso, o emprego desta biomassa poderia contribuir para minimizar os problemas causados pelo incorreto descarte destes resíduos, possibilitando uma melhora da relação combustível/área plantada, o que indiretamente reduziria a

demanda de terra para o cultivo de cana-de-açúcar (Caspeta et al., 2013; Furlan et al., 2012; Soccol et al., 2010).

2.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LEVEDURAS *Spathaspora arborariae* e *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são microrganismos eucariontes que vivem como saprófitos ou parasitas. Normalmente são encontradas na natureza associados a vegetais, insetos, húmus e outros substratos. As leveduras geralmente são encontradas como um organismo unicelular diplóide que se reproduz assexuadamente por brotamento. De modo geral, as leveduras preferem usar glicose, frutose ou manose, porém são capazes de crescer em uma grande variedade de fontes de carbono, podendo ser encontradas em diversos ambientes (Landry et al., 2006).

As leveduras do gênero *Spathaspora* foram descobertas recentemente e aparecem geralmente associadas à material celulósico em decomposição ou a insetos que ocupam estes nichos ecológicos (Cadete et al., 2009; 2012; 2013; Nguyen et al., 2006). Linhagens da levedura *Spathaspora arborariae*, abordada neste trabalho, tem sido isoladas em amostras de madeira em decomposição em ecossistemas da Floresta Atlântica e do Cerrado Brasileiro. Esta levedura não apenas fermenta eficientemente xilose como também é capaz de fermentar hidrolisados lignocelulósicos de cana-de-açúcar (Cadete et al., 2009; 2012; 2013; Gonçalves, 2010). Leveduras com a habilidade de fermentar eficientemente xilose, tal como *S. arborariae*, são importantes fontes para o estudo de genes e da expressão de enzimas e transportadores de interesse em linhagens industriais de *S. cerevisiae* (Wohlbach et al., 2011).

Diferentemente de *S. arborariae*, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é conhecida e utilizada há milhares de anos pelo homem, seja na panificação, na produção de cervejas, vinhos, aguardentes e várias outras bebidas fermentadas (Landry et al., 2006). De fato, esta relação entre o homem e a levedura *S. cerevisiae* é tão antiga que arqueólogos tem encontrado evidências da produção de bebidas fermentadas na China 7000 anos AC (McGovern et al., 2004) e vinho no Irã e Egito há 6000 anos AC e 3000 anos AC, respectivamente (Cavaliere et al. 2003; McGovern et al., 1997). Por conseguinte este microrganismo sofreu grande influência das tecnologias empregadas pelo homem através da história (Legras et al., 2007). Uma linhagem desta levedura (a cepa S288C) foi ainda o primeiro genoma eucariota sequenciado (Goffeau et al., 1996).

Na indústria, boa parte do sucesso da levedura *S. cerevisiae* é devido à sua alta capacidade fermentativa em elevadas concentrações de açúcar, mesmo na presença de oxigênio, resultando em uma produção rápida de etanol. Esta característica ajudou a tornar esta levedura o principal microrganismo empregado na produção de etanol no Brasil (Amorin et al., 2011; Andrietta et al., 2007). As linhagens industriais apresentam, além das características descritas acima, outras características tais como a manutenção da viabilidade e vitalidade celular ao longo de vários ciclos fermentativos, adaptação ao ambiente industrial com alto teor alcoólico, variações extremas de pH e temperatura e competição com outros microrganismos que contaminam o processo fermentativo (Amorin et al., 2011; Della Bianca et al., 2013).

Além das vantagens fisiológicas descritas acima, as leveduras industriais apresentam também menor suscetibilidade a mutações letais quando comparadas às linhagens de laboratório, esta característica deve-se ao fato de que ao contrário das linhagens de laboratório que são haplóides, as linhagens industriais podem ser encontradas também na forma diplóide ou ainda tetrapóide. Nestes organismos diplóides ou tetraplóides a vantagem é conferida pela maior estabilidade que um maior número de cópias de um mesmo gene pode conferir, pois caso um gene sofra uma mutação que o impeça de expressar uma proteína funcional, outra cópia desse gene, se presente no genoma, poderá realizar esta função (Amorin et al., 2011; Andrietta et al., 2007; Basso et al., 2008; Oreb et al., 2012).

Dentre as leveduras industriais a linhagem CAT1 é considerada uma das linhagens de maior sucesso empregadas atualmente por usinas de etanol no Brasil. Esta linhagem foi selecionada nos anos 1990 a partir de processos industriais (fermentações em batelada alimentada e fermentações contínuas) através de um projeto de seleção de leveduras (Basso et al., 2008). Este microrganismo diplóide exibe notável dominância e persistência sobre outras linhagens durante processos fermentativos, apresentando características evolutivas fundamentais quando comparado com linhagens de laboratório (Amorin et al., 2011; Stambuk et al., 2009). Além disso, CAT1 é considerada uma das melhores linhagens para a expressão de genes exógenos de importância industrial (Amorin et al., 2011).

A linhagem CAT1 teve seu genoma recentemente sequenciado por Babrzadeh e colaboradores (2012), com isto pôde-se observar que alguns genes apresentavam mais de uma cópia em seu genoma, como por exemplo, os genes relacionados ao metabolismo das vitaminas B1 e B6, o que em parte, ajuda a explicar o seu sucesso em meios pobres

nestes nutrientes, como nos mostos de fermentação (Stambuk et al., 2009; Babrzadeh et al., 2012). No entanto, o que faz desta linhagem tão bem adaptada às rigorosas condições da usina ou ainda, que características que conferem a determinadas linhagens industriais maior dominância e persistência em relação a outras, são questões ainda não totalmente compreendidas (Della Bianca et al., 2013).

Neste sentido, o uso de linhagens industriais, bem adaptadas ao processo de produção de etanol de primeira geração no Brasil, pode ser considerado um passo a frente além do uso de linhagens de laboratório apenas. Isto deve ao fato de que as linhagens de laboratório geralmente não são capazes de sobreviver ou adaptar-se às condições estressantes do processo industrial de fermentação alcoólica, sendo destinadas ao insucesso quando introduzidas no processo fermentativo industrial com ciclos de células e tratamento ácido (Amorin et al., 2011; Brown et al., 2013). Além disso, as linhagens de laboratório não possuem habilidade para competir com linhagens selvagens de *Saccharomyces*, sendo nestas circunstâncias, rapidamente substituídas por outras linhagens mais adaptadas (Amorin et al., 2011; Basso et al., 2008; Brown et al., 2013; Della Bianca et al., 2013).

2.4 UTILIZAÇÃO DE AÇÚCARES POR *Saccharomyces cerevisiae*

2.4.1 Utilização de Sacarose

A sacarose é um dissacarídeo formado por uma molécula de α -D-glicose e outra de β -D-frutose, ligados por meio de uma ligação glicosídica com conformação O- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fructofuranosídeo. Este tipo de ligação confere à sacarose a possibilidade de ser hidrolisada tanto por α -D-glicosidases quanto por β -D-frutosidases. Na levedura *S. cerevisiae* a hidrólise da sacarose pode ser realizada por duas enzimas diferentes: a invertase (β -D-fructofuranosídeo fructohidrolase, EC 3.2.1.26) que é capaz de reconhecer a ligação “ β -D-fructofuranosídeo”, e a maltase (α -glicosidase, EC 3.2.1.20) que é capaz de reconhecer a ligação “O- α -D-glucopiranosil” (Badotti et al., 2008).

As células de *S. cerevisiae* apresentam dois tipos de invertase, uma forma extracelular (periplasmática) e outra intracelular, traduzidas a partir dos genes *SUC*. A forma extracelular desta enzima é codificada por um transcrito maior com aproximadamente 1900 nucleotídeos contendo uma sequência de nucleotídeos que codifica a um peptídeo sinal (20 aminoácidos), responsável por direcionar a secreção da proteína para o espaço periplasmático. A forma intracelular, por sua vez,

é codificada por um transcrito menor contendo aproximadamente 1800 nucleotídeos, sem a sequência que codifica para o peptídeo sinal, de modo que a proteína obtida deste transcrito menor não seja exportada para o espaço periplasmático. Ambas as formas da invertase possuem o mesmo pH ótimo (4,6-5,0), a mesma temperatura ótima de atividade (35-50° C) e a mesma afinidade ($K_m \approx 25\text{mM}$) pela sacarose (Andjelkovic et al., 2010; Gascón et al., 1968). Ambas as proteínas possuem 532 aminoácidos, mas massas moleculares diferentes: próximo de 135 kDa para a forma intracelular e valores superiores a 270 kDa para a invertase extracelular, que por sua vez pode formar complexos com massa superior a 800 kDa. A diferença na massa molecular se deve às glicosilações a que é submetida a forma extracelular da invertase, que, no entanto, não interferem na atividade hidrolítica da enzima (Alvarado et al., 1990; Arruda e Vitolo, 1999; Reddy et al., 1988).

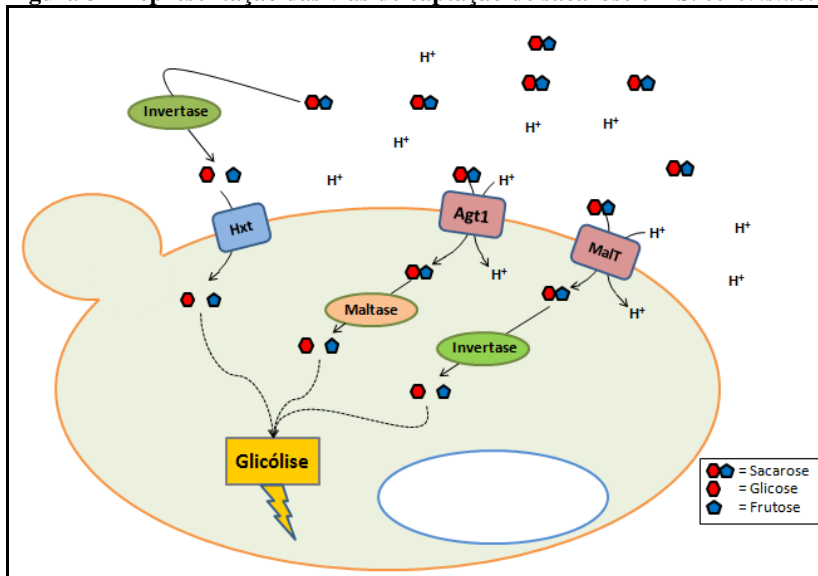
A transcrição das duas formas da invertase é regulada independentemente. Enquanto a expressão da forma intracelular da invertase ocorre em baixos níveis e de forma constitutiva, sem sofrer repressão por fontes de carbono disponíveis no meio, a expressão da invertase periplasmática ocorre de forma induzida, sendo reprimida em altas concentrações de diversos açúcares tais como glicose, frutose, manose e xilose (Echegaray et al., 2000; Mwesigye e Barford, 1996; Özcan et al., 1997; Reddy et al., 1988).

Após a hidrólise extracelular da sacarose pela invertase, os monômeros deste dissacarídeo (glicose e frutose) serão transportados para dentro da célula por transportadores de hexose codificados pelos genes da família *HXT* (*HXT1-HXT17* e *GAL2*) e então metabolizados através da via glicolítica (Lagunas, 1993), enquanto que a invertase intracelular hidrolisa a sacarose após o transporte desta molécula íntegra para o interior da célula (Figura 3). Neste último caso o processo ocorre através do co-transporte com prótons H^+ com alta afinidade pela permease codificado pelo gene *AGT1*, e com baixa afinidade pelos transportadores codificados pelos genes *MALx1*. A sacarose é então hidrolisada internamente pela maltase ou pela invertase intracelular (Badotti et al, 2006; 2008).

Embora em cultivos de *S. cerevisiae* em meio contendo sacarose a hidrólise deste açúcar seja realizada quase que exclusivamente de forma extracelular (Batista et al., 2004; Carlson e Botstein, 1982), este tipo de hidrólise nem sempre é vantajoso para a levedura, pois resultará na liberação de grande quantidade de glicose e frutose no meio, permitindo o crescimento de leveduras que não possuem invertase, inclusive linhagens contaminantes. Além de provocar alterações na

expressão gênica das células de *S. cerevisiae* devido à alterações no equilíbrio osmótico do meio, ocasionado pelas altas concentrações de glicose e frutose geradas (Greig e Travisano, 2004; Verstrepen et al., 2004).

Figura 3 - Representação das vias de captação de sacarose em *S. cerevisiae*.



FONTE: Este trabalho.

A liberação de frutose extracelularmente gera ainda outros problemas para o processo industrial devido à relativa menor velocidade de consumo de frutose por *S. cerevisiae*, quando comparado aos outros açúcares utilizados por esta levedura na indústria, podendo resultar em acúmulo de açúcar ao final do processo e consequente perda de produtividade (Badotti et al., 2008). Neste sentido, Basso e colaboradores (2011) constataram que a expressão constitutiva da forma intracelular da invertase (sob o domínio do promotor *ADHI*), aliada a não expressão da forma extracelular desta invertase (resultando em uma linhagem *iSUC2*) e elevada expressão da permease codificada pelo gene *AGT1* (obtido através de evolução em quimiostato) resultaram em uma linhagem com produção de etanol 11% superior quando comparada a linhagem isogênica *SUC2*. Müller (2013) utilizando estratégia semelhante construiu a linhagem *iSUC2* GMY08, isogênica à linhagem industrial CAT1. A linhagem GMY08 apresenta alta capacidade

fermentativa de sacarose com reduzido acúmulo extracelular de glicose e frutose, quando comparada a CAT1.

2.4.2 Utilização de xilose

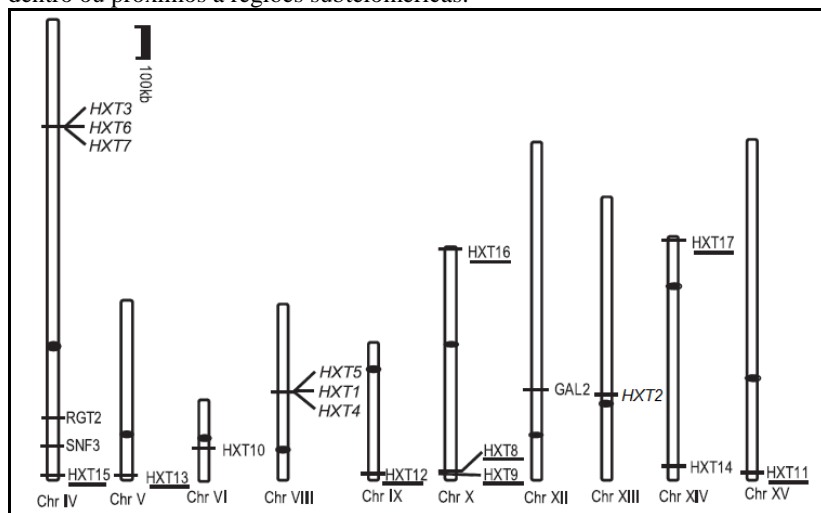
O primeiro passo para a metabolização da xilose, assim como o de qualquer outro açúcar, envolve primeiramente a captação deste açúcar para o interior da célula (Lagunas et al., 1993). Devido ao fato de *S. cerevisiae* não fermenta naturalmente xilose, ela carece de transportadores específicos para esta pentose. Apesar disso *S. cerevisiae* é capaz de transportar xilose, embora com baixa eficiência através de transportadores de hexose. O genoma destas leveduras contém uma família de 20 genes identificados como responsáveis pela captação de hexoses (Boles e Hollenberg 1997; Oreb et al., 2012; Saloheimo et al., 2007). Dentre estes 20 genes, 17 codificam para transportadores de hexoses (*HXT1-HXT17*), no entanto, sob condições normais somente sete destes genes (*HXT1-HXT7*) são necessários para permitir a captação de glicose, outras hexoses (Conant e Wolfe, 2007; Elbing et al., 2004; Lin e Li, 2011) e também xilose (Gardonyi e Hahn-Hagerdal, 2003; Wahlbom et al., 2003; Young et al., 2010). Dois outros genes (*SNF3* e *RGT2*) codificam para sensores de glicose e um (*GAL2*) codifica para uma permease responsável pelo transporte de galactose (Boles e Hollenberg, 1997).

Entre os genes *HXT* de maior relevância, *HXT1* e *HXT3-HXT7* compartilham estrutura muito semelhante entre si, de modo que recentemente Lin e Li (2011) sugeriram que o grupo formado por *HXT3*, *HXT6* e *HXT7* (Cromossomo IV; Figura 4) e o grupo formado por *HXT5*, *HXT1* e *HXT4* (Cromossomo VIII; Figura 4) foram provavelmente fruto de uma duplicação segmental ou duplicados quando todo o genoma de *S. cerevisiae* sofreu duplicação (Kellis et al., 2004).

A duplicação genômica tem sido proposta como um vantajoso passo para a inovação evolucionária, visto que genes duplicados podem suprir material genético necessário para a emergência de novas demandas funcionais da célula impostas pelas forças da mutação e da seleção natural. Tais duplicações podem envolver genes, segmentos do genoma ou genomas inteiros (Kellis et al., 2004). Um número variado de cópias do gene *SUC2*, por exemplo, (gene este visto na seção anterior), tem sido encontrados em linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de diferentes ambientes. Uma simples cópia do gene *SUC2* tem sido encontrada em linhagens que ocupam ambientes com glicose e frutose, mas sem sacarose enquanto que duas ou três cópias deste gene têm sido

encontradas em algumas linhagens que ocupam ambientes contendo sacarose (Naumov et al., 1995). De maneira surpreendente, no entanto em algumas linhagens industriais brasileiras tais como CAT1, não é observada a amplificação no número de cópias do gene *SUC2* (Della Bianca et al., 2013; Stambuk et al., 2009).

Figura 4 - Localização cromossômica dos 20 genes *HXT* de *S. cerevisiae*. Em itálico são mostrados os sete genes com maior importância no transporte de glicose e xilose. Sublinhados são mostrados os oito genes *HXT* localizados dentro ou próximos a regiões subtelo-méricas.



FONTE: Modificado de Lin e Li (2011).

No caso dos genes *HXT*, oito genes que codificam para transportadores de hexose em *S. cerevisiae* estão localizados em regiões dentro de 30 kb da porção final de vários cromossomos (Figura 4) compartilhando padrões de evolução muito semelhantes. Genes subtelo-méricos, como estes oito genes *HXT* citados, são mais propensos a eventos de deleções e duplicações. Na figura 4 é possível observar os genes *HXT12* e *HXT9*, localizados em regiões subtelo-méricas dos cromossomos IX e X respectivamente. Estes cromossomos (IX e X) notadamente possuem 99% de similaridade nas primeiras 21 kb de sequência de suas porções teloméricas, reforçando indícios para a teoria de duplicação de fragmentos de porções subtelo-méricas (Lin e Li, 2011).

É sabido que eventos de perda de DNA na região telomérica durante a proliferação celular podem ocorrer. Estes eventos de perda de

DNA estão associados à incapacidade da enzima DNA polimerase de replicar o final da molécula de DNA. Neste sentido, um importante mecanismo para manutenção do tamanho do comprimento da região telomérica é através da recombinação intercromossômica: A região final 3' de um cromossomo invade a região de um segundo cromossomo e usa esta região como molde para o alongamento telomérico (Kass-Eisler e Greider, 2000). Como consequência, este processo leva à ocorrência de regiões subteloméricas repetidas e idênticas. O processo de encurtamento e alongamento dos telômeros pode ter contribuído para o nascimento e morte de genes transportadores com alta similaridade em regiões subteloméricas como os genes *HXT* abordados neste trabalho (Lin e Li, 2011).

Com relação à atividade de transporte, os sete transportadores codificados pelos genes *HXT* (*HXT1-HXT7*), embora relacionados evolutivamente, exibem diferentes afinidades pelos diversos substratos bem como perfis de expressão distintos entre si de acordo com a presença e concentração de açúcares (sobretudo glicose) no meio (Boles e Hollenberg, 1997; Diderich et al., 1999; Kruckeberg, 1996; Reifemberger et al., 1995; 1997).

Dentro deste grupo de sete transportadores, àqueles codificados por *HXT1* e *HXT3* são considerados sistemas de baixa afinidade por glicose. Embora a expressão de ambos seja induzida por glicose, *HXT1* somente será expresso quando a glicose atingir níveis altos ($\approx 1\%$ ou mais), *HXT3*, no entanto, tem expressão relativamente constante (Özcan e Johnston, 1995). Os sistemas codificados pelos genes *HXT2*, *HXT4* e *HXT5* são descritos como sistemas de média afinidade por glicose, sendo que aquele codificado por *HXT2* é mais ativo em baixas concentrações deste açúcar ($\approx 0,2\%$). Ambos os genes *HXT2* e *HXT4* são reprimidos em altas concentrações de glicose, enquanto que *HXT5* é considerado um transportador de reserva cuja expressão é iniciada na exaustão de glicose no meio (Bertilsson et al., 2008; Diderich et al., 2001; Özcan e Johnston, 1995).

Com relação aos transportadores codificados por *HXT6* e *HXT7*, estes são muito semelhantes entre si, de fato as sequências que codificam para estes transportadores são praticamente idênticas (ambas sequências tem 1713 pb com 99,9% de similaridade; <http://www.yeastgenome.org>), podendo ocorrer ainda como um único gene em algumas linhagens de levedura (Reifemberger et al., 1995). Ambos transportadores codificados por *HXT6* e *HXT7* são altamente induzidos sob baixa concentração de glicose, na ausência deste açúcar ou mesmo na presença de fontes de carbono não fermentáveis tais como

glicerol ou etanol, no entanto, são também fortemente reprimidos por altas concentrações de glicose, podendo inclusive sofrer degradação no vacúolo (Diderich et al., 1999; Kim et al., 2013a).

Em ensaios de crescimento por leveduras expressando ou sobre-expressando genes *HXT*, o transportador codificado por *HXT7*, juntamente com os transportadores codificados por *HXT2*, *HXT4* e *HXT5*, têm sido descritos até o presente momento como àqueles sistemas de maior importância, dentro da família de genes *HXT*, para a eficiente captação de xilose por *S. cerevisiae* (Bertilsson et al., 2008; Hamacher et al., 2002; Sedlak e Ho, 2004).

No entanto, devido à preferência pelo transporte de glicose, o transporte de xilose geralmente é inibido pela competição com glicose, visto que em *S. cerevisiae* a xilose é transportada pelos sistemas codificados pelos genes *HXT* com afinidade até cem vezes inferior àquela exibida por glicose, sendo que em meios contendo ambos os açúcares o consumo de xilose só tem início após os níveis de hexoses diminuírem dramaticamente (Bertilsson et al., 2008; Hamacher et al., 2002; Jojima et al., 2010; Matsushika e Sawayama, 2011; Saloheimo et al., 2007; Subtil e Boles, 2012). De fato, em certo ponto a glicose tem efeito negativo através da competição junto à xilose pelos transportadores de hexose, no entanto, quando em concentrações adequadas, a glicose é descrita como capaz de auxiliar na metabolização de xilose pela célula (Bertilsson et al., 2008).

Embora qualquer um dos 17 transportadores pertencentes à família de genes *HXT* permita a captação de glicose pelas células de levedura (Wieczorke et al., 1999), uma levedura *S. cerevisiae* deletada para os genes *HXT1-HXT7* e *GAL2* (Linhagem *hxt-null* KY73, Kruckeberg et al., 1999; Batista et al., 2004) é incapaz de crescer, consumir ou fermentar glicose eficientemente. Deste modo, em linhagens *hxt-null* sobre-expressando as enzimas para o metabolismo de xilose, o consumo de xilose irá depender da expressão do transportador de açúcar. Estas características tornam esta linhagem (linhagem *hxt-null* expressando os genes para metabolismo de xilose) extremamente interessante, se empregada para a expressão individual de transportadores endógenos ou exógenos de xilose em *S. cerevisiae*, ou na triagem de novos transportadores a partir de bibliotecas genômicas de leveduras com habilidade de consumir este açúcar (Hamacher et al., 2002; Jeffries et al., 2007; Saloheimo et al., 2007; Sedlak e Ho, 2004; Young et al., 2011; 2012)

Embora importantes avanços tenham sido feitos no desenvolvimento de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* com

habilidade de fermentar xilose, a velocidade de consumo deste açúcar ainda precisa ser otimizada, sendo a velocidade de utilização do açúcar uma das características mais importantes no processo industrial (Stambuk et al., 2008). Neste sentido, a expressão de genes heterólogos de espécies relacionadas à *S. cerevisiae* aparece como uma alternativa promissora. Transportadores codificados pelos genes *SUT1* de *S. stipitis* e *GXF1* e *GXF2* de *Candida intermédia* já foram expressos com sucesso em *S. cerevisiae* (Katahira et al., 2006; Leandro et al., 2008). No entanto, apenas alguns poucos transportadores heterólogos de xilose tem sido caracterizados em *S. cerevisiae* (Leandro et al., 2006; 2008; Wieczorke et al., 2003). Por exemplo, uma recente pesquisa com mais 23 transportadores heterólogos conhecidos de sete diferentes organismos revelou que somente cinco destas permeases permitiram a utilização de xilose por células de *S. cerevisiae* (Young et al., 2011).

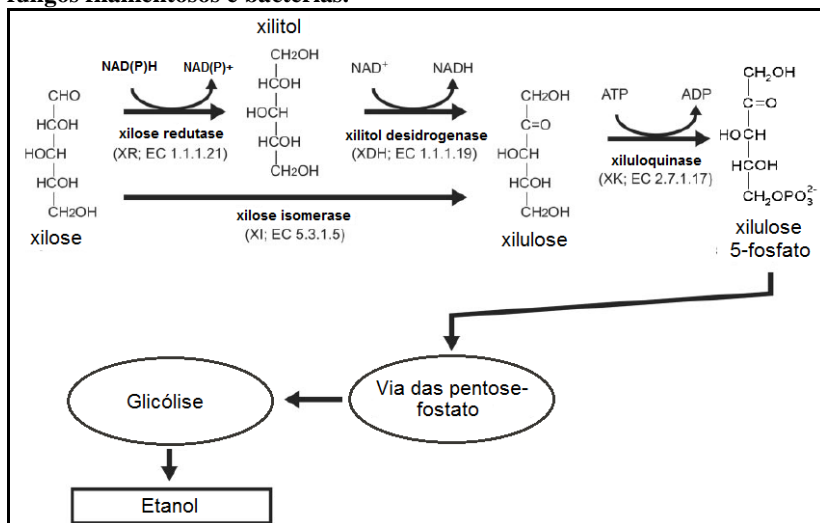
Desta forma, até o momento não há relato de transportadores heterólogos funcionalmente expressos em *S. cerevisiae* que sejam capazes de transportar apenas xilose ou que não sejam reprimidos por glicose (Katahira et al., 2008; Kuhad et al., 2011; Leandro et al., 2006; Runquist et al., 2010).

Para contornar o problema oferecido pela baixa afinidade dos transportadores codificados por genes *HXT* por xilose, aliado a baixa expressão destes genes quando em meio contendo esta pentose, alguns trabalhos têm sugerido a sobre-expressão dos genes *HXT*, como alternativa para permitir a eficiente captação de xilose pela célula e assim, incrementar a capacidade fermentativa das células (Hamacher et al., 2002; Saloheimo et al., 2007; Subtil e Boles, 2012).

Após o transporte da xilose para o interior da célula a próxima etapa é a metabolização deste açúcar. Visto que linhagens nativas de *S. cerevisiae* não são capazes de fermentar xilose, a principal estratégia para a geração de linhagens de *S. cerevisiae* capazes de fermentar xilose é através da introdução dos genes envolvidos na metabolização de xilose a partir de outros organismos. Em leveduras fermentadoras de xilose como *S. stipitis*, a xilose é convertida em xilulose pela ação sequencial de duas oxidoreductases (Figura 5). Primeiro, a enzima xilose redutase NAD(P)H-dependente (XR; EC 1.1.1.21) cataliza a redução do grupo carbonil C1 da xilose com a obtenção de xilitol como produto. O xilitol é então oxidado pela enzima xilitol desidrogenase NAD⁺-dependente (XDH; EC 1.1.1.9) em xilulose. A xilulose, diferentemente da xilose, pode ser utilizada naturalmente por *S. cerevisiae* através da ação da enzima xilulocinase (XK; EC 2.7.1.17) que fosforila xilulose em

xilulose 5-fosfato que será metabolizada através da via das pentoses-fostato e glicólise até etanol.

Figura 5 – Esquema do metabolismo de xilose até etanol por leveduras, fungos filamentosos e bactérias.



FONTE: Modificado de Watanabe et al., 2005.

Embora, *S. cerevisiae* não seja capaz de utilizar xilose, estudos demonstram que esta levedura possui os genes que codificam para as enzimas XR e XDH em seu genoma (Richard et al., 1999; Träff et al., 2002). A incapacidade de metabolizar xilose desta levedura deve-se à baixa expressão dos genes que codificam para estas enzimas bem como a baixa atividade específica destas enzimas quando comparadas à XR e XDH de *S. stipitis*. Assim, mesmo a sobre-expressão destes genes não foi suficiente para possibilitar um eficiente crescimento em meio contendo xilose quando comparado a outras linhagem de *S. cerevisiae* transformadas com os genes *XYL1* (codificando para xilose redutase) e *XYL2* (codificando para xilitol desidrogenase) de *S. stipitis* (Toivari et al., 2004). Linhagens de *S. cerevisiae* transformadas com os genes *XYL1* e *XYL2* adquirem a habilidade de fermentar xilose (Eliasson et al., 2000b; Kötter e Ciriacy, 1993).

A eficiente fermentação de xilose em etanol pela via XR/XDH, no entanto enfrenta outros problemas, como a excreção de xilitol, caso outras fontes de carbono não sejam adicionadas ao meio a fim de possibilitar a co-metabolização destas fontes de carbono (Matsushika et

al., 2008c; Rizzi et al., 1989; Verduyn et al., 1985; Watanabe et al., 2005).

O acúmulo de xilitol em linhagens recombinantes é causado principalmente pelo desbalanço redox entre as enzimas XR e XDH que exibem especificidade por diferentes coenzimas. A enzima XR de algumas leveduras exibe uma estrita dependência pelo cofator NADPH, liberando NADP^+ , enquanto que outras leveduras podem apresentar atividade de XR tanto com NADPH quanto com NADH, liberando desta forma NADP^+ ou NAD^+ , respectivamente. O próximo passo como vimos, envolve a enzima XDH, que utiliza como cofator estritamente NAD^+ , liberando NADH. A estrita especificidade da enzima XDH por NAD^+ aliado à preferência que algumas XR exibem por NADPH, como ocorre com a XR de *S. stiptis*, tem sido a causa deste desbalanço de cofatores, resultando em acúmulo de xilitol (Lee, 1998; Ostergaard et al., 2000; Rizzi, et al., 1989) visto que *S. cerevisiae* não possui uma transhidrogenase para converter NADH em NADPH (Bruinenberg et al., 1985), sendo que mesmo a expressão heteróloga de transhidrogenase em *S. cerevisiae*, embora diminua o acúmulo de xilitol, leva em geral a um alto acúmulo de glicerol (Jeppsson et al., 2003).

A enzima XR da levedura *Candida parapsilosis* foi a primeira XR relatada com preferência pelo NADH (Lee et al., 2003), esta enzima carrega uma arginina no lugar da lisina no motivo Ile-Pro-Lys-Ser, que é conservado entre as XR dependentes de NADPH (Lee, 1998). Bengtsson e colaboradores (2009) alcançaram, por técnica de mutagênese sítio dirigida, a substituição da lisina pela arginina (mutante K270R) da XR de *S. stiptis*, mimetizando assim a XR da levedura *C. parapsilosis*, proporcionando desta forma uma maior utilização do cofator NADH, comparada com a enzima normal de *S. stiptis*, acarretando em mais NAD^+ disponível para a reação da XDH, e com isso maior consumo de xilose e maior produção de etanol, além de menor produção de glicerol.

Outra levedura, *Spathaspora passalidarum* foi recentemente mostrada como sendo capaz de converter xilose em etanol em condições anaeróbicas com eficiência superior àquela observada em *S. stiptis*, com ainda um menor acúmulo do intermediário xilitol (Hou, 2012). Esta levedura também foi capaz, em condições aeróbicas, de consumir simultaneamente xilose e glicose, além de exibir uma XR com afinidade maior por NADH quando comparado a NADPH.

S. stiptis é um dos poucos tipos de leveduras que possui XR com especificidade tanto pelo cofator NADPH quanto por NADH (embora exiba preferência por NADPH), o que permite que esta levedura excrete

menos xilitol durante a fermentação de xilose. No entanto, uma considerável quantidade de xilitol é acumulada em *S. cerevisiae* quando expressando XR e XDH de *S. stipitis*, resultando em redução no rendimento de etanol (Kötter e Ciriacy, 1993; Matsushika et al., 2009a). Neste sentido o uso em linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* de uma XR que exibisse preferência por NADH, poderia aliviar este desbalanço de cofatores (Hahn-Hägerdal et al., 1994; Jeffries, 2006). Alternativamente o uso de XDHs mutantes (obtidas por mutagênese sítio dirigida) dependentes de NADP⁺ também tem sido sugerido para equilibrar o balanço redox desta via e assim diminuir o acúmulo de xilitol (Matsushika et al., 2008b; 2009a; Watanabe et al., 2005).

Uma segunda via para a metabolização de xilose em xilulose pode visto na Figura 5. Nesta via, através da ação da enzima xilose isomerase (XI; EC 5.3.1.5) ocorre a isomerização da xilose diretamente para xilulose. Esta via metabólica, que geralmente é encontrada em bactérias e em alguns fungos filamentosos, elimina o problema do desbalanço de cofatores e o acúmulo de xilitol, visto anteriormente para a via XR/XDH. Um grande número de genes bacterianos codificando para XI tem sido expressos heterologicamente em *S. cerevisiae*, incluindo *XYLA* de *Escherichia coli* (Sarthy et al., 1987), *Clostridium thermosulfurogenes* (Moes et al., 1996), *Bacillus subtilis* ou *Actinoplanes missouriensis* (Amore et al., 1989), *Thermus thermophilus* (Walfridsson et al., 1996) e *Streptomyces rubiginosus* (Gardonyi e Hahn-Hägerdal, 2003). No entanto, todas estas tentativas de se obter uma XI funcional em *S. cerevisiae* falharam, até que finalmente pesquisadores conseguiram clonar a XI a partir do fungo anaeróbio do gênero *Piromyces* (Kuyper et al., 2003; 2005; Maris et al., 2007) e *Orpinomyces* (Madhavan et al., 2009) e expressar esta enzima funcionalmente em *S. cerevisiae* com altos níveis. Posteriormente Brat e colaboradores (2009) conseguiram expressar uma XI bacteriana a partir de *Clostridium phytofermentans* e Vilela e colaboradores (2013) mais recentemente expressaram em *S. cerevisiae* uma XI a partir da bactéria *Burkholderia cenocepacia*.

A comparação da habilidade fermentativa de linhagens de *S. cerevisiae* expressando XI ou XR/XDH tem mostrado que linhagens expressando XI produzem menos xilitol e mais etanol quando comparadas às linhagens expressando as enzimas XR/XDH (Karhumaa et al., 2007b). No entanto, a velocidade de fermentação de xilose (velocidade de consumo da xilose e velocidade de produção de etanol) é muito lenta em linhagens expressando XI. Além disso, XI pode ser somente expressa sob o domínio de promotores fortes e em plasmídeos

multicópia, indicando que a atividade específica destas XIs é insuficiente (revisto por Matsushika et al., 2009b).

Após a ação das enzimas XR e XDH ou da enzima XI o próximo passo é a fosforilação da xilulose em xilulose 5-fosfato pela enzima xilulocinase (XK). Alguns trabalhos têm demonstrado que embora *S. cerevisiae* possa metabolizar a xilulose, esta metabolização ocorre de maneira bastante lenta devido à baixa expressão da xilulocinase nesta levedura (Deng e Ho, 1990; Eliasson et al., 2000a). O nível adequado de expressão da XK, no entanto, ainda esta sob debate.

Jin e colaboradores (2003) mostraram que a sobre-expressão do gene *XYL3* que codifica para XK de *S. stipitis*, aliado à sobre-expressão dos genes *XYL1* (XR) e *XYL2* (XDH) em *S. cerevisiae*, inibiu o crescimento celular em meio contendo xilose, enquanto que a expressão de *XYL3* em níveis moderados possibilitou o crescimento de *S. cerevisiae* nesta fonte de carbono. Em contraste, nenhum efeito inibitório foi encontrado por outros autores com a sobre-expressão de *XKS1* (XK de *S. cerevisiae*; Richard et al., 2000; Toivari et al., 2001), sendo que a enzima XK de *S. stipitis* possui maior atividade específica que a XK de *S. cerevisiae* (Jin et al., 2003). Em outro estudo Matsushika e Sawayama (2008a) observaram um aumento na produção de etanol e diminuição no acúmulo de xilitol em *S. cerevisiae* expressando as enzimas XK de *S. cerevisiae* (*XKS1*) com moderada atividade, e XR e XDH de *S. stipitis* com alta atividade, sem nenhum efeito inibitório para o crescimento em xilose por esta *S. cerevisiae* recombinante.

Alguns pesquisadores têm sugerido ainda que o fluxo de xilulose pela via das pentose-fosfato (PPP – do inglês *Pentose phosphate pathway*) seria insuficiente para a eficiente utilização de xilose em *S. cerevisiae* quando comparado à outras leveduras que naturalmente fermentam xilose (Fiaux et al., 2003), causando desta forma o acúmulo de metabólitos da via PPP (Kötter e Ciriacy, 1993; Kuyper et al., 2003; Senac e Hahn-Hägerdal, 1991; Zaldivar et al., 2002). Neste sentido a sobre-expressão de enzimas da fase não oxidativa da PPP tais como a transaldolase (EC 2.2.1.2), transquetolase (EC 2.2.1.1), ribulose-5-fosfato 3-epimerase (EC 5.1.3.1) e ribose-5-fosfato cetol-isomerase (EC 5.3.1.6) têm sido realizadas a fim de aumentar a atividade da via PPP durante a utilização de xilose em *S. cerevisiae* (Johansson e Hahn-Hägerdal, 2002; Karhumaa et al., 2005; Metzger e Hollenberg, 1994), sendo que a combinação da sobre-expressão destes genes que codificam para estas enzimas da via PPP e dos genes que codificam para XR e XDH contribuiu para o aumento do consumo de xilose. A otimização das enzimas da via PPP citadas acima deve portando ser considerada em

estudos futuros (Lu e Jeffries, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SEQUENCIAMENTO E ANOTAÇÃO DO GENOMA DA LEVEDURA FERMENTADORA DE D-XILOSE *Spathaspora arborariae*

Para analisar molecularmente o genoma da levedura fermentadora de D-xilose *Spathaspora arborariae* (Cadete et al., 2009), o DNA da linhagem HMD19.1A^T foi extraído das células utilizando o kit e colunas YeaStar (Zymo Research). Em colaboração com pesquisadores do Laboratório de Bioinformática, Unidade de Genômica Computacional Darcy Fontoura de Almeida do Laboratório Nacional de Computação Científica (Petrópolis, RJ), e do Laboratório Multiusuário de Bioinformática, Embrapa Informática Agropecuária (Campinas, SP). O sequenciamento do DNA foi realizado através da plataforma 454 (Roche Diagnostics, Branford, CT, USA), que utiliza a técnica de pirosequenciamento (Margulies et al., 2005). Foram obtidas 915.700 leituras (657.682 delas nos dois extremos de insertos de 3 Kb) totalizando 291.670.584 nucleotídeos de sequência a partir do DNA genômico da levedura. A seguir estas sequências foram montadas utilizando-se o software Newbler (Margulies et al., 2005) em 439 “contigs”, que posteriormente foram agrupadas em 41 “scaffolds”, totalizando um genoma final de 12.708.019 pares de bases, correspondentes aos 8 cromossomas desta levedura. As anotações do genoma foram feitas com o software MAKER2 (Holt e Yandell, 2011) e para a construção da árvore filogenética foram utilizados os programas ClustalW (disponível em [www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/ index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html)) e Dendroscope 2.3 (Huson et al., 2007).

3.2 CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZADAS, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Para o presente estudo foram utilizadas linhagens de laboratório e linhagens industriais de *S. cerevisiae*, descritas na Tabela 1. As linhagens provenientes do banco de linhagens *Open Biosystem* são referidas ao longo desta tese como linhagens *hxt-knockout* por se tratarem de linhagens deletadas para algum dos genes *HXT* (*hxt1Δ*, *hxt2Δ*, *hxt3Δ*, *hxt4Δ* ou *hxt5Δ*), enquanto que a linhagem DLG-K1 ou sua linhagem parental KY73 são referidas como linhagens *hxt-null*, justamente por não apresentarem os principais transportadores de hexose

(*hxt1-hxt7Δ* e *gal2Δ*) e, portanto serem incapazes de crescer em meios contendo glicose ou xilose (Batista et al., 2004; Saloheimo et al., 2007).

A linhagem industrial CAT1 foi escolhida em 2011 pela bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial Marcela Purificação através de ensaios de crescimento em xilulose. Esta linhagem foi escolhida por apresentar crescimento em xilulose superior a diversas outras linhagens industriais também analisadas naquela ocasião. A linhagem CAT1 juntamente com a linhagem GMY08 (derivada da CAT1; Tabela 1), foram transformadas com os genes para metabolização de xilose, como descrito adiante. Embora naquela ocasião outras linhagens industriais tais como PE-2, VR-1 e UFPE-178 também tenham sido transformadas com os genes para metabolização de xilose, o desempenho de CAT1 e GMY08 foram superiores também em ensaios fermentando ou co-fermentando xilose. Desta forma foram utilizadas nesta tese as linhagens industriais CAT1 e GMY08 apenas.

Para os cultivos foram utilizados três tipos de meio: meio rico YP (1% de extrato de levedura e 2% de bacto-peptona), meio sintético completo (0,67% de base nitrogenada) ou meio sintético Drop-out (0,67% de base nitrogenada, acrescido de 0,192% de uracila Drop-out, contendo todos os aminoácidos requeridos e sem a base nitrogenada uracila). A estes meios foram adicionados 2% de maltose, glicose ou xilose como fonte de carbono. O pH do meio foi ajustado para 5,0 com HCL ou NaOH. Quando necessário foram adicionados ao meio 2% de bacto-agar, 0,5 mg/L de Aureobasidin A (Takara Bio, Kyoto, Japan) e/ou 200 mg/L de Geneticina (G418). Os meios foram esterilizados por calor húmido (autoclave a 120°C por 15 min.) ou por filtração com membranas de nitrocelulose com 0,22 µm de porosidade. Os crescimentos foram realizados à 30°C com agitação orbital (100 ou 160 RPM).

Para o cultivo de *Escherichia coli* DH5α foi utilizado meio Luria-Bertani (LB), pH 7,5 e temperatura de 37°C. Quando necessário, 100 mg/L de ampicilina e/ou 2% de bacto-agar foram adicionados ao meio de cultivo (Ausubel et al., 1992).

Tabela 1- Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas

Cepa	Genótipo ou descrição	Fonte ou referência
S288C	<i>MATa SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>	Mortimer e Johnston, 1986.
MA-B43	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0, AURI::pAUR-XKXDHXR</i>	Matsushika et al., 2012.
YHR094C (<i>hxt1Δ</i>)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ hxt1Δ::KanMX</i>	Open Biosystems
DLG-H1	Isogênica a YHR094C, mas <i>AURI::pAUR-XKXDHXR</i>	Este trabalho
YMR011W (<i>hxt2Δ</i>)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hxt2Δ::KanMX</i>	Open Biosystems
DLG-H2	Isogênica a YMR011W, mas <i>AURI::pAUR-XKXDHXR</i>	Este trabalho
YDR345C (<i>hxt3Δ</i>)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hxt3Δ::KanMX</i>	Open Biosystems
DLG-H3	Isogênica a YDR345C, mas <i>AURI::pAUR-XKXDHXR</i>	Este trabalho
YHR092C (<i>hxt4Δ</i>)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hxt4Δ::KanMX</i>	Open Biosystems
DLG-H4	Isogênica a YHR092C, mas <i>AURI::pAUR-XKXDHXR</i>	Este trabalho
YHR096C (<i>hxt5Δ</i>)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hxt5Δ::KanMX</i>	Open Biosystems
DLG-H5	Isogênica a YHR096C, mas <i>AURI::pAUR-XKXDHXR</i>	Este trabalho
KY73	<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</i>	Batista et al., 2004.
DLG-K1	Isogênica a KY73, mas <i>AURI::pAUR-XKXDHXR</i>	Este trabalho
DLG-K2C	Isogênica a KY73, mas <i>AURI::pAUR-101</i>	Este trabalho
CAT1	Linhagem diplóide para produção de etanol combustível – Isolada na usina VO Catanduva, São Paulo/ SP, em 1998/1999.	Basso et al., 2008.
MP-C5	Isogênica a CAT1, mas <i>AURI::pAUR-XKXDHXR</i>	Este trabalho
GMY08	Isogênica a CAT1, mas <i>loxP-KanMX-loxP P_{ADHI}::iSUC2 suc2::loxP-Ble^r-loxP P_{GPD}::AGT1</i>	Müller, 2013.
MP-G1	Isogênica a GMY08, mas <i>AURI::pAUR-XKXDHXR</i>	Este trabalho

FONTE: Este trabalho.

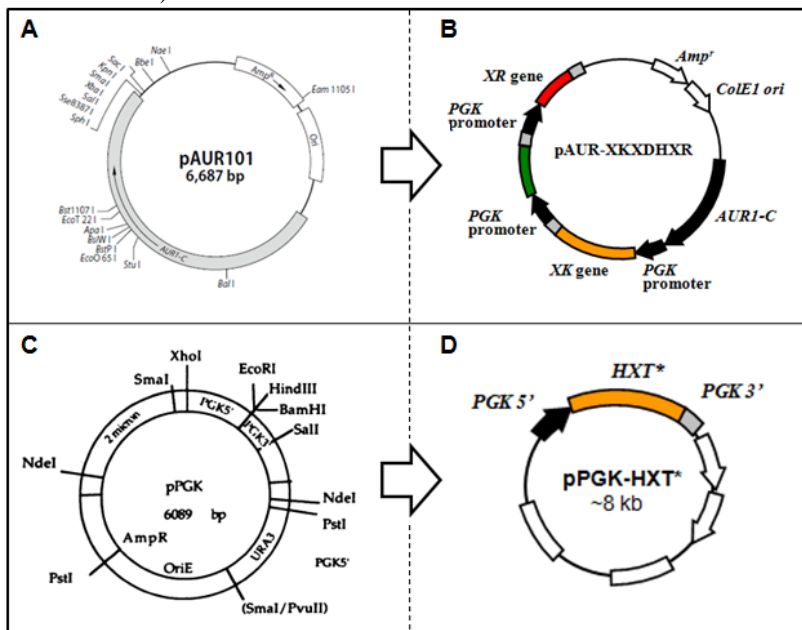
3.3 PLASMÍDEOS E INICIADORES UTILIZADOS

Os plasmídeos utilizados neste estudo encontram-se ilustrados na Figura 6 e listados na Tabela 2. O plasmídeo integrativo pAUR-101 (Takara Bio, Japan) foi utilizado neste trabalho como controle negativo, pois não carrega genes de interesse, exceto o gene que confere resistência ao antibiótico Aureobasidin A (gene *AURI-C*; Figura 6A). Este plasmídeo foi utilizado por Matsushika e colaboradores (2008c) para a construção do plasmídeo pAUR-KKXDHR (Figura 6B). Este último plasmídeo contém sequências que codificam para o promotor e terminador da enzima fosfofrutocinase (PFK) para a sobre-expressão dos genes *XYL1* (XR) e *XYL2* (XDH) de *S. stipitis*, e sobre-expressão do gene *XKS1* (XK) de *S. cerevisiae*. Este plasmídeo possui a habilidade de integrar-se cromossomicamente no *locus AURI* de *S. cerevisiae*, conferindo desta forma resistência ao antibiótico Aureobasidin A. Considerando-se que *S. cerevisiae* já possui em seu genoma o gene *XKS1*, a confirmação da presença do gene *XKS1* exógeno sobre-expresso (construção *PGK1p-XKS1*) nas linhagens transformadas foi realizada com os iniciadores PGKProF-SaI-F e XK-P-SQ-R (Tabela 3). Este par de iniciadores possui regiões homólogas ao início da região do promotor *PGK1p* e início do gene *XKS1* presente no plasmídeo pAUR-KKXDHR.

Para a amplificação dos genes *HXT1*, *HXT2*, *HXT5* e *HXT7* foi utilizado o DNA genômico obtido a partir da cepa de *S. cerevisiae* S288C utilizando-se o kit *MasterPure Yeast DNA Purification* (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA). Cada um dos genes *HXT* foi amplificado através de PCR utilizando-se os iniciadores listados na Tabela 3. A sequência dos iniciadores foi determinada com base na sequência dos genes a serem amplificados disponível no *Saccharomyces Genome Database* (www.yeastgenome.org) utilizando-se o mix completo para PCR contendo a enzima TAQ-DNA polimerase, *TAQ-Buffer-dNTP Primer star max Premium® mix* (Takara Bio, Kyoto, Japan).

Para a construção do plasmídeo pPGK-HXT1, o gene *HXT1* (fragmento contendo 1,7 kb) foi amplificado a partir do DNA genômico da cepa S288C com os iniciadores HXT1F e HXT1R (Tabela 3), através do uso dos iniciadores foi inserido um sítio de clivagem para a enzima *HindIII* em uma extremidade do fragmento e outro sítio para a enzima *BamHI* na extremidade oposta deste fragmento, desta forma o gene foi clonado nos sítios de clonagem correspondentes do plasmídeo pPGK (Figura 6C; Kang et al., 1990), previamente clivado pelas mesmas enzimas, dando origem ao plasmídeo pPGK-HXT1 (Figura 6D).

Figura 6 – Plasmídeos utilizados neste trabalho. Em “A” tem-se o plasmídeo pAUR-101, utilizado neste trabalho como plasmídeo controle e utilizado por Matsushika e colaboradores (2008c) para a construção do plasmídeo contendo os genes para metabolismo da xilose, como mostrado em “B”. Em “C” tem-se o plasmídeo pPGK utilizado neste trabalho para a construção dos plasmídeos mostrados em “D”, contendo por sua vez um dos genes *HXT* (*HXT1*, *HXT2*, *HXT5* ou *HXT7*).



FONTE: (A) Takara Bio, Japan; (B) Matsushika et al., 2008c; (C) Kang et al., 1990; (D) Este trabalho.

Tabela 2- Plasmídeos utilizados.

Plasmídeo	Genótipo relevante	Fonte ou referência
pAUR-101	<i>AUR1-C</i>	Takara Bio, Japan.
pAUR-XKXDHXR	<i>AUR1-C</i> [<i>PGK1_p</i> - <i>XKS1</i> - <i>PGK1_b</i> , <i>PGK1_p</i> - <i>XYL2</i> - <i>PGK1_b</i> , <i>PGK1_p</i> - <i>XYL1</i> - <i>PGK1_b</i>]	Matsushika et al., 2008c.
pPGK	<i>URA3</i> <i>PGK1_p</i> - <i>PGK1_i</i>	Kang et al., 1990.
pPGK-HXT1	<i>URA3</i> <i>PGK1_p</i> - <i>HXT1</i> - <i>PGK1_i</i>	Este Trabalho
pPGK-HXT2	<i>URA3</i> <i>PGK1_p</i> - <i>HXT2</i> - <i>PGK1_i</i>	Este Trabalho
pPGK-HXT5	<i>URA3</i> <i>PGK1_p</i> - <i>HXT5</i> - <i>PGK1_i</i>	Este Trabalho
pPGK-HXT7	<i>URA3</i> <i>PGK1_p</i> - <i>HXT7</i> - <i>PGK1_i</i>	Este Trabalho

FONTE: Este Trabalho.

O plasmídeo pPGK caracteriza-se por ser um plasmídeo do tipo *shuttle vector* multi-cópia contendo um promotor e um terminador PGK assim como o gene *URA3* utilizado como marcador de seleção. Utilizando-se a mesma estratégia foi conduzida a construção dos plasmídeos pPGK-HXT2 para a sobre-expressão do gene *HXT2* (fragmento contendo 1,6 kb e sítio de clivagem para *Bam*HI apenas), plasmídeo pPGK-HXT5 para a sobre expressão do gene *HXT5* (fragmento contendo 1,8 kb e sítios *Eco*RI–*Bam*HI), e o plasmídeo pPGK-HXT7 para a sobre-expressão do gene *HXT7* (fragmento contendo 1,7 kb e sítios *Eco*RI–*Bam*HI). A sequência de todos os genes clonados foi confirmada usando-se os iniciadores para sequenciamento listados na Tabela 3. As clonagens foram realizadas em *E. coli* DH5 α de acordo com Ausubel e colaboradores (1992). As transformações em *E. coli* DH5 α para construção e seleção dos plasmídeos foi realizado através de eletroporação (Micropulser Bio Rad Model 165-2100, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.4 TRANSFORMAÇÃO DAS LEVEDURAS

Para a transformação das linhagens com os plasmídeos pAUR-101 ou pAUR-XKXDHXR, esses plasmídeos foram previamente linearizados utilizando-se a enzima de restrição *Bsi*WI (Figura 7A), a fim de permitir sua entrada na célula bem como capacitá-los a se integrar cromossomicamente no *locus AURI* das linhagens selecionadas. A temperatura e tempo de reação para linearização dos plasmídeos foi de 55°C e 6 horas.

A transformação das leveduras com os plasmídeos integrativos foi realizada pelo método que utiliza acetado de lítio (Gietz et al., 1992). O kit para transformação de leveduras (YEASTMAKER *yeast transformation system*, Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) foi obtido através da Takara Bio, Japão. Após a etapa de internalização dos plasmídeos pela célula, estas foram encubadas em meio rico YP, contendo glicose (linhagens *hxt-knockout*) ou maltose (linhagens *hxt-null*) e cultivadas por 90 minutos, sendo posteriormente transferidas para placas contendo os mesmos meios de cultivo, porém contendo também o antibiótico Aureobasinin A. As placas foram encubadas à 30°C por 1-3 dias.

Para as transformações com os plasmídeos derivados do pPGK (para sobre expressão dos genes *HXT1*, *HXT2*, *HXT5* ou *HXT7*), as linhagens foram selecionadas em meio sintético sem uracila, suplementado com 2% de glicose e Aureobasidin A. Para as linhagens *hxt-knockout* foi adicionado também Geneticina. Um esquema

simplificado exibindo as etapas de construção e transformação das leveduras com os plasmídeos obtidos pode ser visualizada na Figura 7B.

Tabela 3- Lista de Oligonucleotídeos Iniciadores.

Iniciadores	Sequência (5' → 3')
HXT1-F	CATA <u>AAGCTT</u> ATGAATTCAACTCCCGATCTAATATCTC
HXT1-R	TAAGGATCC <u>TTA</u> TTTCCTGCTAAACAAACTCTTGTA
HXT2-F	CATGGATCCATGTCTGAATTCGCTACTAGCCG
HXT2-R	TAAGGATCC <u>TTA</u> TTTCCTCGGAAACTCTTTTTCT
HXT5-F	ATGAATTCATGTGCGAACTTGAAAACGCTC
HXT5-R	TAA <u>AAGCTT</u> TTATTTTTCTTTAGTGAACATCCTTTATAAAATGGTCTC
HXT7-F	ATGAATTCATGTGACAAGACGCTGCTATTGCAGAGCAAAC
HXT7-R	AAGGATCC <u>TTA</u> TTTGGTGCTGAACATTCTCTTGACAATGGC
PGKProF-SaI-F	CTCGTCGACGAGCTTGAAAAGATGCCGATTTG
XK-P-SQ-R	GACATTCAGTTGTTGGGTC

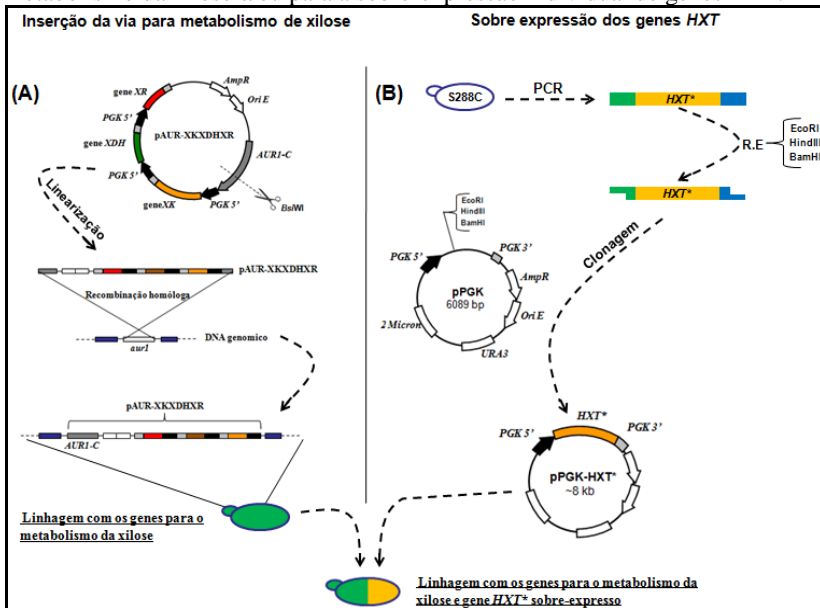
Sequenciamento

HXT1-seq1	CCAAGCTAGGTGATATGTAT
HXT1-seq2	AATCGACGAAGCCAGGGCTT
HXT1-seq3	TATGTTGTCTATGCCTCTGT
HXT2-seq1	GAATTGGTTTGATGTGCGTC
HXT2-seq2	GGCAAAATCTAACAAAGTCA
HXT2-seq3	ACAAGCTTATATCCAAATGG
HXT5-seq1	TCAGAACCGGTTTGATGGTT
HXT5-seq2	TTATGATTGTTGGTATGACG
HXT5-seq3	ACCGTCGATCGTTTTGGTGC
HXT7-seq1	CCAAATGGGTGATATGTAC
HXT7-seq2	TAAGATCGAAGAAGCCAAA
HXT7-seq3	ATGTTGTCTATGCTTCCGT
PGK-OGT29	CAGATCATCAAGGAAGTAATTATCT
PGK-OGT30	TCTATCGATTTCAATTC AATTCAAT

FONTE: Este trabalho.

NOTA: Nucleotídeos sublinhados indicam os sítios de restrição para as enzimas *Hind*III, *Bam*HI ou *Eco*RI.

Figura 7 – Transformação das linhagens com os plasmídeos para metabolização de xilose (A) ou sobre-expressão dos genes *HXT* (B). Em (A) os plasmídeos pAUR-101 ou pAUR-XKXDHXR foram primeiro linearizados e então integrados no genoma da levedura. Em (B) Os genes *HXT** (*HXT1*, *HXT2*, *HXT5* ou *HXT7*) foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico da linhagem S288C, esses fragmentos foram clivados com as enzimas de restrição (RE) requeridas e o fragmento foi inserido no plasmídeo multicópia pPGK. Estes plasmídeos foram então replicados em *E. coli* e em seguida inseridos em *S. cerevisiae*. Ao final obtiveram-se linhagens com os genes para o metabolismo da xilose e/ou para a sobre-expressão individual de genes *HXT*.



FONTE: Este trabalho.

NOTAS: *Genes *HXT1*, *HXT2*, *HXT5* ou *HXT7*

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA XILOSE REDUTASE, XILITOL DESIDROGENASE E XILULOCINASE

As atividades enzimáticas foram determinadas a partir do extrato celular de *S. cerevisiae*. Para tanto, as linhagens foram cultivadas em 5 ml de meio rico contendo 2% de maltose e Aureobasidin A por 24 h à 30°C. Após dois ciclos de lavagens com água destilada estéril, as células foram centrifugadas (5.000 RPM, 5 min., 4°C) e ressuspensas em quantidade apropriada de reagente Y-PER (*Yeast Protein Extraction*, Pierce, Rockford, IL, USA). As células foram então lisadas em agitador orbital (≈ 100 RPM) por 20 min.

Os lisados celulares foram centrifugados (10.000 RPM, 10 min., 4° C) e a fração do sobrenadante foi então utilizada para as dosagens de atividade enzimática para xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulocinase (XK). As concentrações protéicas nos extratos celulares foram determinadas com base no kit Micro-BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) através de espectrofotômetro (WPA, Cambridge, UK), utilizando BSA (*Bovine Serum Albumin*) 2 mg/ml, como padrão.

A atividade de XR foi determinada através do monitoramento da oxidação de NADPH à 340 nm e 30°C (Smiley e Bolen 1982; Walfridsson et al., 1997). A mistura reacional para este ensaio contém 45 mM de tampão Fosfato de Potássio (pH 6,0), 200 mM de xilose, 0,15 mM de NADPH e 10 µL de extrato enzimático, em reação com volume final de 1 mL.

A determinação da atividade da XDH foi realizada através do monitoramento da redução de NAD⁺ à 340 nm e 35°C (Smiley e Bolen, 1982; Walfridsson et al., 1997). A mistura reacional para este ensaio contém 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM de MgCl₂, 300 mM de xilitol, 1 mM de NAD⁺ e 10 µL de extrato enzimático, em reação com volume final de 1 mL.

Para a determinação da atividade da XK, que forma adenosina difosfato, esta foi acoplada com as reações da piruvato cinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH), desta forma a atividade de XK foi determinada através do monitoramento da oxidação de NADH à 340nm e 30°C (Eliasson et al., 2000b; Katahira et al., 2006; Shamanna e Sanderson, 1979). A mistura reacional para este ensaio contém 100 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,0), 2 mM de MgCl₂, 8 mM de NaF, 2 mM de adenosina trifosfato (ATP), 0,2 mM de fosfoenol piruvato, 3 mM de glutatona reduzida, 10 U de PK, 10 U de LDH, 0,2 mM de NADH, 8,5 mM de D-xilulose, e 10 µL de extrato enzimático, em reação com volume final de 1 mL.

O monitoramento das reações em espectrofotômetro U-3000 (Hitachi, Tokyo, Japan) foi feito por 5 minutos, com leituras a cada 30 segundos por amostra, iniciadas logo após a adição das coenzimas. Uma unidade de enzima (U) corresponde à quantidade de enzima capaz de reduzir ou oxidar 1 µmol de NAD⁺ ou NAD(P)H por minuto.

3.6 ENSAIOS FERMENTATIVOS

As linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* foram pré-crescidas por 36 horas à 30°C em meio rico (YP) ou meio sintético (completo ou drop-out) contendo glicose, maltose ou xilose, após o crescimento estas linhagens foram centrifugadas a 5.000 RPM por 5 min a 4°C, lavadas

duas vezes com água destilada estéril e inoculadas de modo a obter-se um volume final de 20 mL (células e meio). A densidade inicial de células no meio de fermentação foi ajustada para uma DO_{600nm} de ≈ 7 (linhagens de laboratório em meio rico), $\approx 0,3$ (linhagens de laboratório em meio mínimo), ou ≈ 14 (linhagens industriais em meio rico).

As fermentações anaeróbias foram realizadas em duplicata a 30°C em frascos fechados de 50 mL com barra de agitação magnética (2 cm de comprimento) permitindo desta forma uma agitação leve (100 RPM). Durante a fermentação, a densidade celular foi monitorada através da medição da absorbância a 600 nm. Amostras foram removidas do meio em intervalos pré determinados e diluídas quatro vezes em 8 mM de H₂SO₄ ou água destilada estéril (para fermentações em meio rico contendo sacarose ou a mistura de sacarose com xilose). Estas amostras foram então armazenadas à -30°C para a posterior quantificação dos substratos e produtos da fermentação.

3.7 DETERMINAÇÃO DOS SUBSTRATOS E PRODUTOS DAS FERMENTAÇÕES

A determinação de glicose, xilose, etanol, xilitol, glicerol e ácido acético foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) equipado com detector de índice de refração (RI-2031Plus, JASCO, Tokyo, Japan) utilizando coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). O HPLC foi operado a 65°C utilizando-se 8 mM de H₂SO₄ como fase móvel com fluxo de 0,6 mL/min e 0,02 mL de volume de injeção.

Excepcionalmente, para meios contendo sacarose ou a mistura de sacarose e xilose foi utilizada coluna Aminex HPX-87C (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) operada à 85°C utilizando água como fase móvel, fluxo de 0,2 mL/min e 0,02 mL de volume de injeção.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SEQUENCIAMENTO E ANOTAÇÃO DO GENOMA DA LEVEDURA FERMENTADORA DE D-XILOSE *Spathaspora arborariae*

O genoma montado teve um N50 de ≈ 679 kb (6 *scaffolds*) e um N90 de ≈ 202 kb (18 *scaffolds*), com conteúdo médio de C+G de 31,7%, sendo portanto compatível com a quantidade de C+G encontrada em outros genomas de leveduras (Liu et al., 2012). As anotações do genoma foram feitas com o software MAKER2 (Holt e Yandell, 2011), o que

permitiu identificar 5.625 prováveis ORFs (sequências que possuem grande chance de codificar para proteínas ou polipeptídeos) com conteúdo maior que 100 nucleotídeos, em concordância com o conteúdo genômico de outras espécies de leveduras do clado “CTG” (este táxon traduz o códon CTG como uma serina ao invés de leucina; Maguire et al., 2013). O genoma completo de *S. arborariae* representando o conteúdo de seus oito cromossomos encontra-se depositado no DDBJ/EMBL/GenBank sob o acesso AYLH00000000 (Lobo et al., 2014).

O sequenciamento de *S. arborariae* revelou vários genes de interesse biotecnológico nesta levedura, incluindo ORFs com homologia a genes que codificam para xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH), xilulocinase (XK), e enzimas da via das pentose-fosfato, tais como: 6-fosfogluconolactonase (EC 3.1.1.31), Ribulose-5-fosfato 4-epimerase (EC 5.1.3.4), transquetolase (EC 2.2.1.1) e 6-fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44), além de genes que codificam para proteínas transportadoras de açúcares.

Os genes que codificam para xilose redutase de leveduras do gênero *Spathaspora* (*S. passalidarum* e *S. arborariae*) são particularmente interessantes, pois estas enzimas aceitam ambos os cofatores NADH e NADPH, permitindo desta forma a fermentação anaeróbica de xilose e o menor acúmulo do metabólito xilitol (Hou, 2012; Mouro, 2012). De maneira interessante, no genoma de *S. arborariae* as sequências que codificam para as enzimas necessárias ao metabolismo de xilose (XR, XDH e XK) e da via das pentose-fosfato, foram encontradas geralmente como um único gene no genoma (embora membros da família das aldo-ceto redutases possam aceitar vários substratos, incluindo xilose), no entanto nossa análise permitiu encontrar pelo menos dez sequências em *S. arborariae* que provavelmente codificam para transportadores de açúcar, visto que estas sequências exibem homologia com outras sequências de transportadores de açúcar presentes em leveduras (Figura 8). Para a construção da árvore filogenética mostrada nesta Figura, as sequências que possivelmente codificam para transportadores de açúcar em *S. arborariae* foram analisadas pelos programas ClustalW (disponível em www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) e Dendroscope 2.3 (Huson et al., 2007). Para compor este filograma, utilizamos também sequências conhecidas (obtidas através da ferramenta NCBI-BLAST; disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) de transportadores de açúcares de outras espécies de leveduras.

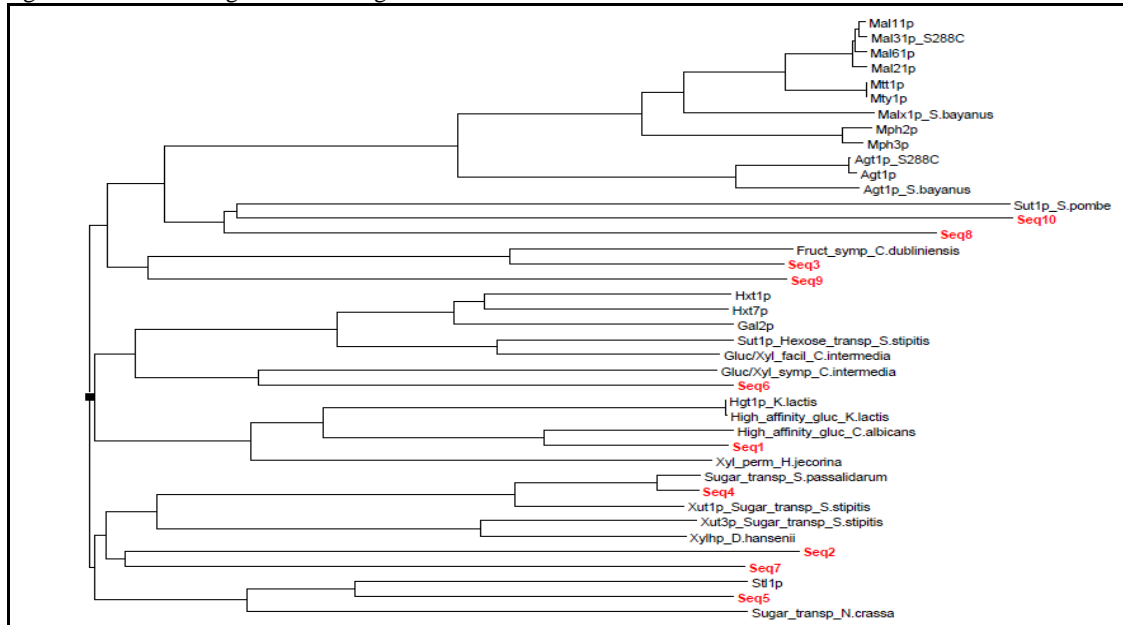
Pelo menos outras quatro sequências com homologia a transportadores de açúcar também foram encontradas no genoma de *S. arborariae*, no entanto, por se tratarem de sequências pequenas, que codificavam para menos de 200 aminoácidos, estas sequências não foram analisadas neste trabalho, pois podem ser consideradas possivelmente pseudo-genes ou sequências parciais não corretamente montadas no genoma sequenciado.

Leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces castellii*, *Candida glabrata* e *Kluyveromyces polysporus*, são citadas como microrganismos que teriam sofrido duplicação de todo o seu genoma durante sua evolução (Kellis et al., 2004; Lin e Li, 2011).

Este evento de duplicação conferiu vantagens evolutivas a estas leveduras, e neste sentido a alta capacidade fermentativa que algumas destas leveduras exibem estaria diretamente ligada à presença em seus genomas de um número maior de genes que codificam para transportadores de açúcar, possibilitando a estas leveduras, como *S. cerevisiae*, fermentar eficientemente diversos açúcares em diferentes concentrações (Lin e Li, 2011). Estas leveduras (com exceção de *K. polysporus*) possuem entre 10 e 19 diferentes genes que codificam para transportadores de açúcar em seus genomas, enquanto que leveduras que não sofreram duplicação genômica possuem no máximo oito genes que codificam para transportadores de açúcar (*Saccharomyces kluyveri*), apresentando em média quatro genes que codificam para estas permeases, como por exemplo, nos genomas de *Ashbya gossypii* e *Zygosaccharomyces rouxii* (Lin e Li, 2011).

Esta quantidade de genes que codificam para transportadores de açúcar identificados em *S. arborariae* (dez transportadores) sugere que embora esta levedura não tenha passado pelo evento de duplicação genômica, a quantidade de genes que codificam para transportadores nesta levedura habilitaria a este microrganismo fermentar com grande eficiência pentoses e hexoses em meios complexos, tais como meio rico (YP), hidrolisado de palha de arroz, ou ainda hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar (Cadete et al., 2009; da Cunha-Pereira et al., 2011; Gonçalves, 2010; Hickert et al., 2013). Mouro (2012) mostrou ainda que a habilidade de *S. arborariae* em fermentar xilose esta relacionada ao seu sistema de co-transporte H⁺-xilose de alta capacidade (K_m de 25 mM e V_{max} de 35,3 nmoles mg⁻¹ min⁻¹ para células crescidas em xilose, ou K_m de 12,4 mM e V_{max} de 11,7 nmoles mg⁻¹ min⁻¹ para células crescidas em glicose). No caso do transporte ativo de glicose esta

Figura 8 - Filograma de transportadores de açúcar em leveduras. Para a construção do filograma, as sequências das permeases escolhidas (Seq, destacadas em vermelho no filograma) foram inicialmente alinhadas através do software ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html). Em seguida, o arquivo com o alinhamento foi exportado para o software Dendroscope 2.3 (Huson et al., 2007), onde as sequências foram organizadas dando origem a este filograma.



FONTE: Este trabalho.

levedura apresentou um sistema de co-transporte H^+ -glicose de alta afinidade, mas de menor capacidade (K_m de 0,48 mM e V_{max} de 9,7 nmoles $mg^{-1} min^{-1}$ para células crescidas em glicose, ou K_m de 1,80 mM e V_{max} de 20,7 nmoles $mg^{-1} min^{-1}$ para células crescidas em xilose).

Dentre os dez transportadores identificados neste trabalho, a Seq8 (com 518 aminoácidos) e principalmente a Seq10 (571 aminoácidos) aparecem em nosso filograma (Figura 8) como mais próximos ao transportador Sut1p de *Schizosaccharomyces pombe*. Sut1p é um conhecido transportador de α -glicosídeos, com K_m de 6,5 mM para maltose e K_m de 36,3 mM para sacarose (Reiders e Ward, 2001). A Seq5 (531 aminoácidos) por sua vez aparece mais proximamente relacionada ao transportador Stl1p. Stl1p pertence à família de transportadores de açúcar de *S. cerevisiae*, embora esteja envolvido no transporte ativo de glicerol, sendo induzido principalmente em condições de choque osmótico (Ferreira et al., 2005). Por outro lado, apenas dois genes (Seq6, com 690 aminoácidos, e Seq1, com 541 aminoácidos) apresentaram homologia com genes da família de transportadores de hexoses de difusão facilitada já caracterizados em *S. cerevisiae*, *S. stipitis*, *Candida intermedia*, *C. albicans* e *K. lactis* (Figura 8). Seq3 (546 aminoácidos) e Seq9 (623 aminoácidos) são transportadores próximos a um transportador ativo de frutose (co-transporte H^+ -frutose) de *C. dubliniensis*, enquanto que Seq4 (573 aminoácidos), e de forma mais distante Seq2 (497 aminoácidos) e Seq7 (608 aminoácidos), apresentaram homologia a transportadores de xilose de *S. stipitis*, *D. hansenii* e *S. passalidarum* (Figura 8).

Prompt (2012), trabalhando com dados preliminares do genoma de *S. arborariae*, analisou dois possíveis genes de transportadores de açúcar desta levedura, denominados como *Transp1* (correspondente à Seq7) e *Transp4* (correspondente à Seq3). Foi constatado, através de crescimentos em glicose ou xilose e posterior análise da sua expressão via PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR), que os genes destes dois transportadores possuem expressão induzida por xilose, sendo portanto interessantes candidatos para uma melhor caracterização bioquímica e funcional.

Para estudar transportadores de açúcares em leveduras é necessária uma linhagem que não possua transportadores no seu genoma. A linhagem KY73 (Tabela 1) é uma linhagem de *S. cerevisiae* deletada nos principais transportadores de hexoses (*HXT1-HXT7* e *GAL2*) e, portanto é incapaz de consumir e/ou crescer em glicose e outras hexoses (Kruckeberg et al., 1999; Batista et al., 2004; Saloheimo et al., 2007). Quando esta linhagem foi transformada com o plasmídeo

integrativo pAUR-101 (dando origem à linhagem DLG-K2C), plasmídeo que possui apenas o gene *AURI-C* que confere resistência ao antibiótico Aureobasidin A (Tabela 2), as células apresentaram baixas atividades de xilose redutase ($0,013 \pm 0,004$ U [mg proteína]⁻¹), xilitol desidrogenase ($0,008 \pm 0,002$ U [mg proteína]⁻¹), e xilulocinase ($0,030 \pm 0,003$ U [mg proteína]⁻¹). No entanto, ao integrar no genoma da linhagem KY73 o plasmídeo pAUR-XKXDHXR (Tabela 2) contendo os genes para o metabolismo de xilose (genes *XYLI*, *XYL2* e *XKSI*) sobre-expressos (dando origem à linhagem DLG-K1; Tabela 1), as células passaram a exibir altas atividades da xilose redutase ($1,780 \pm 0,010$ U [mg proteína]⁻¹), xilitol desidrogenase ($2,003 \pm 0,013$ U [mg proteína]⁻¹) e xilulocinase ($0,275 \pm 0,002$ U [mg proteína]⁻¹), embora esta linhagem continue sendo incapaz de consumir ou fermentar xilose por não possuir transportadores para este açúcar.

Estas características tornam a linhagem DLG-K1 extremamente interessante como plataforma de seleção e expressão de genes que codificam para transportadores de xilose em *S. cerevisiae*. De fato, esta linhagem tem sido utilizada pelo nosso grupo de pesquisa para a caracterização de alguns transportadores heterólogos de *S. arborariae* (as Seq3 e Seq7 mencionadas acima) e *S. stipitis*, sendo que os resultados obtidos até o momento indicam que o transportador correspondente à Seq7 permite o consumo de glicose (mas não frutose ou xilose), enquanto que a Seq3 não permitiu o transporte de nenhum destes açúcares (dados não mostrados).

Embora os transportadores de *S. arborariae* citados neste trabalho apresentem grande potencial biotecnológico, sobretudo se destinados a expressão heteróloga em *S. cerevisiae* visando melhorar o consumo de xilose em meios complexos, a expressão destes transportadores pode enfrentar problemas comuns à expressão heteróloga de transportadores, mesmo de leveduras próximas. Problemas como a baixa atividade de transporte em *S. cerevisiae* (atividade esta que pode ser inclusive inferior aos transportadores codificados pelos genes *HXT*; Du et al., 2010) ou ainda a não expressão da proteína devido a problemas traducionais (Du et al., 2010; Young et al., 2012), dificultam a caracterização de possíveis transportadores heterólogos. Neste sentido o presente trabalho de doutorado passou a focar principalmente no estudo dos transportadores endógenos (genes *HXT*) de *S. cerevisiae*, e seu papel no transporte e fermentação de xilose por leveduras recombinantes.

4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE XILOSE REDUTASE, XILITOL DESIDROGENASE E XILULOCINASE E CONFIRMAÇÃO DO GENE *XKS1* SOBRE-EXPRESSO EM LINHAGENS DE

Saccharomyces cerevisiae

Na Tabela 4 são mostradas as atividades enzimáticas das linhagens de *S. cerevisiae* transformadas com o plasmídeo integrativo pAUR-XKXDHXR. As linhagens transformadas com este plasmídeo adquiriram a habilidade de sobre-expressar os genes *XYL1* e *XYL2* que codificam respectivamente para as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) de *S. stiptis* e também o gene *XKS1* que codifica para a enzima xilulocinase (XK) de *S. cerevisiae*. Embora *S. cerevisiae* expresse *XKS1* em baixos níveis, a sobre-expressão moderada de *XKS1* tem sido proposta como necessária para a eficiente produção de etanol a partir de xilose em linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* (Matsushika e Sawayama, 2008a).

Matsushika e colaboradores (2012) integraram na linhagem de laboratório BY4743 o plasmídeo pAUR-XKXDHXR dando origem a linhagem MA-B43. Esta linhagem embora não seja isogênica as linhagens *hxt-knockout* sendo ainda diplóide, possui, no entanto, construção comum às linhagens *knockout* do Banco Open Biosystem e desta forma tem sido usada como linhagem referência para o estudo de linhagens deste banco (Matsushika et al., 2012). Neste trabalho a linhagem MA-B43 é tratada como linhagem selvagem (*wild type* :: *w.t*).

As linhagens *hxt-knockout* DLG-H1, DLG-H2, DLG-H3, DLG-H4 e DLG-H5, deletadas respectivamente para cada um genes *HXT1*, *HXT2*, *HXT3*, *HXT4* e *HXT5* (Tabela 1) foram transformadas com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR. As linhagens *hxt-knockout*, provenientes do banco Open Biosystem, caracterizam-se por apresentar, cada uma das linhagens, a deleção de um único gene que foi substituído pelo módulo *KanMX*. Este banco compreende mais de 5.500 genes de *S. cerevisiae*. Neste trabalho foram analisadas as linhagens *hxt-knockout* para cada um dos genes *HXT1-5*, infelizmente o banco não incluía linhagens *knockout* para os genes *HXT6* e *HXT7*. Por fim, as linhagens industriais CAT1 e GMY08 (Tabela 1) foram também transformadas com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR obtendo-se desta forma as linhagens MP-C5 e MP-G1 respectivamente.

Com relação às atividades enzimáticas, a linhagem DLG-K1 foi aquela onde foram observadas as mais elevadas atividades enzimáticas dentre as linhagens transformadas com o plasmídeo integrativo, exibindo atividade de XR ≈ 13 vezes maior, XDH $\approx 1,7$ vezes maior e

Tabela 4- Atividade de xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulocinase (XK) em extratos celulares de linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Linhagem	Característica relevante	Atividade ^a (U [mg proteína] ⁻¹)		
		XR	XDH	XK
MA-B43 ^b	pAUR-XKXDHXR	0.139 ± 0.025	1.203 ± 0.010	0.030 ± 0.002
DLG-H1	<i>hxt1</i> Δ e pAUR-XKXDHXR	0.918 ± 0.011	0.964 ± 0.005	0.068 ± 0.009
DLG-H2	<i>hxt2</i> Δ e pAUR-XKXDHXR	1.007 ± 0.018	1.053 ± 0.014	0.121 ± 0.011
DLG-H3	<i>hxt3</i> Δ e pAUR-XKXDHXR	0.844 ± 0.017	0.920 ± 0.031	0.154 ± 0.004
DLG-H4	<i>hxt4</i> Δ e pAUR-XKXDHXR	1.021 ± 0.048	1.018 ± 0.024	0.060 ± 0.004
DLG-H5	<i>hxt5</i> Δ e pAUR-XKXDHXR	1.234 ± 0.023	1.211 ± 0.032	0.093 ± 0.006
MP-C5	Industrial CAT1 e pAUR-XKXDHXR	0.340 ± 0.010	0.448 ± 0.025	0.049 ± 0.003
MP-G1	Industrial GMY08 e pAUR-XKXDHXR	0.424 ± 0.044	0.550 ± 0.034	0.042 ± 0.005

FONTE: Este trabalho.

NOTAS: ^aOs valores são a média de três experimentos independentes, ^bLinhagem selvagem (*w.t*)

XK \approx 9 vezes maior que a linhagem selvagem MA-B43 (maior também que àquela observada em outras linhagens transformadas com o mesmo plasmídeo, Matsushika et al., 2008c; 2009a). É importante notar que a linhagem *hxt-null* sem a sobre-expressão dos genes para metabolismo da xilose (linhagem DLG-K2C), apresentou atividades muito baixas (embora mensurável) tanto para XR quanto para XDH, como citado anteriormente, atividades estas observada provavelmente devido à ação endógena da XR (codificado pelo gene *GRE3*, ORF YHR104W de *S. cerevisiae*; Träff et al., 2002) e XDH (codificado pelo gene *XYL2*, ORF YLR070C de *S. cerevisiae*; Richard et al., 1999). Com relação à atividade endógena de XK (Richard et al., 2000) esta por sua vez foi tão alta quando àquela obtida pela linhagem MA-B43 portando o plasmídeo pAUR-XXDXHR.

Quanto às linhagens *hxt-knockout*, estas apresentaram por sua vez atividades relativamente próximas entre si, com destaque, entretanto, para a linhagem DLG-H5 que apresentou, dentre as linhagens *hxt-knockout*, a atividade de XR e XDH mais elevadas (Tabela 4) esta diferença foi \approx 1,4 vezes maior para XR e \approx 1,3 vezes maior para XDH quando comparado a linhagem DLG-H3. De maneira interessante a linhagem DLG-H3, que exibiu as menores atividades de XR e XDH, exibiu a maior atividade de XK, sendo esta atividade de XK \approx 2,6 vezes maior que àquela exibida por DLG-H4 (linhagem *hxt-knockout* com menor atividade de XK).

Esta diferença encontrada entre linhagens isogênicas (exceto pela deleção pontual de algum gene *HXT*) transformadas com o mesmo plasmídeo integrativo, embora diferente, não foi suficiente para conferir vantagem a nenhuma destas linhagens frente ao substrato xilose, como abordado adiante.

Com relação às linhagens industriais MP-C5 e MP-G1, estas apresentaram por sua vez, atividade de XR respectivamente \approx 2,4 e \approx 3 vezes maior que àquela observada para a linhagem selvagem MA-B43. Embora a atividade de XK tenha sido assim como a atividade de XR, maior nas linhagens industriais quando comparada a linhagem selvagem (Tabela 4), no que se refere à atividade de XDH, entretanto, estas linhagens exibiram atividades \approx 2,7 (para MP-C5) e \approx 2,2 (para MP-G1) vezes menor que aquelas observadas para MA-B43. Estes valores de XR e XK são próximos aos encontrados por Matsushika e colaboradores (2009a) trabalhando com linhagens industriais e este mesmo plasmídeo, exceto pela atividade de XDH que em nosso estudo ficou entre 2 e 4 vezes abaixo do valor observado por àqueles autores.

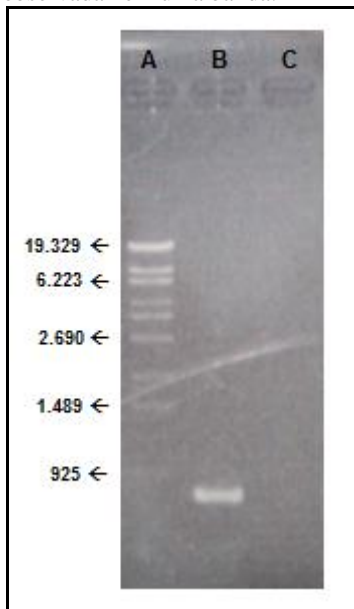
Diferentes estudos têm proposto que a maior atividade de XR em relação à XDH (Jeppsson et al., 2003; Karhumaa et al., 2007a) ou a maior atividade de XDH em relação a XR (Kim et al., 2012; 2013b) como sendo fundamental para minimizar o acúmulo de xilitol no meio. Por outro lado alguns autores sugerem que a alta atividade de XK pode causar a inibição do crescimento de *S. cerevisiae* em xilose (Jin et al., 2003; Ni et al., 2007; Rodriguez-Peña et al., 1998) enquanto que outros autores defendem ainda que esta elevada atividade é o fator de maior importância para a redução no acúmulo de xilitol (Matsushika e Sawayama, 2011; Parachin et al., 2011).

Estas contradições sugerem em suma que um fluxo constante, possibilitado pelas enzimas XR/XDH/XK, é mais importante do que as atividades individuais de cada uma destas enzimas se o objetivo for a diminuição no acúmulo de xilitol e aumento da produção de etanol (Kim et al., 2013a). Além disso, essas três enzimas parecem não serem os únicos fatores limitantes no catabolismo de xilose em *S. cerevisiae*, mas também outras enzimas, sobretudo da fase não oxidativa da via das pentose-fosfato (Johansson e Hahn-Hägerdal, 2002; Karhumaa et al., 2005; Lu e Jeffries, 2007; Metzger e Hollenberg, 1994).

De fato linhagens transformadas com o mesmo plasmídeo pAUR-XKXDHXR apresentam, por razões ainda não claras, sensíveis diferenças com relação às atividades de XR, XDH e XK (Matsushika et al., 2008c; 2009a). Por este motivo, cada linhagem obtida neste trabalho é resultante da prévia seleção das mais elevadas atividades enzimáticas observadas entre vários transformantes analisados.

A confirmação da presença do gene *XKSI* exógeno e sobre-expresso (proveniente da construção do plasmídeo pAUR-XKXDHXR) foi realizada através do emprego dos iniciadores PGKProF-SaI-F e XK-P-SQ-R (Tabela 3), estes iniciadores foram utilizados para reações em PCR com o emprego do DNA genômico das linhagens DLG-K1 ou DLG-K2C, revelando a presença de uma banda correspondente ao gene *XKSI* em DLG-K1 (Figura 9B) com aproximadamente 800pb, correspondente ao final do promotor PGK e início do gene *XKSI*, construção *PGK1p-XKSI* do plasmídeo pAUR-XKXDHXR. Para a linhagem DLG-K2C, que carrega apenas o plasmídeo com o marcador de seleção (pAUR-101), como esperado, não foi observada nenhuma banda quando empregados esses iniciadores (Figura 9C).

Figura 9 – Verificação da presença do gene *XKSI* sobre-expresso em *S. cerevisiae*. As colunas correspondem respectivamente ao padrão (A; Marcador λ *Eco14I* digest, Takara Bio, Japan), linhagem DLG-K1 (B), com a presença de uma única banda correspondente a construção *PGK1p-XKSI* e linhagem DLG-K2C (C) onde não foi observada nenhuma banda.



FONTE: Este trabalho

4.3 ENSAIOS FERMENTATIVOS DE XILOSE POR LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Saccharomyces cerevisiae*

4.3.1 Linhagem de laboratório *hxt-null*

Devido a estabilidade do plasmídeo pAUR-XXKDHR, que se integrou no *locus aur1* das leveduras, todas as linhagens transformadas com este plasmídeo apresentam habilidade de crescer em meio não seletivo, sem perda da sua habilidade de crescer ou fermentar xilose mesmo após vários cultivos (Matsushika et al., 2008c; 2009b). Assim, as linhagens transformadas com este plasmídeo não precisaram ser desafiadas pelo antibiótico Aurobasidin A nos ensaios fermentativos.

Após a transformação com os plasmídeos integrativos, seleção dos melhores transformantes (via atividade enzimática) e dosagem das atividades enzimáticas, todas as linhagens foram submetidas a ensaios fermentativos à 30° C por 72 horas. O pré-inóculo para estas

fermentações foi realizado em meio rico (YP) ou sintético (SC) contendo maltose, visto que este açúcar é captado por permeases específicas e somente hidrolisado intracelularmente por maltases, obtendo-se assim a partir de uma molécula de maltose, duas moléculas de glicose que são então normalmente canalizadas para a via glicolítica por hexo/glicocinases (Goldenthal et al., 1983; Stambuk et al., 2000). Por este motivo, diferente de glicose a utilização de maltose não compete com a utilização de pentoses ao nível de transporte (Subtil e Boles, 2012).

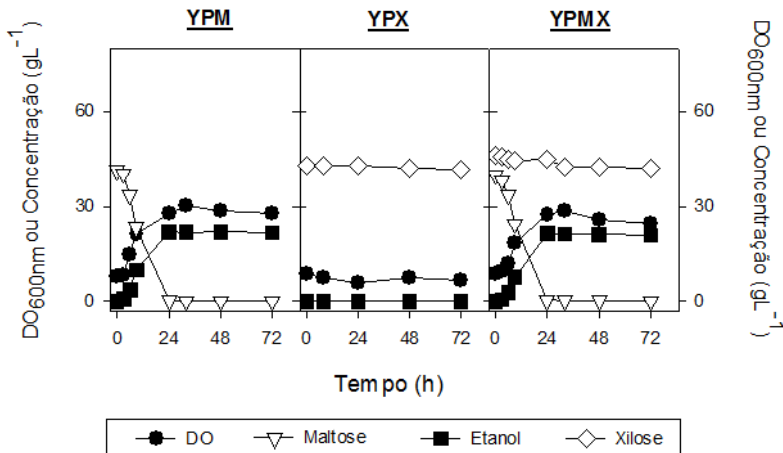
Com base nas amostras retiradas periodicamente foi possível constatar que a ausência dos transportadores Hxt1-7 e gal2 na linhagem DLG-K1 além de impossibilitar o consumo de glicose e frutose (Batista et al., 2004), também o faz frente a xilose como pode ser visto na Figura 10 (YPX), onde a linhagem DLG-K1 não foi capaz de consumir este açúcar e portanto, não houve produção de etanol, glicerol, xilitol, ácido acético ou incremento da DO ao longo das 72 horas de ensaio. Nesta Figura, assim com nas demais Figuras que tratam de ensaios fermentativos neste trabalho, o desvio padrão é menor ou igual ao tamanho do símbolo utilizado.

Na Figura 10 é mostrado o consumo de maltose em meio rico que, como esperado, não sofreu qualquer alteração na presença de xilose visto que a maltose não compartilha os mesmos transportadores com glicose, frutose ou xilose (Batista et al., 2004; Subtil e Boles, 2012). Desta forma, em meios contendo maltose ou maltose com xilose (Figura 10; YPM e YPMX) a Densidade Óptica (DO) e produção de etanol tiveram valores praticamente idênticos. Com relação aos demais subprodutos da fermentação, em meio contendo maltose apenas, a produção de glicerol foi de 1 g L^{-1} enquanto que em meio contendo maltose e xilose esta produção foi de $1,5 \text{ g L}^{-1}$. Em ambos os ensaios a produção de ácido acético foi menor que $0,5 \text{ g L}^{-1}$. De maneira diferente àquela observada em meio contendo xilose apenas, em meio contendo maltose e xilose foi detectada a presença de xilitol no meio após as 72 horas de fermentação. Esta quantidade embora muito pequena ($0,3 \text{ g L}^{-1}$) indica que a xilose pode ter sido transportada para o interior da célula, embora em quantidade insuficientes para sua significativa conversão em biomassa ou etanol.

De fato embora xilitol não tenha sido detectado em meio contendo xilose apenas, não é descartada a hipótese de que mínimas quantidades de xilose tenham sido captadas pelas células naquela condição visto que a família de genes *HXT* compreende 17 sistemas que codificam para proteínas com sequência primária muito similar

(Hamacher et al., 2002; Reifenberger et al., 1995; Saloheimo et al., 2007), sendo DLG-K1 deletada para *HXT1-7* e *GAL2*. Assim, nos ensaios de co-fermentações de maltose e xilose, a xilose presente no interior da célula, diferente das fermentações em xilose apenas, poderia estar sendo convertida, em níveis baixos embora detectáveis, auxiliada pelo catabolismo da glicose, proveniente da maltose, visto que tanto a glicose quanto a xilose convergem ao nível de glicólise (Subtil e Boles, 2012). Esta “ativação”, portanto da via glicolítica desencadeada por um substrato como a maltose, cujo transporte não foi perturbado, poderia explicar a presença de xilitol no sobrenadante das co-fermentações de maltose e xilose, viabilizado desta forma pela disponibilidade de energia à célula quando a maltose estava presente.

Figura 10 – Ensaios fermentativos em meio rico (YP) contendo maltose (YPM), xilose (YPX) ou a mistura de ambos os açúcares (YPMX) utilizando-se a linhagem DLG-K1. As cinéticas de consumo de maltose e xilose e produção de etanol foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $8 (\pm 0,3)$ para todas as linhagens. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

De todo modo, embora DLG-K1 tenha apresentado altas atividades de xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulocinase, como visto na seção anterior, esta linhagem não é capaz de consumir xilose de maneira suficiente, devido a ausências dos genes *HXT1-7* e *GAL2* que

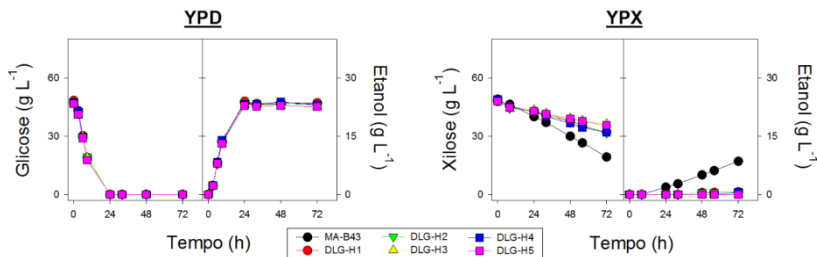
codificam para os principais transportadores de hexoses em *S. cerevisiae* (Batista et al., 2004; Saloheimo et al., 2007).

4.3.2 Linhagens de laboratório *hxt-knockout* e linhagem MA-B43

Os ensaios fermentativos em batelada com as linhagens *hxt-knockout* (linhagens deletadas para um dos genes *HXT1*, *HXT2*, *HXT3*, *HXT4* ou *HXT5*) permitiram a observação de que a simples deleção de qualquer um dos genes *HXT1-5* não é capaz de interferir significativamente na cinética de consumo de glicose destas linhagens em meio rico contendo glicose apenas (YPD) quando comparada à linhagem selvagem MA-B43, de modo que a partir de $\approx 4\%$ de glicose todas as linhagens produziram a mesma quantidade de etanol (Figura 11). Na Tabela 5 é possível observar os parâmetros de rendimento para as fermentações em meio rico contendo somente glicose, onde todas as linhagens foram capazes de consumir 100% da glicose disponível em até 72 horas. As velocidades de consumo volumétrico máximo de glicose e de produção volumétrica máxima de etanol foram também muito próximas entre as linhagens *hxt-knockout* e a linhagem MA-B43 (Tabela 5). Com exceção da linhagem DLG-H3, que exibiu as menores velocidades de consumo de glicose e produção de etanol. DLG-H3 teve, no entanto, rendimento em etanol (g de etanol por g de glicose) similar àquele obtido pelas demais linhagens *hxt-knockout* e MA-B43 (Tabela 5). Nestes ensaios o acúmulo de glicerol observado foi de $\approx 1,2$ g L⁻¹ para todas as linhagens.

Se por um lado o desempenho fermentativo das linhagens *hxt-knockout* e selvagem foram muito próximos entre si nos ensaios em meio contendo glicose apenas, por outro lado, em meio rico contendo xilose apenas (YPX) ou co-fermentando glicose e xilose (YPDX), o desempenho sofreu visível queda por parte principalmente das linhagens *hxt-knockout* (Figura 11 e 13). Nestes meios, de maneira intrigante as linhagens *hxt-knockout* tiveram comportamento muito semelhante entre si e distinto da linhagem MA-B43. Desta forma, em meio contendo xilose apenas somente a linhagem MA-B43 foi capaz de produzir etanol a partir do consumo de 60% da xilose disponível (Figura 11). Enquanto que as linhagens DLG-H1, DLG-H2 e DLG-H4 foram capazes de consumir 35% da xilose disponível e as linhagens DLG-H3 e DLG-H5 apenas 26% deste açúcar (Tabela 5). Desta forma as linhagens *hxt-knockout* exibiram também menor velocidade de consumo volumétrico máximo de xilose quando comparadas a linhagem selvagem, ficando em média 2 a 3 vezes abaixo do valor exibido pela linhagem MA-B43.

Figura 11 – Ensaio fermentativos em meio rico contendo glicose (YPD) ou xilose (YPX) utilizando-se as linhagens MA-B43, DLG-H1, DLG-H2, DLG-H3, DLG-H4 e DLG-H5. As cinéticas de consumo de glicose, xilose e produção de etanol foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $6 (\pm 0,3)$ para todas as linhagens. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

Aliado a este menor consumo exibido pelas linhagens *hxt-knockout*, boa parte desta xilose foi convertida em xilitol de modo que o acúmulo deste metabólito nessas linhagens foi em média três vezes maior ($\approx 9 \text{ g L}^{-1}$) que àquele observado na linhagem selvagem MA-B43 (3 g L^{-1}). Nestes ensaios o acúmulo de glicerol ficou em $\approx 0,3 \text{ g L}^{-1}$ para as linhagens *hxt-knockout* enquanto que a linhagem selvagem teve acúmulo de 3 g L^{-1} de glicerol após 72 horas de fermentação.

Complementar a estas fermentações foram realizados também ensaios com concentrações de 2% e 6% de xilose (dados não mostrados), onde o perfil observado foi idêntico àquele verificado acima. De fato, nem mesmo o aumento da concentração celular inicial foi suficiente para distinguir as linhagens *hxt-knockout* entre si nos crescimentos em meio contendo somente xilose, assim, como pode ser visualizado na Figura 12, a maior disponibilidade de células no início da fermentação contribuiu apenas para realçar ainda mais a diferença entre as linhagens *hxt-knockout* e a linhagem selvagem MA-B43, onde novamente somente a linhagem MA-B43 foi capaz de produzir etanol a partir do consumo de 96% da xilose. Este fato poderia estar relacionado em parte a um melhor fluxo na via de metabolismo da xilose, possibilitado pela relativa menor atividade da xilose redutase em relação a xilitol desidrogenase (Tabela 4) quando comparada às demais linhagens. Com relação à produção de glicerol e xilitol, nas linhagens *hxt-knockout* este valor ficou abaixo de 1 g L^{-1} e 3 g L^{-1} respectivamente, enquanto que a linhagem MA-B43 alcançou 4 g L^{-1} de glicerol e 9 g L^{-1} de xilitol nos ensaios com elevada densidade celular.

Tabela 5- Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se linhagens *hxt-knockout* e linhagem selvagem (MA-B43), transformadas com o plasmídeo pAUR-XXXDHXR, em meio contendo glicose ou xilose.

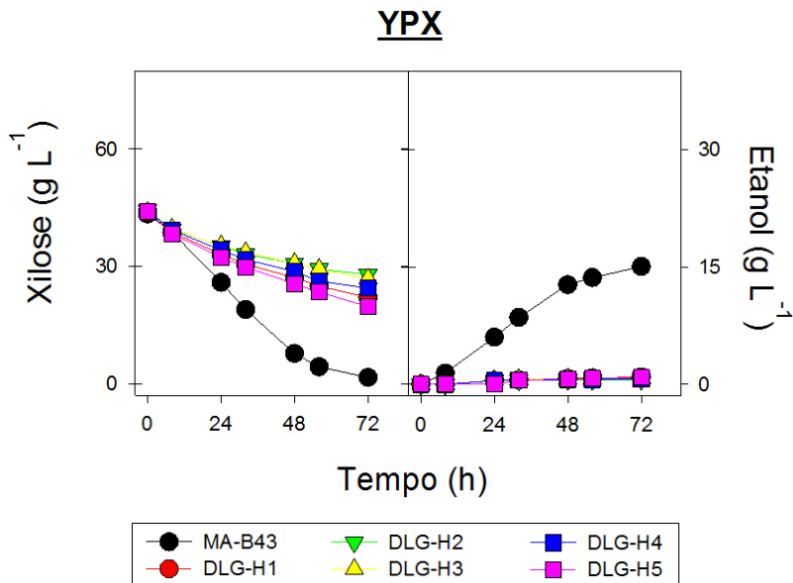
Açúcar ^a /Linhagem	Característica relevante	Açúcar Consumido (%)	V_S (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^b	V_E (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^c	$Y_{E/S}$ (g g ⁻¹) ^d
Glicose					
MA-B43	<i>w.t</i>	100	4.04 ± 0.02	1.85 ± 0.03	0.50 ± 0.01
DLG-H1	<i>hxt1</i> Δ	100	3.94 ± 0.04	1.88 ± 0.04	0.50 ± 0.01
DLG-H2	<i>hxt2</i> Δ	100	3.88 ± 0.03	1.84 ± 0.06	0.49 ± 0.02
DLG-H3	<i>hxt3</i> Δ	100	3.75 ± 0.04	1.77 ± 0.05	0.49 ± 0.03
DLG-H4	<i>hxt4</i> Δ	100	4.17 ± 0.05	1.94 ± 0.07	0.50 ± 0.03
DLG-H5	<i>hxt5</i> Δ	100	3.90 ± 0.01	1.81 ± 0.03	0.49 ± 0.04
Xilose					
MA-B43	<i>w.t</i>	60	0.39 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.13 ± 0.01
DLG-H1	<i>hxt1</i> Δ	35	0.20 ± 0.02	0	0
DLG-H2	<i>hxt2</i> Δ	35	0.14 ± 0.01	0	0
DLG-H3	<i>hxt3</i> Δ	26	0.11 ± 0.01	0	0
DLG-H4	<i>hxt4</i> Δ	35	0.22 ± 0.01	0	0
DLG-H5	<i>hxt5</i> Δ	26	0.15 ± 0.01	0	0

FONTE: Este trabalho.

NOTAS: ^aAs fermentações foram realizadas em meio rico (YP) contendo os açúcares indicados por um período de 72 horas.

^bVelocidade de consumo volumétrico máximo de açúcar. ^cVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol. ^dRendimento baseado em g de etanol produzido por g de açúcar consumido. Os valores são a média de dois experimentos independentes.

Figura 12 – Ensaio fermentativos em meio rico contendo xilose (YPX) utilizando-se as linhagens MA-B43, DLG-H1, DLG-H2, DLG-H3, DLG-H4 e DLG-H5 com elevada densidade celular inicial. As cinéticas de consumo de xilose e produção de etanol foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $18 (\pm 1)$ para todas as linhagens. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.

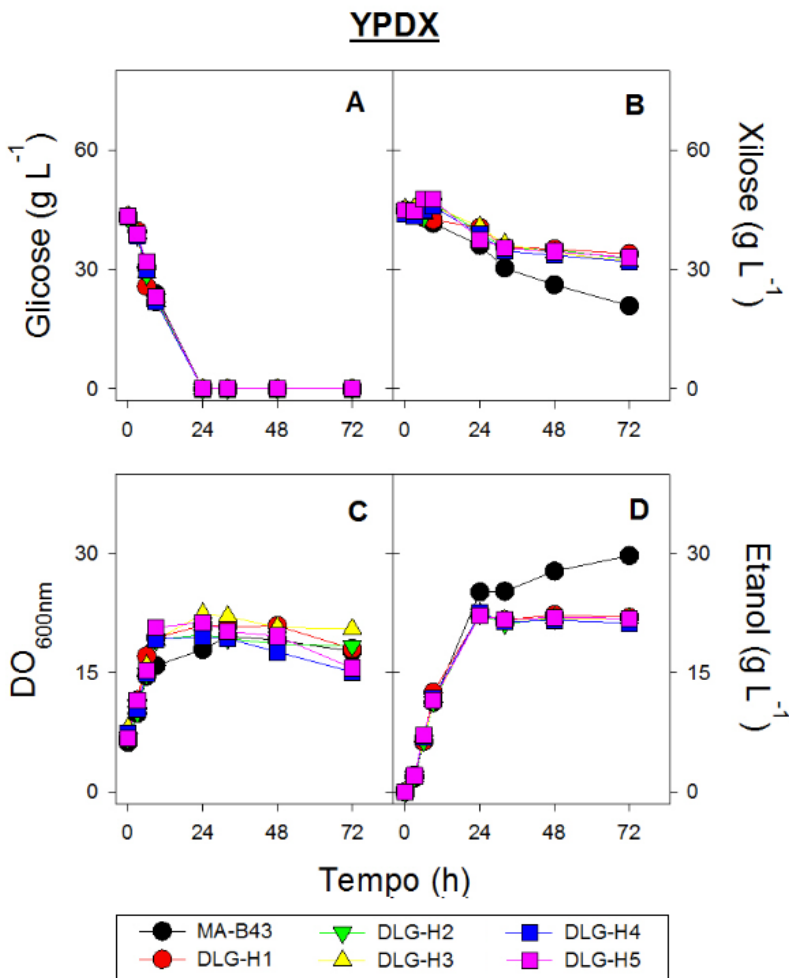


FONTE: Este trabalho.

Nas co-fermentações em meio rico contendo glicose e xilose (YPDX; Figura 13) a glicose foi totalmente consumida pelas linhagens *hxt-knockout* e linhagem selvagem em um período de até 24 horas, embora a velocidade de consumo de glicose tenha sido em média 27% inferior àquela observada por estas linhagens quando em meio contendo somente glicose (Tabela 5 e 6).

A xilose, embora consumida em certo nível por todas as linhagens, teve seu consumo mais expressivo com a linhagem MA-B43 que consumiu 54% deste açúcar, justificando desta forma a maior produção de etanol obtida por esta linhagem quando co-fermentando glicose e xilose (Figura 13). As linhagens *hxt-knockout*, por sua vez consumiram em média duas vezes menos xilose que a linhagem selvagem. Deste modo, nenhuma das linhagens *hxt-knockout* consumiu mais do que 29% da xilose disponível nas co-fermentações de glicose e

Figura 13 – Ensaio fermentativos em meio rico contendo glicose e xilose (YPDX) utilizando-se as linhagens MA-B43, DLG-H1, DLG-H2, DLG-H3, DLG-H4 e DLG-H5. As cinéticas de consumo de glicose (A) e xilose (B), produção de biomassa celular (C) e etanol (D) foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $7 (\pm 0,4)$ para todas as linhagens. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



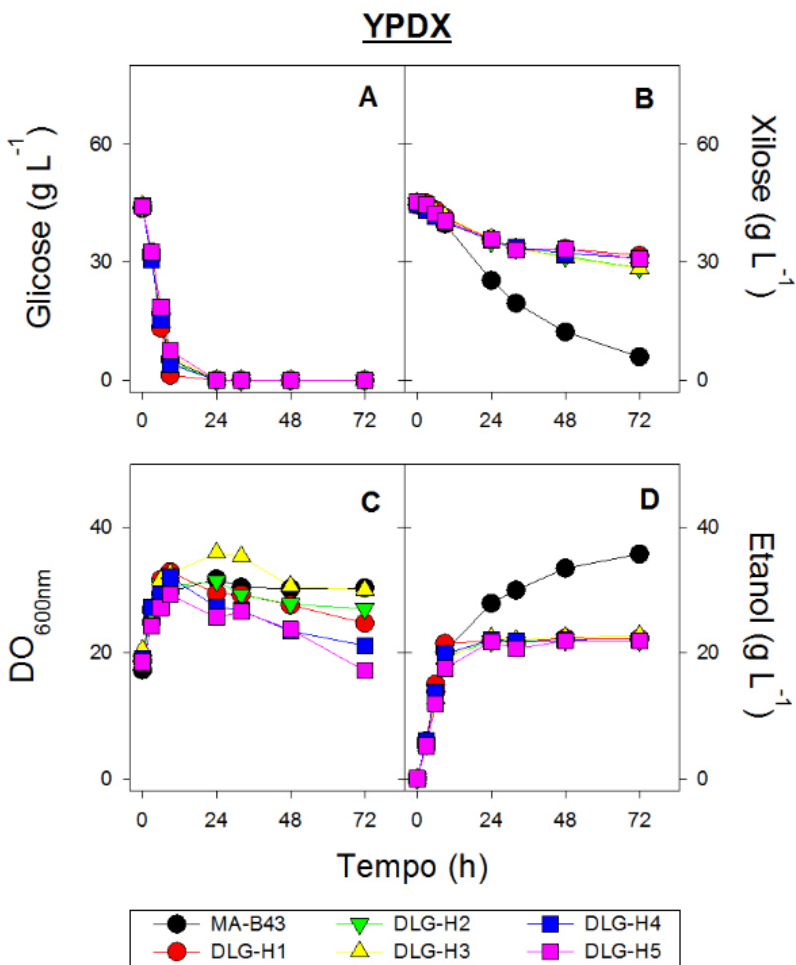
FONTE: Este trabalho.

xilose (Tabela 6), valores que em sua média são inferiores àqueles obtidos por estas linhagens em meio contendo somente xilose (Tabela 5). Nas co-fermentações de glicose e xilose as linhagens *hxt-knockout* obtiveram, portanto, um incremento reduzido de etanol quando comparado às fermentações em meio contendo apenas glicose (Figura 11), desta forma os carbonos provenientes da metabolização da xilose foram direcionados principalmente para a produção de xilitol, visto que as linhagens *hxt-knockout* produziram em média 6 g L^{-1} deste metabólito ao passo que a linhagem MA-B43 produziu apenas 2 g L^{-1} .

De maneira semelhante àquela já observada em meio contendo xilose apenas, nas co-fermentações de glicose e xilose, as concentrações de 2% e 6% de açúcar não alteraram os perfis fermentativos (dados não mostrados) e a maior disponibilidade de células no início da fermentação novamente, acentuo apenas a diferença entre as linhagens *hxt-knockout* e linhagem MA-B43 (Figura 14B e 14D), diferença esta já observadas anteriormente (Figura 13).

Com a diminuição da velocidade de consumo de glicose, citado anteriormente, o rendimento e a velocidade de produção de etanol também foram comprometidos nas co-fermentações de glicose e xilose, quando comparados as fermentações de glicose apenas. Este comprometimento ocorreu em virtude da baixa velocidade de captação de xilose em relação à glicose (Tabela 5 e 6) e ao acúmulo de xilitol. A diminuição na velocidade de consumo de glicose teve, no entanto, pouco efeito sobre a quantidade total de etanol produzido pelas linhagens (Figura 11 e Figura 13) visto que a glicose pôde ser consumida em sua totalidade em até 24 horas mesmo na presença de xilose. Esta diminuição na velocidade de consumo de glicose pode ser explicada pela competição entre glicose e xilose pelos mesmos transportadores de hexose (Bertilsson et al., 2008; Matsushika e Sawayama, 2013; Subtil e Boles, 2012). Com relação à velocidade de consumo de xilose, a linhagem MA-B43 exibiu valores maiores co-fermentando glicose e xilose ao passo que a linhagem DLG-H5, apresentou a mais alta velocidade de consumo de xilose em co-fermentações, DLG-H5, no entanto, não foi capaz de consumir mais que 26% da xilose do meio (Tabela 6), repetindo assim os valores de consumo exibidos em meio contendo somente xilose (Tabela 5).

Figura 14 – Ensaio fermentativos em meio rico contendo glicose e xilose (YPDX) utilizando-se as linhagens MA-B43, DLG-H1, DLG-H2, DLG-H3, DLG-H4 e DLG-H5 com elevada densidade celular inicial. As cinéticas de consumo de glicose (A) e xilose (B), produção de biomassa celular (C) e etanol (D) foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $19 (\pm 1)$ para todas as linhagens. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

Tabela 6- Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se linhagens *hxt-knockout* e linhagem selvagem (MA-B43), transformadas com o plasmídeo pAUR-XXXDHXR, em meios contendo glicose e xilose.

Linhagem ^a	Glicose		Xilose			
	Consumida (%)	V_G (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^b	Consumida (%)	V_X (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^c	V_E (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^d	$Y_{E/S}$ (g g ⁻¹) ^e
MA-B43	100	2.62 ± 0.03	54	0.49 ± 0.03	1.58 ± 0.03	0.44 ± 0.03
DLG-H1	100	2.97 ± 0.03	24	0.30 ± 0.02	1.73 ± 0.05	0.41 ± 0.02
DLG-H2	100	2.67 ± 0.04	28	0.50 ± 0.01	1.57 ± 0.04	0.40 ± 0.01
DLG-H3	100	2.85 ± 0.02	29	0.41 ± 0.00	1.56 ± 0.07	0.40 ± 0.02
DLG-H4	100	2.76 ± 0.02	27	0.49 ± 0.01	1.62 ± 0.05	0.41 ± 0.03
DLG-H5	100	2.61 ± 0.05	26	0.53 ± 0.03	1.58 ± 0.04	0.40 ± 0.02

FONTE: Este trabalho.

NOTAS: ^aAs fermentações foram realizadas em meio rico (YP) contendo os açúcares indicados por um período de 72 horas. ^bVelocidade de consumo volumétrico máximo de glicose. ^cVelocidade de consumo volumétrico máximo de xilose. ^dVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol. ^eRendimento baseado em g de etanol produzido por g de açúcar consumido. Os valores são a média de dois experimentos independentes

Assim, embora fosse esperado que a transcrição de transportadores ativados por altas concentrações de glicose que atuam principalmente em condições semelhantes àquelas encontradas no início da fermentação, tal como os sistemas Hxt1 e Hxt3 (Özcan e Johnston, 1995; 1999), pudesse conferir alguma vantagem às linhagens que os portassem, o mesmo não foi observado nestes primeiros ensaios. De maneira semelhante, também não foi possível diferenciar a presença de sistemas como Hxt2, Hxt4, Hxt6 e Hxt7, que tem sua expressão induzida em baixas concentrações de glicose ou mesmo na presença de outras fontes de carbono, tais como glicerol e etanol (Diderich et al., 1999; Kim et al., 2013a; Özcan e Johnston, 1995; 1999). Deste modo, linhagens mutantes, deletadas para genes que codificam transportadores com características de afinidade por açúcar distintas entre si, como as linhagens mostradas aqui, exibiram perfis fermentativos muito semelhantes, mesmo em condições que predominantemente deveriam afetar de maneira mais ou menos acentuada uma ou outra linhagem mutante, sobretudo em meios contendo glicose, visto que os transportadores codificados pelos genes *HXT* de *S. cerevisiae* evoluíram justamente para conferir a esta levedura a habilidade de crescer em diferentes concentrações deste açúcar (Lin e Li, 2011; Özcan e Johnston, 1999).

Com relação ao acúmulo de glicerol, nas co-fermentações de glicose e xilose as linhagens *hxt-knockout* apresentaram valores abaixo de 1 g L^{-1} , enquanto que a linhagem MA-B43 acumulou 4 g L^{-1} de glicerol após as 72 horas. A produção de ácido acético foi baixa em todos os ensaios fermentativos. Assim, em meio contendo somente glicose ou somente xilose a produção foi sempre menor que 1 g L^{-1} , enquanto que em meio contendo ambos os açúcares este valor foi menor que 2 g L^{-1} . Estes valores incluem as fermentações de MA-B43 e linhagens *hxt-knockout* com diferentes concentrações de açúcar e elevada densidade celular inicial.

4.3.3 Linhagens de laboratório com genes *HXT* sobre-expressos e linhagem MA-B43

É sabido que o eficiente transporte de açúcar é um dos principais fatores limitantes na conversão de biomassa lignocelulósica em etanol (Matsushika et al., 2009b; Runquist et al., 2009; van Vleet e Jeffries, 2009; Young et al., 2012) e que transportadores nativos de hexose presentes em *S. cerevisiae* são capazes de transportar xilose (Gardonyi et al., 2003; Wahlbom et al., 2003; Young et al., 2010). Desta forma, a fim de compreender melhor o papel de cada um dos

transportadores de relevância para o transporte de xilose, codificados pelos genes *HXT* e levando-se em consideração que um único gene *HXT* (*HXT1-7*) é suficiente para proporcionar o crescimento de *S. cerevisiae* em glicose (Özcan e Johnston 1999), nós transformamos a linhagem DLG-K1 com os plasmídeos multicópia codificando para os genes *HXT1*, *HXT2*, *HXT5* ou *HXT7*, obtendo desta forma as linhagens DLG-K1T1, DLG-K1T2, DLG-K1T5 e DLG-K1T7 respectivamente. Os genes para a construção dos vetores foram obtidos a partir do conhecido genoma da linhagem de laboratório S288C e inseridos no plasmídeo pPGK sob o controle do promotor e terminador da fosfoglicerato cinase (pPGK; Tabela 2).

Complementar às construções obtidas a partir da linhagem DLG-K1, nós também inserimos os genes *HXT1*, *HXT2* e *HXT5* nas linhagens DLG-H1, DLG-H2 e DLG-H5 respectivamente, utilizando os plasmídeos acima citados, obtendo desta forma as linhagens DLG-H1T1, DLG-H2T2 e DLG-H5T5, estas linhagens tiveram, portanto seus respectivos genes *HXT* restaurados e sobre-expressos. Considerando-se que os plasmídeos utilizados para a sobre-expressão dos genes *HXT* possuem marcador auxotrófico *URA3*, conferindo desta forma às linhagens que o portam a habilidade de sintetizar uracila, as fermentações descritas a seguir para estas linhagens foram realizadas em meios sintéticos com a adição dos aminoácidos necessários exceto a base nitrogenada uracila (meio sintético dropout). Para a linhagem selvagem (MA-B43) foi utilizado meio sintético completo, com todos os aminoácidos e uracila, visto que esta linhagem não foi transformada com o plasmídeo pPGK.

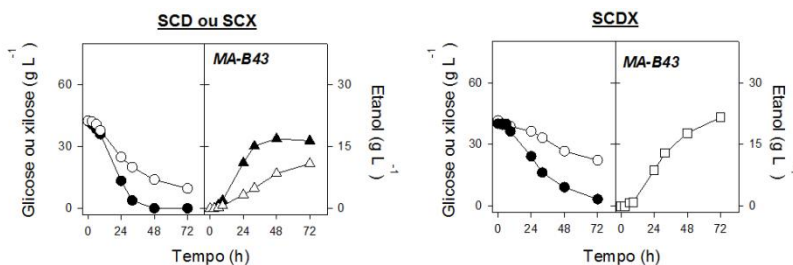
Na Figura 15 é possível observar a cinética de consumo e fermentação de glicose e/ou xilose pela linhagem MA-B43. Esta linhagem foi capaz de consumir toda glicose em até 48 horas quando esta era a única fonte de carbono (SCD). Em meio sintético contendo somente xilose (SCX), MA-B43 não teve o mesmo desempenho, consumindo 77% do açúcar disponível, com velocidade de consumo em média 1,6 vezes menor que aquela exibida em meio contendo somente glicose (Tabela 7). Desta forma, foram produzidos 35% menos etanol a partir de xilose quando comparado a glicose. Quando fermentando apenas glicose, MA-B43 produziu etanol com velocidade em média três vezes superior àquela exibida em meio contendo somente xilose.

Nos meios sintéticos contendo ambos os açúcares (SCDX) a linhagem MA-B43 consumiu 92% da glicose disponível em 72 horas. De maneira semelhante, embora mais expressiva, a xilose também não foi totalmente consumida após 72 horas nestas co-fermentações, embora

o consumo de 46% de xilose neste meio tenha contribuído para um incremento de $\approx 21\%$ na produção total de etanol pela linhagem MA-B43 quando comparado a produção obtida nas fermentações de glicose apenas (Figura 15).

A partir da Figura 15 e das Tabelas 7 e 8 fica evidente que há uma diminuição nas velocidades de consumo de glicose e xilose (redução de $\approx 40\%$ para glicose e $\approx 50\%$ para xilose) quando quantidades iguais de ambos os açúcares estão presentes no meio, esse resultado tem sido atribuído, como já observado nas fermentações com linhagens *hxt-knockout* quando em meio YP, à competição entre ambos açúcares pelos mesmos sistemas de transporte durante co-fermentações de glicose e xilose (Bertilsson et al., 2008; Matsushika e Sawayama, 2013; Subtil e Boles, 2012;).

Figura 15 – Ensaio fermentativo em meio sintético completo contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX) utilizando-se a linhagem MA-B43. As cinéticas de consumo de glicose (círculos pretos), xilose (círculos brancos) e produção de etanol nas fermentações em glicose (triângulos pretos), xilose (triângulos brancos) ou glicose e xilose (quadrados brancos) foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizado DO_{600nm} inicial de 1,5 ($\pm 0,2$). Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

4.3.3.1 Fermentação de xilose por linhagens de laboratório sobre-expressando o gene *HXT1*

O transportador codificado pelo gene *HXT1* é considerado um transportador de baixa afinidade (K_m de 100 mM para glicose e 880 mM para xilose) embora codifique para uma permease considerada de alta capacidade (Maier et al., 2002; Reifengerger et al., 1997; Saloheimo et al., 2007). De maneira inesperada, a linhagem DLG-K1T1 (derivada da linhagem *hxt-null* DLG-K1), sobre-expressando o gene *HXT1* apenas,

não foi capaz de fermentar xilose quando este açúcar era a única fonte de carbono (Figura 16 e Tabela 7) apresentando consumo inferior a 5% de xilose. DLG-K1T1, entretanto, exibiu as maiores velocidades de consumo de glicose e produção de etanol em meio contendo somente glicose. De fato, em meio contendo somente glicose, toda a glicose presente no meio foi consumida em até 32 horas, com velocidade de consumo em média 1,8 vezes superior àquela exibida pela linhagem selvagem MA-B43. Enquanto que a produção de etanol pela linhagem DLG-K1T1 em meio contendo somente glicose foi $\approx 19\%$ superior àquela observada para a linhagem selvagem em glicose.

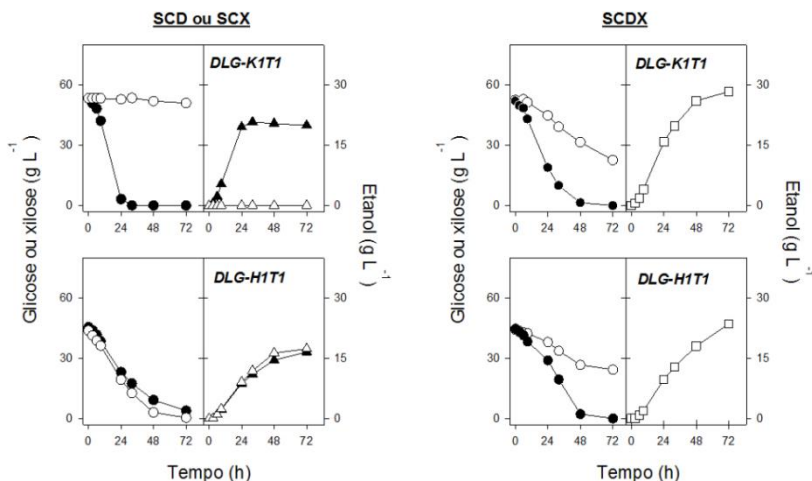
Nos ensaios de co-fermentação de glicose e xilose a linhagem DLG-K1T1 foi capaz de consumir não apenas toda a glicose, mas também 57% da xilose disponíveis (Figura 16 e Tabela 8), exibindo melhores velocidades de consumo tanto de glicose quanto de xilose quando comparado a linhagem MA-B43 (Tabela 8). Aliado a esta maior velocidade de consumo dos açúcares, a velocidade de produção de etanol também foi maior em DLG-K1T1 levando a uma produção de $\approx 25\%$ mais etanol quando comparado a linhagem selvagem.

Na Figura 16 é possível observar ainda a cinética de consumo de açúcares e produção de etanol da linhagem DLG-H1T1 (derivada da linhagem *hxt-knockout* DLG-H1), esta linhagem embora assim como a linhagem DLG-K1T1 possua também o gene *HXT1* sobre-expresso, não foi capaz de consumir toda a glicose presente no meio, quando esta era a única fonte de carbono. Com um consumo de 91% da glicose disponível, a linhagem DLG-H1T1 embora diferente da linhagem DLG-K1T1, possua os demais genes *HXT* intactos, produziu $\approx 17\%$ menos etanol que a linhagem DLG-K1T1 quando fermentando somente glicose.

Já em meio sintético contendo somente xilose, a presença de outros transportadores de hexose intactos na linhagem DLG-H1T1 parece ter sido fundamental para o transporte de xilose. Assim, o desempenho da linhagem DLG-H1T1 em meio contendo somente xilose foi idêntico àquela em meio contendo somente glicose (Figura 16), assim em meio contendo somente xilose, 99% desta pentose foi consumida. Como observado na Figura 16 a produção de etanol foi estatisticamente idêntica em glicose ou xilose.

Em meio co-fermentando glicose e xilose, entretanto, a linhagem DLG-H1T1 apresentou redução de 43% na velocidade de consumo de xilose (Figura 16, Tabela 7 e 8). Em co-fermentações de glicose e xilose enquanto toda a glicose pôde ser consumida em até 72 horas, somente 45% da xilose foi consumida neste meio.

Figura 16 – Ensaio fermentativos em meio sintético dropout (sem uracila), contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX), utilizando-se as linhagens DLG-K1T1 e DLG-H1T1. As cinéticas de consumo de glicose (círculos pretos), xilose (círculos brancos) e produção de etanol nas fermentações em glicose (triângulos pretos), xilose (triângulos brancos) ou glicose e xilose (quadrados brancos) foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $1,5 (\pm 0,3)$. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

4.3.3.2 Fermentação de xilose por linhagens de laboratório sobre-expressando o gene *HXT2*

Um padrão diferente de fermentação de glicose e/ou xilose foi observado para a linhagem expressando o transportador de açúcar de moderada-alta afinidade (K_m de 2-10 mM para glicose, e 130-390 mM para xilose, dependendo das condições de crescimento; Reifemberger et al., 1997; Maier et al., 2002; Saloheimo et al., 2007), codificado pelo gene *HXT2*. A linhagem DLG-K1T2 (derivada da linhagem *hxt-null* DLG-K1), sobre-expressando o gene *HXT2* apenas, apresentou fermentações relativamente truncadas com consumo dos açúcares não superior a 59% tanto em fermentações com glicose, xilose ou co-fermentações destes açúcares (Figura 17 e Tabela 7 e 8), embora ambos os açúcares tenham sido consumidos sob a mesma velocidade de consumo, tanto nas fermentações de um açúcar apenas quanto nas co-fermentações de glicose e xilose (Tabela 8).

Na Figura 17 é possível observar que o consumo similar de glicose e xilose pela linhagem DLG-K1T2 em meio sintético contendo somente glicose ou somente xilose culminou também na produção de quantidades muito semelhantes de etanol. Como pode ser observado na Tabela 7 as velocidades de produção de etanol são idênticas nestes diferentes meios.

A glicose é conhecida por promover a degradação da permease codificada por *HXT2* (Kruckeberg et al., 1999) e nossos resultados obtidos com a linhagem DLG-K1T2 apontam para o fato de que a xilose também pode estar direcionando esta degradação. Além disso, mesmo durante as co-fermentações de glicose e xilose ambos os açúcares foram consumidos sob as mesmas velocidades (Figura 17 e Tabela 8), sugerindo que estes açúcares não competem entre si pela permease codificada por *HXT2*, embora novamente, não mais do que 59% dos açúcares tenham sido consumidos e o rendimento em etanol foi, portanto, em média metade daquele observado para outras linhagens derivadas da DLG-K1 (Tabela 8).

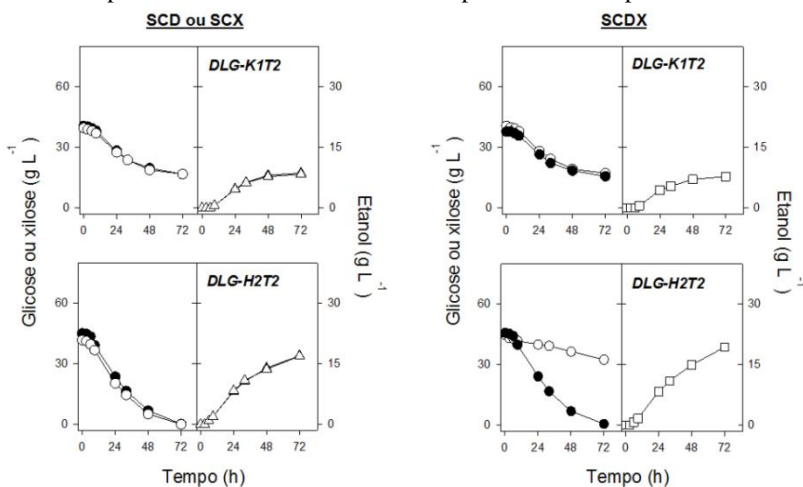
Nas fermentações utilizando-se a linhagem DLG-H2T2 (derivada da linhagem *hxt-knockout* DLG-H2, porém sobre-expressando o gene *HXT2*) as cinéticas de consumo de glicose e xilose separadamente foram também muito próximas entre si (Figura 17), nestas condições a presença de outros transportadores de hexose na linhagem contribuiu para a depleção destes açúcares em até 72 horas, com produção de etanol idêntica para cada uma das fontes de carbono.

Em meio co-fermentando glicose e xilose, DLG-H2T2 teve o seu desempenho dramaticamente reduzido para xilose onde apenas 27% deste açúcar foi consumido. Este baixo desempenho fermentativo de xilose contribuiu para que a produção de etanol fosse muito próxima entre as fermentações de glicose ou xilose e as co-fermentações destes açúcares (Figura 17).

Algum conhecimento sobre o mecanismo molecular de reconhecimento e transporte de açúcar pela permease codificada por *HXT2* já é conhecido (Kasahara e Maeda, 1998; Kasahara et al., 2004; 2006; 2007) e tem revelado que o transporte de glicose por esta permease não é inibido mesmo com um excedente de 200 vezes de xilose. Por algum motivo ainda não elucidado, a permease codificada pelo gene *HXT2* sobre-expresso quando na presença de outros transportadores da família *HXT* (linhagem DLG-H2T2) não repetiu o desempenho exibido quando este transportador foi sobre-expresso individualmente em uma linhagem *hxt-null* (linhagem DLG-K1T2).

De qualquer forma esta informação estrutural pode ser usada para engenheirar permeases, codificadas por genes *HXT*, mais adequadas para a fermentação dos açúcares presentes nos hidrolisados lignocelulósicos, uma questão que tem sido tratada somente recentemente (Ha et al., 2013; Young et al., 2012).

Figura 17 – Ensaio fermentativos em meio sintético dropout (sem uracila), contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX), utilizando-se as linhagens DLG-K1T2 e DLG-H2T2. As cinéticas de consumo de glicose (círculos pretos), xilose (círculos brancos) e produção de etanol nas fermentações em glicose (triângulos pretos), xilose (triângulos brancos) ou glicose e xilose (quadrados brancos) foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $1,5 (\pm 0,4)$. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

4.3.3.3 Fermentação de xilose por linhagens de laboratório sobre-expressando o gene *HXT5*

Um perfil semelhante com aquele observado para a linhagem DLG-K1T1, no que diz respeito à inabilidade de consumir xilose, foi observado com a linhagem sobre-expressando somente o transportador de moderada-alta afinidade (K_m de 10 mM para glicose, sem dados disponíveis para xilose; Buziol et al., 2002; Diderich et al., 2001) codificado pelo gene *HXT5*. Como pode ser observado na Figura 18 em meio sintético contendo somente glicose a linhagem DLG-K1T5 (derivada da linhagem *hxt-null* DLG-K1), sobre-expressando o gene

HXT5 apenas, foi capaz de consumir 56% da glicose, enquanto que em meio contendo somente xilose, o consumo desta pentose foi menor do que 2% deste açúcar, sem a produção de etanol. Trabalhos anteriores, entretanto, reportaram que a permease codificada pelo gene *HXT5* é capaz de transportar xilose e permite algum crescimento nesta fonte de carbono (Hamacher et al., 2002; Sedlak e Ho, 2004). Wahlbom e colaboradores (2003) citam que uma linhagem mutante sobre-expressando o gene *HXT5* teve sua capacidade fermentativa melhorada em meio contendo xilose, além disso, Hamacher e colaboradores (2002) colocam a permease codificada por *HXT5* entre àquelas de maior relevância, dentro da família de genes *HXT*, para o transporte de xilose.

Nas co-fermentações de glicose e xilose, DLG-K1T5 exibiu melhora no consumo de glicose, passando a consumir 64% deste açúcar, embora com velocidades de consumo de açúcares ainda baixas, provavelmente devido ao conhecido processo de degradação, desencadeado pela própria glicose, a que é sujeito a permease codificada por *HXT5* (van Suylekom et al., 2007). Assim como glicose, o consumo de xilose também foi melhorado nas co-fermentações destes açúcares, embora diferente do observado para a linhagem DLG-K1T1, com a linhagem DLG-K1T5 esta melhora foi muito discreta, de modo que somente 11% da xilose foi consumida nestas co-fermentações (Figura 18).

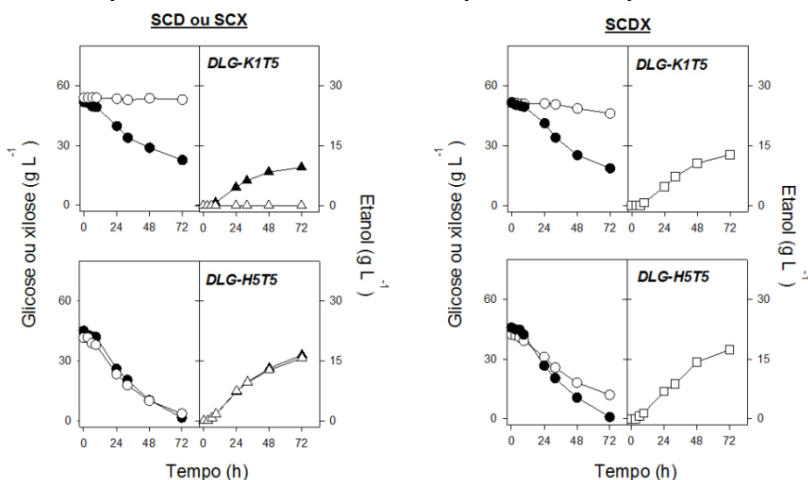
Devido, sobretudo ao maior consumo de glicose, nos ensaios de co-fermentação a linhagem DLG-K1T5 exibiu produção de etanol $\approx 25\%$ maior quando comparada às fermentações em meio contendo somente glicose.

Nossos resultados indicam, portanto que linhagens mutantes para esta permease com resistência para a inativação por açúcar (Horák, 2013), seriam uma estratégia promissora para melhorar a fermentação de xilose por linhagens de levedura recombinantes.

Diferente da linhagem DLG-K1T5 sobre-expressando apenas o gene *HXT5*, a linhagem DLG-H5T5 (derivada da linhagem *hxt-knockout* DLG-H5, porém sobre-expressando o gene *HXT5*), foi capaz de crescer e fermentar xilose tanto em meios contendo somente xilose, ou em meios co-fermentando glicose e xilose (Figura 18). De fato, as cinéticas de consumo de glicose e xilose e produção de etanol foram similares quando DLG-H5T5 fermentou estes açúcares separadamente. Assim, em fermentações de glicose apenas, houve um consumo de 96% deste açúcar enquanto que nas fermentações de xilose o consumo foi de 91% (Tabela 7).

Nas co-fermentações de glicose e xilose pôde-se observar uma clara preferência da linhagem DLG-H5T5 por glicose, sendo que a velocidade de consumo deste açúcar aumentou ao passo que a velocidade de consumo da xilose reduziu quando comparado aos meios contendo glicose e xilose separadamente. Nestes ensaios de co-fermentação houve o consumo de 98% da glicose e 71% da xilose disponível (Tabela 7 e 8). Embora uma quantidade considerável de xilose tenha sido consumida ao longo de 72 horas de fermentação, a produção de etanol teve um incremento de apenas $\approx 5\%$ nestes ensaios de co-fermentação de glicose e xilose quando comparado aos ensaios em que estes açúcares foram fermentados separadamente.

Figura 18 – Ensaios fermentativos em meio sintético dropout (sem uracila), contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX), utilizando-se as linhagens DLG-K1T5 e DLG-H5T5. As cinéticas de consumo de glicose (círculos pretos), xilose (círculos brancos) e produção de etanol nas fermentações em glicose (triângulos pretos), xilose (triângulos brancos) ou glicose e xilose (quadrados brancos) foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $1,5 (\pm 0,4)$. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

4.3.3.4 Fermentação de xilose por linhagens de laboratório sobre-expressando o gene *HXT7*

Assim como observado para a linhagem DLG-K1T2 sobre-expressando o gene *HXT2*, a linhagem sobre-expressando o transportador de alta afinidade codificado por *HXT7* (K_m de 1 mM para

glicose, e 130 mM para xilose; Maier et al., 2002; Reifemberger et al., 1997; Saloheimo et al., 2007) também consumiu e fermentou glicose e xilose com velocidades similares (Figura 19 e Tabela 7). Desta forma a linhagem DLG-K1T7 (derivada da linhagem *hxt-null* DLG-K1), sobre-expressando o gene *HXT7* apenas, consumiu 93% da glicose e 85% da xilose quando estes açúcares foram fermentados separadamente. Nestes ensaios a velocidade de consumo de glicose e xilose foram também muito próximas. Assim como a velocidade de consumo dos açúcares, a velocidade de produção de etanol foi estatisticamente idêntica (Tabela 7). Desta forma DLG-K1T7 foi a linhagem que mais consumiu xilose, com a maior produção de etanol (13,4 g L⁻¹) a partir deste açúcar, quando comparada as demais linhagens derivadas da DLG-K1 ou linhagem selvagem MA-B43.

Nos ensaios de co-fermentação de glicose e xilose (Figura 19), DLG-K1T7 foi capaz de co-fermentar ambos os açúcares, embora o consumo de xilose tenha sido abalado pela presença de glicose, sendo que o consumo de xilose ocorreu de forma mais consistente somente após a diminuição dos níveis de glicose no meio, provavelmente devido à saturação do transportador como mencionado por Subtil e Boles (2012). Assim enquanto que 95% da glicose foi consumida em até 72 horas, apenas 45% da xilose foi consumida nas co-fermentações. Apesar do consumo de 45% da xilose, a produção de etanol foi apenas 6% superior àquela observada em fermentações de glicose apenas.

A glicose é conhecida por inibir o consumo de pentoses, principalmente quando esta hexose encontra-se em altas concentrações no meio (Kuyper et al., 2005; Özcan e Johnston, 1999). Neste sentido a manutenção de baixas concentrações de glicose durante toda a co-fermentação aliado a sobre-expressão de transportadores tais como aquele codificado por *HXT7* podem, parcialmente, diminuir o efeito inibitório da glicose sobre a utilização de xilose (Subtil e Boles, 2012).

A clara preferência na utilização de glicose ao invés de xilose pelas linhagens recombinantes sobre-expressando apenas uma permease (linhagens derivadas da DLG-K1), exceto a linhagem DLG-K1T2 que exibiu velocidades de consumo idênticas para ambos os açúcares em co-fermentações, está em concordância com outros trabalhos (Hamacher et al., 2002; Kuyper et al., 2005; Subtil e Boles, 2012). Estudos têm demonstrado ainda que *S. cerevisiae* reconhece glicose de maneira muito diferente de xilose como substrato para a fermentação alcoólica, evidenciado principalmente pela grande diferença de afinidade exibida pelos transportadores codificados pelos genes *HXT* (Kötter e Ciriacy, 1993; Runquist et al., 2009; Sedlak e Ho, 2004;).

Os resultados observados neste trabalho com a sobre-expressão de genes *HXT* em linhagens *hxt-null* (DLG-K1T1, DLG-K1T2, DLG-K1T5 e DLG-K1T7) são particularmente interessantes, seja devido ao perfil de co-fermentação de glicose e xilose ou ainda pela produção de etanol dessas linhagens.

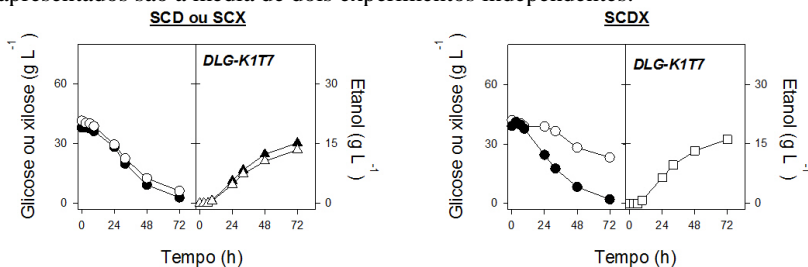
Hamacher e colaboradores (2002), utilizando uma linhagem de *S. cerevisiae* deletada para os 18 transportadores da família *HXT*, sobre-expressou individualmente os genes *HXT4*, *HXT7* ou *GAL2* e transformou àquela linhagem com um destes genes, obtendo desta forma três linhagens com diferentes transportadores sobre-expressos. Embora a expressão destes genes aliada à expressão moderada dos genes que codificam para a xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulocinase tenha permitido o crescimento destas linhagens em meio contendo 2% de xilose, este crescimento, no entanto foi muito lento, sendo que estas linhagens levaram vários dias para consumir toda a xilose sem, no entanto ser detectada a produção de etanol.

Saloheimo e colaboradores (2007) também empregaram a linhagem KY73 (*hxt-null*) como linhagem hospedeira para a sobre-expressão de genes *HXT*. Estes autores realizaram ensaios de crescimento a fim de analisar a cinética de consumo de xilose em linhagens sobre-expressando as permeases codificadas pelos genes *HXT1*, *HXT2*, *HXT4* e *HXT7*. Assim como observado por outros autores (Hamacher et al., 2002) estas linhagens também cresceram com dificuldade em meio contendo somente xilose, levando vários dias para o consumo de apenas 5% deste açúcar. Estes autores citam, entretanto que a adição de glicose (2 g L⁻¹) ou maltose (1 g L⁻¹) melhorou o consumo de xilose no começo dos crescimentos, quando a glicose ou maltose ainda estavam no meio.

Em ensaios fermentativos, Sedlak e Ho (2004), empregaram uma linhagem de *S. cerevisiae* recombinante, deletada para os genes *HXT1-7* expressando as enzimas xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulocinase. Esta linhagem foi então transformada com um dos genes sobre-expressos: *HXT1*, *HXT2*, *HXT4*, *HXT5* ou *HXT7*, obtendo desta forma cinco linhagens com diferentes transportadores. Em ensaios de co-fermentação de glicose e xilose as linhagens sobre-expressando os genes *HXT1* e *HXT2* apresentaram velocidades máxima de consumo de xilose respectivamente 32% e 34 % inferiores às linhagens equivalentes utilizadas nesta tese (DLG-K1T1 e DLG-K1T2) por outro lado as linhagens sobre-expressando os genes *HXT5* e *HXT7* apresentaram velocidades máxima de consumo de xilose respectivamente 78% e 14 % superiores às linhagens equivalentes utilizadas nesta tese (DLG-K1T5 e

DLG-K1T7). Estes últimos resultados refletem a incapacidade da linhagem sobre-expressando o gene *HXT5* (DLG-K1T5), utilizada nesta tese, em consumir xilose mesmo na presença de glicose ao passo que a linhagem sobre-expressando o gene *HXT7* (DLG-K1T7) sofreu drástica repressão pela glicose nos ensaios de co-fermentação de glicose e xilose, embora em meio contendo somente xilose DLG-K1T7 tenha exibido melhor consumo de xilose como discutido previamente (Figura 19, Tabela 8).

Figura 19 – Ensaios fermentativos em meio sintético dropout (sem uracila), contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX), utilizando-se a linhagem DLG-K1T7. As cinéticas de consumo de glicose (círculos pretos), xilose (círculos brancos) e produção de etanol nas fermentações em glicose (triângulos pretos), xilose (triângulos brancos) ou glicose e xilose (quadrados brancos) foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $1,5 (\pm 0,2)$. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

Além do transporte, o próprio catabolismo de glicose pode comprometer, em certo nível, a utilização de pentoses através da inibição e competição da glicose por enzimas envolvidas no catabolismo de xilose ou arabinose. Especialmente no caso da xilose, visto que a enzima xilose isomerase pode agir com uma legítima glicose isomerase (Bhosale e Rao, 1996; Subtil e Boles, 2012).

Alguns estudos revelam também importantes informações sobre a estrutura da permease codificada pelo gene *HXT7* (Kasahara e Kasahara, 2010; Kasahara et al., 2011) indicando que glicose e xilose competem em nível de transporte, mas que algumas permeases mutantes exibem reduzida inibição pelo transporte de glicose na presença de xilose, o que pode ajudar a desenvolver novos transportadores mais eficientes, em uma estratégia semelhante àquela citada para a permease codificada pelo gene *HXT2*.

Tabela 7- Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se linhagens *hxt-knockout* e *hxt-null* sobre-expressando algum gene *HXT* ou linhagem selvagem (MA-B43), transformadas com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR, em meios contendo glicose ou xilose.

Açúcar ^a /Linhagem	Característica relevante	Açúcar Consumido (%)	V_S (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^b	V_E (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^c	$Y_{E/S}$ (g g ⁻¹) ^d
Glicose					
MA-B43	<i>w.t</i>	100	1.40 ± 0.02	0.57 ± 0.08	0.39 ± 0.02
DLG-K1T1	<i>hxt null</i> mas <i>PGK1p HXT1-PGK1t</i>	100	2.50 ± 0.02	0.96 ± 0.03	0.39 ± 0.01
DLG-K1T2	<i>hxt null</i> mas <i>PGK1p HXT2-PGK1t</i>	59	0.63 ± 0.03	0.26 ± 0.00	0.36 ± 0.01
DLG-K1T5	<i>hxt null</i> mas <i>PGK1p HXT5-PGK1t</i>	56	0.67 ± 0.03	0.26 ± 0.00	0.33 ± 0.04
DLG-K1T7	<i>hxt null</i> mas <i>PGK1p HXT7-PGK1t</i>	93	0.79 ± 0.02	0.33 ± 0.07	0.43 ± 0.02
DLG-H1T1	<i>hxt1Δ</i> mas <i>PGK1p HXT1-PGK1t</i>	91	1.10 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.40 ± 0.02
DLG-H2T2	<i>hxt2Δ</i> mas <i>PGK1p HXT2-PGK1t</i>	100	1.10 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.38 ± 0.01
DLG-H5T5	<i>hxt5Δ</i> mas <i>PGK1p HXT5-PGK1t</i>	96	0.93 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.02

Continua na próxima página

Tabela 7 – Continuação.

Açúcar ^a /Linhagem	Característica relevante	Açúcar			
		Consumido (%)	V_s (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^b	V_E (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^c	$Y_{E/S}$ (g g ⁻¹) ^d
Xilose					
MA-B43	<i>w.t</i>	77	0.88 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.33 ± 0.02
DLG-K1T1	<i>hxt null mas PGK1p HXT1-PGKI</i>	< 5	0.03 ± 0.01	0	0
DLG-K1T2	<i>hxt null mas PGK1p HXT2-PGKI</i>	58	0.60 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.36 ± 0.00
DLG-K1T5	<i>hxt null mas PGK1p HXT5-PGKI</i>	< 2	0.03 ± 0.01	0	0
DLG-K1T7	<i>hxt null mas PGK1p HXT7-PGKI</i>	85	0.70 ± 0.02	0.29 ± 0.00	0.38 ± 0.01
DLG-H1T1	<i>hxt1Δ mas PGK1p HXT1-PGKI</i>	99	1.08 ± 0.02	0.45 ± 0.02	0.40 ± 0.01
DLG-H2T2	<i>hxt2Δ mas PGK1p HXT2-PGKI</i>	100	1.07 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.40 ± 0.02
DLG-H5T5	<i>hxt5Δ mas PGK1p HXT5-PGKI</i>	91	0.86 ± 0.03	0.37 ± 0.01	0.41 ± 0.01

FONTES: Este trabalho.

NOTAS: ^aAs fermentações foram realizadas em meio sintético (SC) completo ou dropout contendo os açúcares indicados por um período de 72 horas. ^bVelocidade de consumo volumétrico máximo de açúcar. ^cVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol. ^dRendimento baseado em g de etanol produzido por g de açúcar consumido. Os valores são a média de dois experimentos independentes.

Tabela 8 - Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se linhagens *hxt-knockout* e *hxt-null* sobre-expressando algum gene *HXT* ou linhagem selvagem (MA-B43), transformadas com o plasmídeo pAUR-XXXDHXR, em meios contendo glicose e xilose.

Linhagem ^a	Glicose		Xilose		V_E (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^d	$Y_{E/S}$ (g g ⁻¹) ^e
	Consumida (%)	V_G (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^b	Consumida (%)	V_X (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^c		
MA-B43	92	0.87 ± 0.01	46	0.42 ± 0.05	0.44 ± 0.00	0.39 ± 0.01
DLG-K1T1	100	1.65 ± 0.03	57	0.53 ± 0.02	0.77 ± 0.04	0.35 ± 0.02
DLG-K1T2	59	0.58 ± 0.01	58	0.61 ± 0.02	0.24 ± 0.00	0.17 ± 0.01
DLG-K1T5	64	0.66 ± 0.01	11	0.10 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.33 ± 0.07
DLG-K1T7	95	0.87 ± 0.02	45	0.44 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.29 ± 0.01
DLG-H1T1	100	1.11 ± 0.01	45	0.47 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.36 ± 0.01
DLG-H2T2	99	1.11 ± 0.02	27	0.17 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.34 ± 0.02
DLG-H5T5	98	1.00 ± 0.02	71	0.59 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.23 ± 0.01

FONTE: Este trabalho.

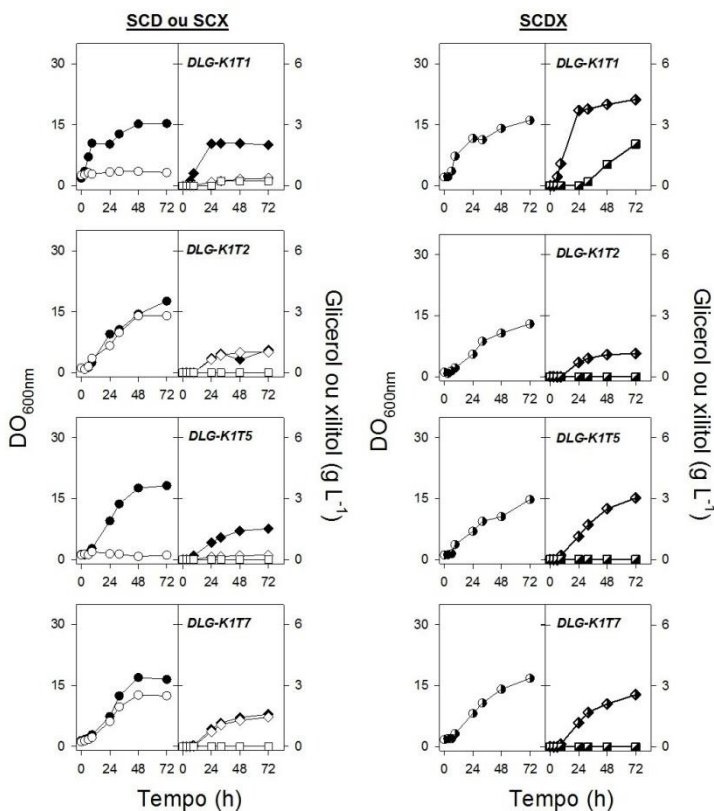
NOTAS: ^aAs fermentações foram realizadas em meio sintético (SC) completo ou Dropout contendo os açúcares indicados por um período de 72 horas. ^bVelocidade de consumo volumétrico máximo de glicose. ^cVelocidade de consumo volumétrico máximo de xilose. ^dVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol. ^eRendimento baseado em g de etanol produzido por g de açúcar consumido. Os valores são a média de dois experimentos independentes.

4.3.3.5 PRODUÇÃO DE GLICEROL, BIOMASSA E XILITOL NAS LINHAGENS DE LABORATÓRIO SOBRE-EXPRESSANDO GENES *HXT* E LINHAGEM MA-B43

Na Figura 20 são exibidos os gráficos de produção de glicerol, xilitol e biomassa celular pelas linhagens derivadas da DLG-K1. Estes parâmetros foram obtidos nas fermentações anaeróbias descritas previamente, em meio sintético completo ou dropout contendo glicose, xilose ou ambos os açúcares. Com exceção das linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T5, que não cresceram em meio contendo somente xilose (Figura 15 e 18), todas as demais linhagens foram capazes de crescer e fermentar nestes meios com a concomitante produção do metabólito glicerol, em concentrações que ficaram abaixo de 3 g L^{-1} e 5 g L^{-1} em meios contendo um açúcar apenas ou ambos os açúcares respectivamente. A produção de xilitol nestes ensaios foi muito baixa ou inexistente, com exceção da linhagem DLG-K1T1 que acumulou mais de 2 g L^{-1} de xilitol depois da depleção de glicose nos ensaios de co-fermentação (Figura 20). Acetato também foi produzido em níveis muito baixos ($<1 \text{ g L}^{-1}$) por todas as linhagens sobre-expressando algum gene *HXT*, enquanto que para a linhagem MA-B43 foi observada a produção de 3 g L^{-1} de acetato ao fim das fermentações de xilose e $1,5 \text{ g L}^{-1}$ durante as co-fermentações de glicose e xilose (dados não mostrados). Os valores aqui obtidos para a produção de xilitol, glicerol e ácido acético são próximos àqueles observados em linhagens de laboratório por Matsushika e colaboradores (2008c; 2009a; 2012) quando utilizando o mesmo plasmídeo integrativo para a sobre-expressão das enzimas do metabolismo de xilose utilizado nesta tese (plasmídeo pAUR-XKXDHR). Com relação à biomassa, todas as linhagens partiram de uma DO de $\approx 1,5$ alcançando ≈ 15 em até 72 horas, com exceção das linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T5 que não cresceram em meio contendo somente xilose.

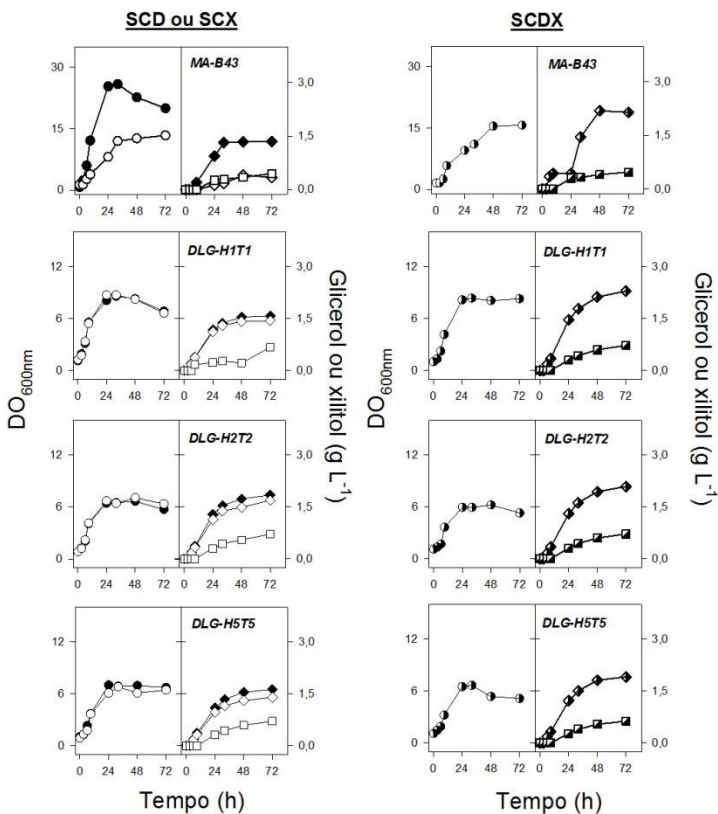
Na Figura 21 são exibidos os gráficos de produção de glicerol, xilitol e biomassa das linhagens DLG-H1T1, DLG-H2T2, DLG-H5T5 (linhagens *hxt-knockout*) e MA-B43. Estes parâmetros se referem às fermentações em meios contendo somente glicose, xilose ou ambos os açúcares. Estas linhagens *hxt-knockout*, que tiveram seus genes *HXT* restaurados e sobre-expressos, produziram em média menos glicerol do que as linhagens derivadas da DLG-K1 (Figura 20), ficando estes valores entre $1,4 \text{ g L}^{-1}$, valor obtido nas fermentações com a DLG-H5T5 em meio contendo somente xilose e $2,3 \text{ g L}^{-1}$, valor obtido com a DLG-H1T1 em co-fermentações de glicose e xilose. Com relação ao acúmulo de xilitol, os valores ficaram abaixo de 1 g L^{-1} em todos os ensaios.

Figura 20 – Produção de biomassa celular, glicerol e xilitol durante os ensaios fermentativos em meio sintético dropout (sem uracila), contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX), utilizando-se as linhagens DLG-K1T1, DLG-K1T2, DLG-K1T5 e DLG-K1T7. São mostradas abaixo as cinéticas de produção de biomassa a partir de glicose (círculos pretos), xilose (círculos brancos) ou glicose e xilose (círculos brancos e pretos), produção de glicerol a partir de glicose (losangos pretos), xilose (losangos brancos) ou glicose e xilose (losangos brancos e pretos), produção de xilitol a partir xilose (quadrados brancos) ou glicose e xilose (quadrados brancos e pretos). Estas cinéticas foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $1,5 (\pm 0,3)$. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

Figura 21 – Produção de biomassa celular, glicerol e xilitol durante os ensaios fermentativos em meio sintético completo ou dropout (sem uracila), contendo glicose (SCD), xilose (SCX) ou glicose e xilose (SCDX), utilizando-se as linhagens MA-B43, DLG-H1T1, DLG-H2T2 e DLG-H5T5. São mostradas abaixo as cinéticas de produção de biomassa a partir de glicose (círculos pretos), xilose (círculos brancos) ou glicose e xilose (círculos brancos e pretos), produção de glicerol a partir de glicose (losangos pretos), xilose (losangos brancos) ou glicose e xilose (losangos brancos e pretos), produção de xilitol a partir xilose (quadrados brancos) ou glicose e xilose (quadrados brancos e pretos). Estas cinéticas foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $1,2 (\pm 0,3)$. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

A produção de biomassa celular nestes ensaios foi sensivelmente menor que àquela observada para as linhagens sobre-expressando apenas um transportador (Figura 20), com exceção da linhagem MA-B43 todas as demais alcançaram em média DO igual a ≈ 7 a partir de uma DO inicial de $\approx 1,2$.

4.3.4 Linhagens industriais recombinantes

As linhagens industriais têm como características principais sua alta capacidade de fermentar quando expostas a altas concentrações de açúcar e capacidade de manter a viabilidade celular mesmo após vários ciclos, entre outros fatores que contribuíram para tornarem estes organismos fundamentais à indústria de etanol no Brasil (Amorim et al., 2011; Andrietta et al., 2007).

Visando analisar o desempenho de linhagens industriais de *S. cerevisiae* em meios que simulem um possível cenário encontrado no emprego de tecnologias e açúcares de primeira e segunda geração para a produção de etanol no Brasil, nós transformamos as linhagens industriais CAT-1 e GMY08 com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR, obtendo desta forma as linhagens MP-C5 e MP-G1 respectivamente (Tabela 1). Após a inserção da via para metabolização da xilose utilizando-se o plasmídeo acima, as referidas linhagens adquiriram a habilidade de crescer e fermentar em meios contendo xilose. Estas linhagens foram então submetidas a fermentações em batelada em meio rico (YP) contendo glicose, xilose, sacarose ou a mistura destes açúcares.

É geralmente aceito que a eficiente fermentação de xilose em etanol por *S. cerevisiae* não envolve apenas um passo limitante (Krahulec et al., 2010). No entanto a eficiente captação deste açúcar tem sido sugerida por diversos autores como um dos principais passos limitantes para a produção de etanol a partir de xilose ou de meios complexos, tais como hidrolisados lignocelulósicos, contendo xilose (Bertilsson et al., 2008; Hamacher et al., 2012). Como pôde ser observado neste trabalho, através do emprego de linhagens de laboratório, uma das barreiras para a eficiente captação de xilose em meios complexos deve-se ao fato de que o transporte de xilose será afetado quando quantidades elevadas de glicose estiverem no meio (Saloheimo et al., 2007). A linhagem industrial MP-G1, além de possuir a via para metabolismo da xilose, apresenta como característica adicional (característica herdada da linhagem parental GMY08) a ausência do gene que codifica para a invertase extracelular (linhagem *iSUC2*), portanto esta linhagem, diferentemente da MP-C5, não é capaz

de hidrolisar a sacarose extracelularmente. Esta característica como veremos a seguir conferiu clara vantagem para esta linhagem quando co-fermentando sacarose e xilose (YPSX), colocando esta linhagem em posição privilegiada, visto que a produção de etanol de lignocelulósicos no Brasil envolverá, muito provavelmente, a integração entre tecnologias de etanol de primeira e segunda geração, através do compartilhamento de energia e materiais e desta forma, a co-fermentação de sacarose e xilose (Dias et al., 2009; 2011 2012; Furlan et al., 2012; Macrelli et al., 2012).

Nos ensaios fermentativos em meio contendo somente glicose (YPD) as linhagens MP-C5 e MP-G1 exibiram desempenho idêntico no que se refere ao consumo de açúcar e produção de etanol, sendo capazes de consumir todo o açúcar ($\approx 4,5\%$) em menos de 6 horas. Estas linhagens exibiram também velocidades de consumo de glicose e de produção de etanol muito próximas (Figura 22 e Tabela 9).

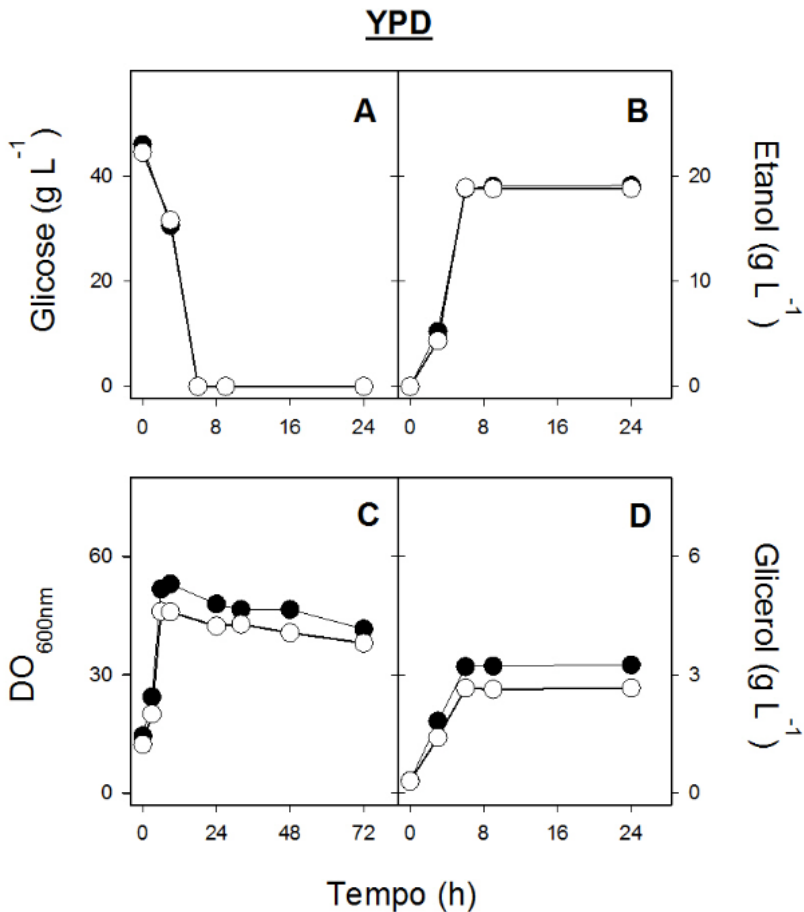
Tabela 9- Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se as linhagens industriais MP-C5 e MP-G1, transformadas com o plasmídeo pAUR-XXKDXR, em meios contendo glicose, xilose ou sacarose.

Açúcar ^a / Linhagem	Açúcar Consumido (%)	V_S (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^b	V_E (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^c	$Y_{E/S}$ (g g ⁻¹) ^d
Glicose				
MP-C5	100	10.21 ± 0.13	4.53 ± 0.04	0.42 ± 0.01
MP-G1	100	10.54 ± 0.11	4.85 ± 0.03	0.42 ± 0.02
Xilose				
MP-C5	95	0.70 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.36 ± 0.01
MP-G1	84	0.57 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.35 ± 0.02
Sacarose				
MP-C5	100	12.28 ± 0.08*	4.75 ± 0.03	0.48 ± 0.01
MP-G1	100	4.89 ± 0.04*	4.78 ± 0.02	0.46 ± 0.03

FONTES: Este trabalho.

NOTAS:^aAs fermentações foram realizadas em meio rico (YP) contendo os açúcares indicados por um período de 72 horas. ^bVelocidade de consumo volumétrico máximo de açúcar. ^cVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol. ^dRendimento baseado em g de etanol produzido por g de açúcar consumido. * Neste caso o valor apresentado refere-se à depleção de sacarose no respectivo meio, seja devido ao consumo deste açúcar ou sua simples hidrólise que libera glicose e frutose no meio. Os valores são a média de dois experimentos independentes.

Figura 22 – Ensaio fermentativos em meio rico contendo glicose (YPD) utilizando-se as linhagens MP-C5 e MP-G1. As cinéticas de consumo de glicose (A), produção de etanol (B), biomassa celular (C) e glicerol (D) nas fermentações com as linhagens MP-C5 (símbolos pretos) e MP-G1 (símbolos brancos) foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $13,5 (\pm 1,5)$. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

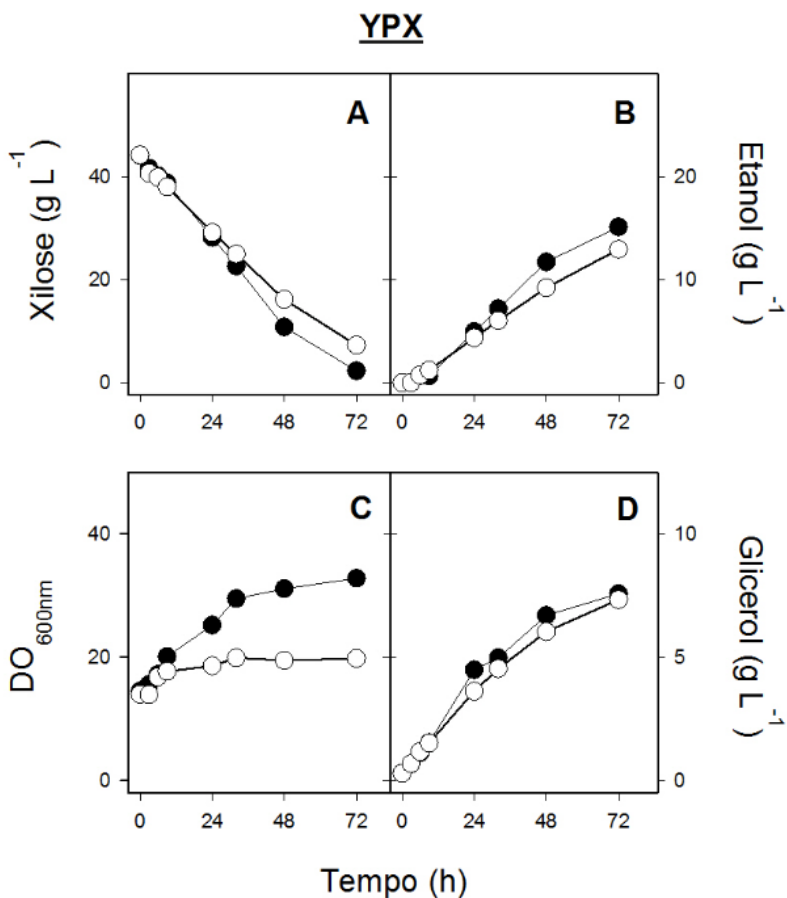
Nas fermentações de xilose apenas (Figura 23) a linhagem MP-C5 obteve vantagem sobre a linhagem MP-G1. Neste meio a linhagem MP-C5 consumiu 95% da xilose enquanto que a linhagem MP-G1 consumiu 84% deste açúcar. Este maior consumo de glicose fez com que a linhagem MP-C5 produzisse 13% a mais de etanol que MP-G1. Este desempenho superior de MP-C5 pode ser comprovado também pelas velocidades de consumo de açúcar e produção de etanol mostradas na Tabela 9. Nas fermentações em xilose a produção de glicerol foi muito próxima entre estas linhagens (Figura 23D), a produção de xilitol no entanto, foi um pouco maior em MP-C5 ($2,3 \text{ g L}^{-1}$) quando comparada a MP-G1 ($1,4 \text{ g L}^{-1}$). Notadamente a linhagem MP-G1, apesar do bom desempenho, teve pequeno crescimento em meio contendo somente xilose (Figura 23C).

As linhagens industriais não exibiram um excelente consumo de xilose quando esta era a única fonte de carbono no meio, apesar disto, este consumo foi equivalente a outras linhagens industriais: MA-T4 e MA-R4, utilizadas por Matsushika e colaboradores (2009a). Estas linhagens foram construídas com o mesmo plasmídeo para o metabolismo de xilose utilizado nesta Tese (pAUR-XKXDHXR), no trabalho citado as linhagens produziram respectivamente $14,1 \text{ g L}^{-1}$ e 16 g L^{-1} de etanol a partir de $\approx 4,5\%$ de xilose. Outra linhagem industrial transformada com este mesmo plasmídeo e estudada por estes autores foi MA-S4, esta linhagem, no entanto teve desempenho fermentativo muito inferior às linhagens citadas acima. Estes dados indicam que mesmo linhagens industriais com alto desempenho fermentativo podem exibir relativo baixo rendimento quando em meio contendo somente xilose, devido provavelmente a baixa indução conferida por este açúcar à expressão de transportadores com capacidade de transporte de xilose em *S. cerevisiae*.

Assim como observado em meio contendo somente glicose, em meio contendo somente sacarose, ambas as linhagens MP-C5 e MP-G1 consumiram todo o açúcar em menos de 6 horas, produzindo $\approx 19 \text{ g L}^{-1}$ de etanol e $2,3 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol cada uma das linhagens. Estas linhagens tiveram, portanto desempenho idêntico, de modo que as diferenças nas velocidades de consumo de sacarose observado na Tabela 9 devem-se ao método utilizado para tal cálculo que prima a velocidade de extinção da sacarose no meio, não podendo, portanto ser diferenciada a real captação deste substrato ou sua simples hidrólise extracelular. Desta forma a linhagem MP-C5, que é capaz de rapidamente hidrolisar a sacarose no meio extracelular, sem necessariamente consumi-la de imediato, exibiu velocidade de consumo (ou hidrólise) até 2,5 vezes maior que aquela

observada em MP-G1, linhagem esta que por sua vez exibe valores mais próximos ao real, visto que MP-G1 devido à ausência do gene que codifica para a invertase extracelular, primeiro internaliza a sacarose que será então catabolizada no citosol.

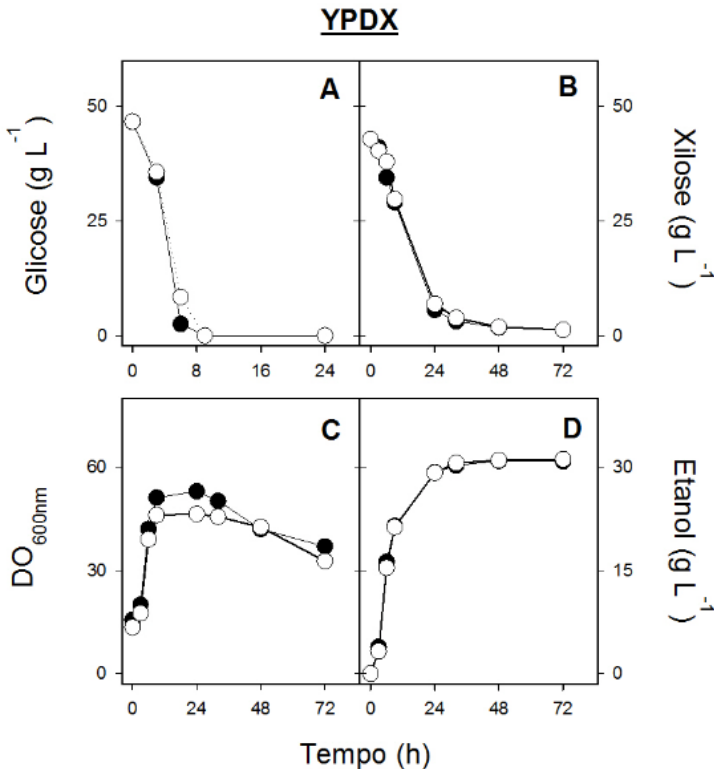
Figura 23 – Ensaio fermentativo em meio rico contendo xilose (YPX) utilizando-se as linhagens MP-C5 e MP-G1. As cinéticas de consumo de xilose (A), produção de etanol (B), biomassa celular (C) e glicerol (D) nas fermentações com as linhagens MP-C5 (símbolos pretos) e MP-G1 (símbolos brancos) foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $14,3 (\pm 0,4)$. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

Com relação aos ensaios de co-fermentação de açúcares, em meio contendo glicose e xilose, ambas as linhagens exibiram novamente perfis fermentativos muito próximos (Figura 24 e Tabela 10). Ambas consumiram toda a glicose e 97% da xilose com o mesmo rendimento em etanol, embora a velocidade de consumo destes açúcares tenha sido superior em MP-C5, assim como a velocidade de produção de etanol (Tabela 10). Nestes ensaios foi observado o acúmulo de $\approx 5,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicerol.

Figura 24 – Ensaios fermentativos em meio rico contendo glicose e xilose (YPDX) utilizando-se as linhagens MP-C5 e MP-G1. As cinéticas de consumo de glicose (A), xilose (B), produção de biomassa (C) e etanol (D) nas fermentações com as linhagens MP-C5 (símbolos pretos) e MP-G1 (símbolos brancos) foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $14,5 (\pm 1)$. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

Tabela 10- Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se as linhagens industriais MP-C5 e MP-G1, transformadas com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR, em meios contendo glicose e xilose.

Linhagem ^a	Glicose		Xilose		V_E (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^d	$Y_{E/S}$ (g g ⁻¹) ^e
	Consumida (%)	V_G (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^b	Consumida (%)	V_X (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^c		
MP-C5	100	10.66 ± 0.08	97	2.00 ± 0.01	4.13 ± 0.02	0.35 ± 0.01
MP-G1	100	9.09 ± 0.05	97	1.76 ± 0.02	4.05 ± 0.01	0.35 ± 0.01

FONTE: Este trabalho.

NOTAS:^aAs fermentações foram realizadas em meio rico (YP) contendo os açúcares indicados por um período de 72 horas.

^bVelocidade de consumo volumétrico máximo de glicose. ^cVelocidade de consumo volumétrico máximo de xilose. ^dVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol. ^eRendimento baseado em g de etanol produzido por g de açúcar consumido. Os valores são a média de dois experimentos independentes.

É sabido que o desvio de carbonos para a secreção de xilitol, o baixo rendimento fermentativo em xilose (quando comparado a glicose) e a repressão provocada por altas concentrações de glicose no transporte de xilose, constituem grandes obstáculos para a fermentação e co-fermentação de açúcares visando a obtenção de etanol de segunda geração (Krahulec et al., 2010; Subtil e Boles, 2012). Neste sentido o emprego de linhagens industriais com alto desempenho fermentativo em meios contendo glicose e xilose tem sido sugerido como uma alternativa a ser explorada para melhorar a cinética de consumo de xilose, em detrimento do restrito uso de linhagens de laboratório (Amorin et al., 2011; Matsushika et al., 2009a). Como observado neste trabalho, em fermentações com linhagens industriais em meios contendo $\approx 4,5$ % de glicose e xilose (Figura 24), a glicose não reprimiu a captação de xilose pelos transportadores de açúcar, como visto previamente para algumas linhagens de laboratório, de fato a presença da glicose melhorou em ≈ 3 vezes a velocidade de consumo de xilose (Tabelas 9 e 10), sendo que este perfil de co-fermentação de glicose e xilose é de fundamental importância quando o objetivo for a rápida e eficiente fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, visto que o consumo tardio de xilose, típico de linhagens recombinantes de laboratório de *S. cerevisiae* (Bertilsson et al., 2008; Hamacher et al., 2002; Jojima et al., 2010), tornaria a produção de etanol de segunda geração economicamente impraticável.

Nos ensaios de co-fermentação de sacarose e xilose ambas as linhagens MP-C5 e MP-G1 foram capazes de consumir toda a sacarose rapidamente e 98 e 99% da xilose respectivamente (Figura 25A e 25B). Nestas co-fermentações a xilose foi consumida com velocidade em média 1,4 vezes superior para MP-C5 e 1,6 vezes superior para MP-G1 quando comparado às co-fermentações em glicose e xilose. Apesar de ambas as linhagens terem consumido quantidades semelhantes de sacarose e xilose, a linhagem MP-G1 produziu 23% a mais de etanol que a linhagem MP-C5.

Assim, embora a linhagem MP-G1 tenha partido de uma concentração inicial de sacarose um pouco superior (14%), esta linhagem teve disponível uma quantidade menor de xilose (15%) quando comparado a linhagem MP-C5, sendo, portanto esta maior produção de etanol, atribuído ao melhor desempenho da linhagem MP-G1 neste meio. Estes dados são corroborados pela maior velocidade de produção de etanol (em média 26 % superior à MP-C5) e rendimento exibido por MP-G1 (Tabela 11). Este melhor desempenho da MP-G1 em meio YPSX pode ser atribuído, portanto a ausência da invertase

extracelular, visto que linhagens *iSUC2*, tais como MP-G1, mostram uma drástica redução no acúmulo de glicose e frutose extracelular quando comparado a linhagens *SUC2* (Amorin et al., 2011; Basso et al., 2011).

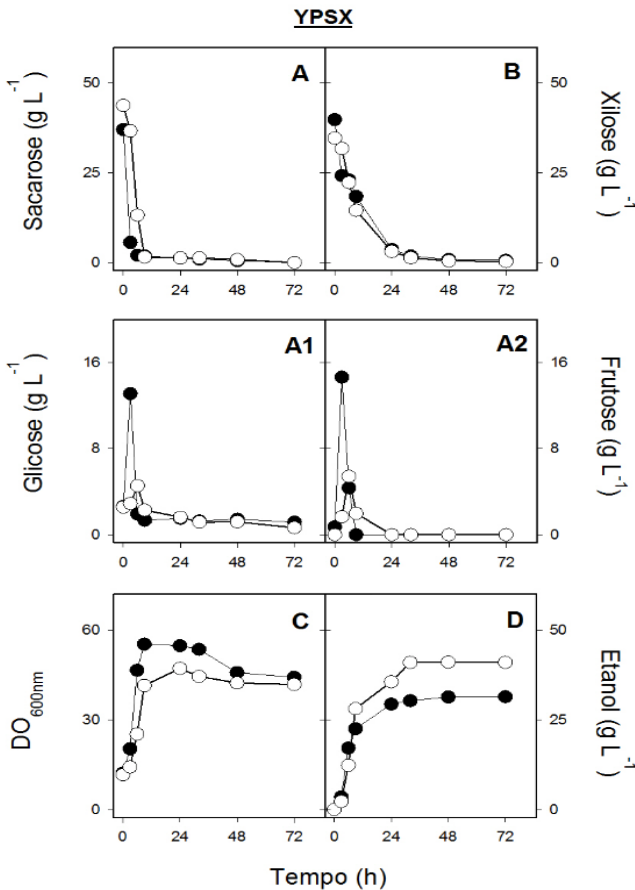
Esta hidrólise extracelular de sacarose fica evidente na Figura 25 (A1 e A2) onde a linhagem MP-C5 teve pico de 13 g L^{-1} de glicose e 15 g L^{-1} de frutose ao passo que a linhagem MP-G1 (*iSUC2*) teve picos de 4 g L^{-1} de glicose e 3 g L^{-1} de frutose. Neste sentido a presença em níveis mais baixos destes monossacarídeos em cultivos com a linhagem MP-G1 pode ter contribuído para uma menor competição dos açúcares glicose e xilose pelos mesmos transportadores de hexose (Hamacher et al., 2002; Subtil e Boles, 2012). Assim, a captação da sacarose diretamente para o citosol por outros transportadores foi fundamental para possibilitar a captação de xilose via transportadores de hexose, codificados pelos genes *HXT*, com maior eficiência.

Apesar da clara vantagem exibida pela linhagem MP-G1 em co-fermentações de sacarose e xilose, ambas as linhagens aparecem como uma opção promissora ao emprego em ambientes competitivos e com diferentes fontes de carbono, pois ambas as linhagem exibiram maiores velocidades de consumo de xilose em co-fermentações do que em fermentações de xilose apenas, sendo que nas co-fermentações de xilose a sacarose foi o substrato que possibilitou as mais elevadas velocidades de consumo de xilose vistas neste trabalho, com destaque, como já mencionado, para a linhagem MP-G1 (*iSUC2*). Neste sentido além dos benefícios previamente atribuídos às linhagens *iSUC2*, tais como a menor suscetibilidade à contaminação do meio por outros microrganismos e diminuição da pressão osmótica ocasionada por altas concentrações de monossacarídeos (Amorin et al., 2011), a eficiente fermentação de xilose observada em nossos ensaios com a linhagem MP-G1 aponta para o uso de linhagens *iSUC2* como uma eficiente estratégia para a fermentação de misturas provenientes dos açúcares de primeira e segunda geração (sacarose e xilose) no Brasil, pois para a eficiente produção de etanol de segunda geração as linhagens devem fundamentalmente ser robustas e capazes de co-fermentar hexoses e pentoses com altas velocidades de consumo (Oreb et al., 2012).

Nos ensaios com as linhagens industriais o ácido acético foi detectado em concentrações inferiores a $0,7 \text{ g L}^{-1}$ em todos os meios. Nossos dados mostram ainda que estas linhagens industriais acumularam em média 4 vezes mais glicerol do que as linhagens de laboratório. Embora por motivos ainda não claros, a maior produção de

glicerol registrada neste trabalho ocorreu principalmente em meios contendo xilose, em fermentações ou co-fermentações.

Figura 25 – Ensaio fermentativo em meio rico contendo sacarose e xilose (YPSX) utilizando-se as linhagens MP-C5 e MP-G1. As cinéticas de consumo de sacarose (A), xilose (B), glicose (A1), frutose (A2), produção de biomassa (C) e etanol (D) nas fermentações com as linhagens MP-C5 (símbolos pretos) e MP-G1 (símbolos brancos) foram determinadas como descrito em Materiais e Métodos. A glicose e a frutose (A1 e A2, respectivamente) são produtos da hidrólise enzimática da sacarose durante as fermentações. Nestes ensaios foi utilizada DO_{600nm} inicial de $12 (\pm 0,4)$. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes.



FONTE: Este trabalho.

Tabela 11- Velocidades e rendimentos para fermentações anaeróbias em batelada utilizando-se as linhagens industriais MP-C5 e MP-G1, transformadas com o plasmídeo pAUR-XKXDHXR, em meios contendo sacarose e xilose.

Linhagem ^a	Sacarose		Xilose		V_E (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^d	$Y_{E/S}$ (g g ⁻¹) ^e
	Consumida (%)	V_{SE} (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^b	Consumida (%)	V_X (g L ⁻¹ h ⁻¹) ^c		
MP-C5	100	10.49 ± 0.09*	98	2.80 ± 0.02	3.17 ± 0.03	0.41 ± 0.01
MP-G1	100	7.82 ± 0.05*	99	2.87 ± 0.02	4.31 ± 0.08	0.53 ± 0.02

FONTE: Este trabalho.

NOTAS:^aAs fermentações foram realizadas em meio rico (YP) contendo os açúcares indicados por um período de 72 horas..

^bVelocidade de consumo volumétrico máximo de sacarose. ^cVelocidade de consumo volumétrico máximo de xilose. ^dVelocidade de produção volumétrica máxima de etanol. ^eRendimento baseado em g de etanol produzido por g de açúcar consumido. * Neste caso o valor apresentado refere-se à depleção de sacarose no respectivo meio, seja devido ao consumo deste açúcar ou sua simples hidrólise que libera glicose e frutose no meio. Os valores são a média de dois experimentos independentes.

5 CONCLUSÃO

Com o objetivo de contribuir para a otimização da fermentação de xilose por leveduras recombinantes, o presente trabalho analisou o genoma de *S. arborariae* na procura de novos transportadores de açúcares, bem como analisou a contribuição dos transportadores *HXT* de *S. cerevisiae* na fermentação de xilose por linhagens recombinantes contendo os genes para a metabolização de xilose. A partir destes dados conclui-se que:

- No genoma de *Spathaspora arborariae* foram encontradas dez sequências que codificam para possíveis transportadores de açúcares, enquanto que os genes que codificam para enzimas do metabolismo de xilose aparentemente são encontrados em apenas uma cópia no genoma, ressaltando a importância do transporte na fermentação de açúcares por leveduras.
- As linhagens de *S. cerevisiae* deletadas para os genes *HXT1*, *HXT2*, *HXT3*, *HXT4* ou *HXT5* (*hxt-knockout*), não foram capazes de produzir etanol utilizando xilose como fonte de carbono.
- A sobre-expressão dos genes *HXT1*, *HXT2* ou *HXT5* nas linhagens *hxt-knockout*, permitiu que estas linhagens recuperassem a habilidade de fermentar xilose.
- A permease codificada pelo gene *HXT1* (expressa em uma linhagem *hxt-null*) exibiu as mais elevadas velocidades de consumo de glicose, entretanto esta permease não permitiu o consumo de xilose como fonte de carbono. A permease codificada pelo gene *HXT5* também não permitiu a fermentação de xilose. No entanto, na co-fermentação de glicose e xilose, ambos os açúcares foram fermentados pela linhagem sobre-expressando o gene *HXT1*.
- A permease codificada pelo gene *HXT2* foi o transportador que permitiu o consumo de xilose com velocidade semelhante àquela observada com glicose. Esta permease, no entanto permitiu a fermentação de menos de 58% do açúcar disponível, exibindo baixo rendimento em etanol.
- A permease codificada pelo gene *HXT7* permitiu a eficiente fermentação de glicose ou xilose, no entanto em ensaios de co-fermentação a xilose só pôde ser consumida após a glicose ter sido extinta do meio.
- As linhagens industriais recombinantes foram capazes de fermentar xilose, sendo que as co-fermentações de xilose com sacarose foram mais eficientes na linhagem que também foi modificada na forma de fermentar a sacarose (alelo *iSUC2*).

Em suma, nossos resultados indicam que nenhum dos transportadores codificados pelos genes *HXT* de *S. cerevisiae* aqui analisados possui características ótimas para a eficiente fermentação de xilose. Com relação às linhagens industriais, nossos resultados indicam que a utilização de linhagens industriais *iSUC2* pode representar um importante avanço para a produção de bioetanol no Brasil.

6. REFERÊNCIAS

- ALVARADO, E.; BALLOU, L.; HERNANDEZ, L. M.; BALLOU, C. E. Localization of α 1-3-linked mannoses in the n-linked oligosaccharides of *Saccharomyces cerevisiae* *mnn* mutants. **Biochemistry**, v. 29, p. 2471-2482, 1990.
- AMORE, R.; WILHELM, M.; HOLLENBERG, C. P. The fermentation of xylose— an analysis of the expression of bacillus and actinoplanes xylose isomerase genes in yeast. **Appl Environ Microbiol**, v. 30, p. 351–357, 1989.
- AMORIN, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 91, p. 1267–1275, 2011.
- ANDJELKOVIC, U.; PICURIC, S.; VUJCIC, Z. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. **Food Chem**, v. 120, p. 799-804, 2010.
- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol–Brazil, 30 years of Proálcool. **Int Sugar J**, v. 109, p.195–200, 2007.
- ANFAVEA (associação Nacional dos fabricantes de veículos automotores). **Carta da Anfavea**. disponível em <<http://www.anfavea.com.br/cartas/Carta320.pdf>>. Acesso em: 01 Ago. 2013.
- ARRUDA, L. M. O.; VITOLO, M. Characterization of invertase entrapped into calcium alginate beads. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 81, p. 23-33, 1999.

- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**, 2 ed. New York: Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons, 1512p. 1992.
- BABRZADEH, F.; JALILI, R.; WANG, C.; SHOKRALLA, S.; PIERCE, S.; ROBINSON-MOSHER, A.; NYREN, P.; SHAFER, R. W.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; DAVIS, R. W.; RONAGHI, M.; GHARIZADEH, B.; STAMBUK, B. U. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Mol Genet Genomics**, v. 287, p.485–494. 2012.
- BADOTTI, F.; BATISTA, A.; STAMBUK, B. U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Braz Arch Biol Technol**, v. 49, p.115-123, 2006.
- BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ALVES, S.; CORDIOLI, M.; MILETTI, L.; DE ARAUJO, P.; STAMBUK, B. U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb Cell Fact**, v. 7, p. 2-11, 2008.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res**, v. 8, p.1155–1163, 2008.
- BASSO, T. O.; DE KOK, S.; DARIO, M.; DO ESPIRITO-SANTO, J. C. A.; MÜLLER, G.; SCHLÖLG, P. S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, J.-M.; GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; STAMBUK, B. U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metab Eng**, v. 13, n. 6, p. 694-703, 2011.
- BATISTA, A. S.; MILETTI, A. S. B. L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **J Mol Microbiol Biotech**, v. 8, p.26–33, 2004.
- BENGTSSON, O.; HAHN-HÄGERDALL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation

- by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Biofuels**, v.2, p. 1-10, 2009.
- BERTILSSON, M.; ANDERSSON, J.; LIDÉN, L. Modeling simultaneous glucose and xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* from kinetics and gene expression of sugar transporters. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 31, p. 369–377, 2008.
- BHOSALE, S. H.; RAO, M. B.; DESHPANDE, V. V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. **Microbiol Rev**, v. 60, p. 280-300, 1996.
- BOLES, E.; HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiol Rev**, v. 21, p. 85-111, 1997.
- BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, p. 2304–2311, 2009.
- BRODEUR, G.; YAU, E.; BADAL, K.; COLLIER, J.; RAMACHANDRAN, K. B.; RAMAKRISHNAN, S. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. **Enzyme Res**, v. 2011, p. 1-17, 2011.
- BROWN, N. A.; CASTRO, P. A.; FIGUEIREDO, B. C. P.; SAVOLDI, M.; BUCKERIDGE, M. S.; LOPES, M. L.; PAULLILO, S. C. L.; BORGES, E. P.; AMORIM, H. V.; GOLDMAN, M. H. S.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, G. H. Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Res**, v. 13, p. 277–290, 2013.
- BRUINENBERG, P. M.; JONKER, R.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Utilization of formate as an additional energy source by glucose limited chemostat cultures of *Candida utilis* CBS 621 and *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 – evidence for the absence of transhydrogenase activity in yeasts. **Arch Microbiol**, v. 142, p. 302–306, 1985.
- BUZIOL, S.; BECKER, J.; BAUMEISTER, A.; JUNG, S.; MAUCH, K.; REUSS, M.; BOLES, E. Determination of in vivo kinetics of the

starvation-induced Hxt5 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res**, v. 2, p. 283-291, 2002.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; DUSSÁN, K. J.; RODRIGUES, R. C.; SILVA, S. S.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J.; GOMES, F. C.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, v. 7, e43135, 2012.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J.; MOURO, A.; PROMPT, A. H.; GOMES, F. C.; STAMBUK, B. U.; LACHANCE, M. A.; 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, p. 421-431, 2013.

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

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresour Technol**, v. 101, p. 4754–4766, 2010.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresour Technol**, v. 98, p. 2415–2457, 2007.

CARROLL, A.; SOMERVILLE, C. Cellulosic biofuels. *Annu. Rev. Plant Biol*, v. 60, p. 165–182, 2009.

CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNA swith different 50 ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**, v. 28, p. 145–154, 1982.

CASPETA, L.; BUIJS, N. A. A.; NIELSEN, J. The role of biofuels in the future energy supply. **Energy Environ Sci**, v. 6, p. 1077–1082, 2013.

- CAVALIERI, D.; MCGOVERN, P. E.; HARTL, D. L.; MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. **J Mol Evol**, v. 57, p.S226–S232, 2003.
- CERQUEIRA, D. A.; RODRIGUES, G.; MEIRELES, C. D. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. **Carbohydr Polym**, v. 69, p. 579–582, 2007.
- CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; SINGH, A.; KUHAD, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresour Technol**, v. 98, p. 1947–1950, 2007.
- CHENG, K. K.; CAI, B. Y.; ZHANG, J. A.; LING, H. Z.; ZHOU, Y. J.; GE, J. P.; XU, J. M. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochem Eng J**, v. 38, p.105–109, 2008.
- CONANT, G. C.; WOLFE, K. H. Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. **Mol Syst Biol**, v. 3, p. 1-13, 2007.
- DA CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L. R.; SEHNEM, N. T.; DE SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresour Technol**, v. 102, p. 4218–4225, 2011.
- DANTAS, G. A.; LEGEY, L. F. L.; MAZZONE, A. Energy from sugarcane bagasse in Brazil: An assessment of the productivity and cost of different technological routes. **Renew Sust Energ Rev**, v. 21, p. 356–364, 2013.
- DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 979–991, 2013.
- DENG, X. X.; HO, N. W. Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned

- xylulokinase gene. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 24-25, p. 193–199, 1990.
- DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V. Simulation of integrated first and second generation bioethanol production from sugarcane: comparison between different biomass pretreatment methods. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 955–966, 2011.
- DIAS, M. O. S.; ENSINAS, V. A.; NEBRA, S. A.; MACIEL FILHO, R.; 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. **Chem Eng Res Des**, v. 87, p. 1206–1216, 2009.
- DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M.P.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V.; FILHO, R. M.; BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresour Technol**, v. 103, p. 152–161, 2012.
- DIDERICH, J. A.; SCHEPPER, M.; VAN HOEK, P.; LUTTIK, M. A. H.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T.; KLAASSEN, P.; BOELEN, H. F. M.; DE MATTOS, M. J. T.; VAN DAM, K.; KRUCKEBERG, A. L. Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 274, p. 15350–15359, 1999.
- DIDERICH, J. A.; SCHUURMANS, J. M.; VAN GAALLEN, M. C.; KRUCKEBERG, A. L.; VAN DAM, K. Functional analysis of the hexose transporter homologue Hxt5 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 18, p. 1515–1524, 2001.
- DU, J.; LI, S.; ZHAO, H. Discovery and characterization of novel D-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. **Mol Biosyst**, v. 6, p. 2150–2156, 2010.
- ECHEGARAY, O. F.; CARVALHO, J. C. M.; FERNANDES, A. N. R.; SATO, S.; AQUARONE, E.; VITOLO, M. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. **Biomass**

Bioeng, v. 19, p. 39-50, 2000.

ELBING, K.; LARSSON, C.; BILL, R. M.; ALBERS, E.; SNOEP, J. L.; BOLES, E.; HOHMANN, S.; GUSTAFSSON, L. Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, p. 5323-5330, 2004.

ELIASSON, A.; BOLES, E.; JOHANSSON, B.; OSTERBERG, M.; THEVELEIN, J. M.; SPENCER-MARTINS, I.; JUHNKE, H.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylulose fermentation by mutant and wild-type strains of *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 53, p. 376-382, 2000a

ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, C. F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, p. 3381-3386; 2000b.

FERREIRA, C.; VAN VOORST, F.; MARTINS, A.; NEVES, L.; OLIVEIRA, R.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; LUCAS, C.; BRANDT, A. A Member of the Sugar Transporter Family, St11p Is the Glycerol/H⁺ Symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell**, v. 16, p. 2068-2076, 2005.

FERREIRA-LEITÃO, V.; PERRONE, C. C.; RODRIGUES, J.; FRANKE, A. P. M.; MACRELLI, S.; ZACCHI, G. An approach to the utilisation of CO₂ as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, p.1-8. 2010.

FIAUX, J.; CAKAR, Z. P.; SONDEREGGER, M.; WÜTHRICH, K.; SZYPERSKI, T.; SAUER, U. Metabolic-flux profiling of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. **Eukaryot Cell**, v. 2, p. 170-180, 2003.

FURLAN, F. F.; COSTA, C. B. B.; FONSECA, G. C.; SOARES, R. P.; SECCHI, A. R.; CRUZ, A. J. G.; GIORDANO, R. C. Assessing the production of first and second generation bioethanol from sugarcane through the integration of global optimization and process detailed modeling. **Comput Chem Eng**, v. 43, p. 1-9. 2012.

- GARDONYI, M.; HAHN-HAGERDAL, B. The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbiol Technol**, v. 32, p. 252–259, 2003.
- GASCÓN, S.; NEUMANN, N. P.; LAMPEN, J. O. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. **J Biol Chem**, v. 243, p. 1573-1577, 1968.
- GIETZ, D.; ST. JEAN, A.; WOODS, R. A.; SCHIESTL, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. **Nucleic Acids Res**, v.20, p.1425; 1992.
- GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546-567, 1996.
- GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v. 315, p. 808–810, 2007.
- GOLDEMBERG, J.; GUARDABASSI, P. The potential for first-generation ethanol production from sugarcane. **Biofuels Bioprod Bioref**, v. 4, p.17–24, 2010.
- GOLDEMBERG, J. The brazilian biofuels industry. **Biotech Biofuels**, v.1, p. 1-6, 2008.
- GOLDENTHAL, M. J.; COHEN, J. D.; MARMUR, J. Isolation and Characterization of a Maltose Transport Mutant in the Yeast *Saccharomyces cerevisia*. **Curr Genet**, v. 7, p. 195-199, 1983.
- GONÇALVES, D. L. **Produção de álcool combustível a partir de hidrolizados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar por leveduras industriais e leveduras fermentadoras de xilose**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2010.

- GREIG, D.; TRAVISANO, M. The Prisoner's Dilemma and polymorphism in yeast *SUC* genes. **Proc Biol Sci**, v. 271, p. S25-S26, 2004.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOGG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast. **Enzyme Microbial Technol**, v. 16, p. 933-943, 1994.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 74, p. 937-953, 2007.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; WAHLBOM, C. F.; GÁRDONYI, M.; VAN ZYL, W. H.; OTERO R. R. C.; JONSSON, L. J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization, **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 73, p. 53-84, 2001.
- 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. **Microbiol**, v. 148, p. 2783-2788, 2002.
- HA, S. J.; KIM, H.; LIN, Y.; JANG, M. U.; GALAZKA, J. M.; KIM, T. J.; CATE, J. H.; JIN, Y. S. Single amino acid substitutions in HXT2.4 from *Scheffersomyces stipitis* lead to improved cellobiose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 79, p.1500-1507, 2013.
- HERNÁNDEZ-SALAS, J. M.; VILLA-RAMÍREZ, M. S.; VELOZ-RENDÓN, J. S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K. N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R. A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M. A.; TREJO-ESTRADA, S. R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresour Technol**, v. 100, p. 1238-1245, 2009.
- HICKERT, L. R.; DE SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. **Bioresour Technol**, v. 143, p. 112-116, 2013.

- HOLT, C.; YANDELL, M. MAKER2: an annotation pipeline and genome-database management tool for second-generation genome projects. **BMC Bioinformatics**, v. 12, p. 491-505, 2011.
- HORÁK, J. Regulations of sugar transporters: insights from yeast. **Curr Genet**, v. 59, p. 1-31, 2013.
- HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 94, p. 205-14, 2012.
- HUSON, D. H.; RICHTER, D. C.; RAUSCH, C.; DEZULIAN, T.; FRANZ, M.; RUPP, R. Dendroscope – An interactive viewer for large phylogenetic trees. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 1-6, 2007.
- JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Curr Opin Biotechnol**, v. 7, p. 320–326, 2006.
- JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y-SU.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnol**, v. 25, p.319-326, 2007.
- JEPPSSON, M.; TRÄFF, K.; JOHANSSON, B.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Effect of enhanced xylose reductase activity on xylose consumption and product distribution in xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res**, v. 3, p. 167–175, 2003.
- JIN, Y. S.; NI, H.; LAPLAZA, J. M.; JEFFRIES, T. W. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 495–503, 2003.
- JOHANSSON, B.; HAHN-HÄGERDAL, B. The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001. **FEMS Yeast Res**, v. 2, p. 277–282, 2002.

- JOJIMA, T.; OMUMASABA, C. A.; INUI, M.; YUKAWA, H. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, p. 471-480, 2010.
- KANG, Y. S.; KANE, J.; KURJAN, K.; STADEL, J. M.; TIPPER, D. J. Effects of expression of mammalian G alpha and hybrid mammalian-yeast G alpha proteins on the yeast pheromone response signal transduction pathway. **Mol Cell Biol**, v. 10, p. 2582–2590, 1990.
- KARHUMAA, K.; FROMANGER, R.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M-F. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 73, p. 1039–1046, 2007a.
- KARHUMAA, K.; GARCIA SANCHEZ, R.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Comparison of the xylose reductase-xylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb Cell Fact**, v. 6, p. 1-10, 2007b.
- KARHUMAA, K.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering. **Yeast**, v. 22, p. 359–368, 2005.
- KASAHARA, M.; MAEDA, M. Contribution to substrate recognition of two aromatic amino acid residues in putative transmembrane segment 10 of the yeast sugar transporters Gal2 and Hxt2. **J Biol Chem**, v. 273, p. 29106-29112, 1998.
- KASAHARA, T.; ISHIGURO, M.; KASAHARA, M. Comprehensive chimeric analysis of amino acid residues critical for high affinity glucose transport by Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 279, p. 30274-30278, 2004.
- KASAHARA, T.; ISHIGURO, M.; KASAHARA, M. Eight amino acid residues in transmembrane segments of yeast glucose transporter Hxt2 are required for high affinity transport. **J Biol Chem**, v. 281, p. 18532-18538, 2006.

- KASAHARA, T.; KASAHARA, M. Identification of a key residue determining substrate affinity in the yeast glucose transporter Hxt7: a two-dimensional comprehensive study. **J Biol Chem**, v. 285, p. 26263-26268, 2010.
- KASAHARA, T.; MAEDA, M.; ISHIGURO, M.; KASAHARA, M. Identification by comprehensive chimeric analysis of a key residue responsible for high affinity glucose transport by yeast *HXT2*. **J Biol Chem**, v. 282, p. 13146-13150, 2007.
- KASAHARA, T.; SHIMOGAWARA, K.; KASAHARA, M. Crucial effects of amino acid side chain length in transmembrane segment 5 on substrate affinity in yeast glucose transporter Hxt7. **Biochemistry**, v. 50, p. 8674-8681, 2011.
- KASS-EISLER, A.; GREIDER, C. W. Recombination in telomere-length maintenance. **Trends Biochem Sci**, v. 25, p. 200–204. 2000.
- 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 Microb Technol**, v. 43, p. 115–119, 2008.
- KATAHIRA, S.; MIZUIKE, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and celooligosaccharide-assimilating yeast strain. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, p. 1136–1143, 2006.
- KELLIS, M.; BIRREN, B. W.; LANDER, E. S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 428, p. 617-624, 2004.
- KIM, S. R.; HA, S-J.; KONG, I. I.; JIN, Y-S. High expression of *XYL2* coding for xylitol dehydrogenase is necessary for efficient xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Metab Eng**, v. 14, p. 336–343, 2012.
- KIM, S. R.; PARK, Y. C.; JIN, Y. S.; SEO, J. H. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism.

Biotechnol Adv, v. 31, p. 851-861, 2013a.

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, e57048, 2013b.

KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 776-783, 1993.

KRAHULEC, S.; PETSCHACHER, B.; WALLNER, M.; LONGUS, K.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B. Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. **Microb Cell Fact**, v. 9, p. 1-14, 2010.

KRUCKEBERG, A. L.; YE, L.; BERDEN, J. A.; VAN DAM, K. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. **Biochem J**, v.339, p. 299–307, 1999.

KRUCKEBERG, A. L. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch Microbiol**, v. 166, p. 283–292, 1996.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; KHASA, Y. P.; SINGH, A.; ZHANG, Y. H. P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renew Sust Energ Rev**, v. 15, p. 4950– 4962, 2011.

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 Res**, v. 4, p. 69–78, 2003.

KUYPER, M.; HARTOG, M. M. P.; TOIRKENS, M. J.; ALMERING, M. J. H.; WINKLER, A. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing

- Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. **FEMS Yeast Res**, v. 5, p. 399–409, 2005.
- LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 104, p. 1107-1112, 1993.
- LANDRY, C. R.; TOWNSEND, J. P.; HARTL, D. L.; CAVALIERI, D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Ecol**, v. 15, p. 575–591, 2006.
- LEAL, M. R. L. V.; WALTER, A. D. Sustainability of the production of ethanol from sugarcane: the Brazilian experience. **Int Sugar J**, v. 112, p. 390–396, 2010.
- 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. **Biochem J**, v. 395, p. 543-549, 2006.
- LEANDRO, M. J.; SPENCER-MARTINS, I.; GONÇALVES, P. The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of a glucose/xylose facilitator. **Microbiology**, v. 154, p. 1646-1655, 2008.
- LEE, H. The Structure and Function of Yeast Xylose (Aldose) Reductases. **Yeast**, v. 14, p. 977-984, 1998.
- LEE, J. K.; KOO, B. S.; KIM, S. Y.; Cloning and Characterization of the *xyII* Gene, Encoding an NADH-Preferring Xylose Reductase from *Candida parapsilosis*, and Its Functional Expression in *Candida tropicalis*. **Appl Environ Microbiol**. v. 69, p. 6179-6188, 2003.
- LEGRAS, J-L.; MERDINOGLU, D.; CORNUET, J-M.; KARST, F. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. **Mol Ecol**, v. 16, p. 2091–2102, 2007.
- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIN, H. V.; Produção de etanol. In: Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. **Biotechnologia industrial**: Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Editora Blucher, v. 3, p. 1-43, 2001.

- LIN, Z.; LI, W. H. Expansion of hexose transporter genes was associated with the evolution of aerobic fermentation in yeasts. **Mol Biol Evol**, v. 28, p. 131-142, 2011.
- LIU, X.; KAAS, R. S.; JENSEN, P. R.; WORKMAN, M. Draft genome sequence of the yeast *Pachysolen tannophilus* CBS 4044/NRRL Y-2460. **Eukaryot Cell**, v.11, p. 827, 2012.
- 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 Announc**, v.2e01163-13, 2014.
- LU, C.; JEFFRIES, T. Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 6072–6077, 2007.
- 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. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, p. 1-22, 2012.
- MADHAVAN, A.; TAMALAMPUDI, S.; SRIVASTAVA, A.; FUKUDA, H.; BISARIA, V. S.; KONDO, A. Alcoholic fermentation of xylose and mixed sugars using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose utilization. **Appl Environ Microbiol**, v. 82, p. 1037–1047, 2009.
- MAIER, A.; VÖLKER, B.; BOLES, E.; FUHRMANN, G. F. Characterization of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. **FEMS Yeast Res**, v. 2, p. 539-550, 2002.
- MAGUIRE, S. L.; OHÉIGEARTAIGH, S. S.; BYRNE, K. P.; SCHRÖDER, M. S.; O'GAORA, P.; WOLFE, K. H.; BUTLER, G. Comparative genome analysis and gene finding in *Candida* species using CGOB. **Mol Biol Evol**, v. 30, p. 1281-1291, 2013.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y. J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V.; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALENQUER, M. L.; JARVIE, T. P.; JIRAGE, K. B.; KIM, J. B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K. L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; MCDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. A.; VOLKMER, G. A.; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, p. 376-380, 2005.

MARIS, A. J. A. V.; WINKLER, A. A.; KUYPER, M.; LAAT, W. T. A. M. D.; DIJKEN, J. P. V.; PRONK, J. T.; FLEMINGLAAN, A.; DELFT, A. X. Development of efficient xylose fermentation *in Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 108, p. 179–204, 2007.

MARTÍNEZ, E. A.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; SOLENZAL, A. I. N.; FELIPE, M. G. A. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. Guilliermondii*. **Process Biochem**, v. 38, p. 1677–1683, 2003.

MATSUSHIKA, A.; GOSHIMA, T.; FUJI, T.; INOUE H.; SAWAYAMA, S.; YANO, S. Characterization of non-oxidative transaldolase and transketolase enzymes in the pentose phosphate pathway with regard to xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb Technol**, v. 51, p.16–25, 2012.

MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S. Characterization of a recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain that co-ferments glucose and xylose: I. Influence of the ratio of glucose/xylose on ethanol production. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 169, p. 712-721, 2013.

- MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S. Comparative study on a series of recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strains with different expression levels of xylose reductase and xylulokinase. **Enzyme Microb Technol**, v. 48, p. 466–471, 2011.
- MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* requires high activity of xylose reductase and moderate xylulokinase activity. **J Biosci Bioeng**, v. 106, p. 306–309, 2008a.
- MATSUSHIKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, and xylulokinase. **J Biosci Bioeng**, v. 105, p. 296–299, 2008b.
- MATSUSHIKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Expression of protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 81, p. 243–255, 2008c.
- MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresour Technol**, v. 100, p. 2392–2398, 2009a.
- MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K.; SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production by recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* with genome-integrated NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase gene. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, p. 3818–3822, 2009b.
- MCGOVERN, P. E.; HARTUNG, U.; BADLER, V. R.; GLUSKER, D. L.; EXNER, L. J. The beginnings of wine making and viniculture in the ancient Near East and Egypt. **Expedition**, v. 39, p. 3–21, 1997.
- 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. **PNAS**, v. 101, p. 17593–17598, 2004.
- METZGER, M. H.; HOLLENBERG, C. P. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* transketolase gene and expression in a xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 42, p. 319–325, 1994.
- MOES, C. J.; PRETORIUS, I. S.; VANZYL, W. H. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Lett**, v. 18, p. 269–274, 1996.
- MORTIMER, R. K.; JOHNSTON, J. R. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. **Genetics**, v. 113, p. 35-43, 1986.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **BioresorTechnol**, v. 96, p. 673–686, 2005.
- MOURO, A. **Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2012.
- MÜLLER, G. **Engenharia genômica de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* visando melhorar a fermentação de sacarose para a produção de álcool combustível no Brasil**. 119 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2013.
- MUSSATO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. O. P. A.; CARNEIRO, L. V. M.; ROBERTO, I. S. C.; VICENTE, A. N.; DOMINGUES, L. L.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotech Adv**, v.28, p. 817-830, 2010.

- MWESIGYE, P. K.; BARDFORD, J. H. Mechanism of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **J Gen Appl Microbiol**, v. 42, p. 297-306, 1996.
- NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; KORHOLA, M. P. Chromosomal polymorphism of *MEL* genes in some populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 127, p. 41–45, 1995.
- NI, H.; LAPLAZA, J. M.; JEFFRIES, T. W. Transposon mutagenesis to improve the growth of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on D-xylose. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 2061–2066, 2007.
- NIELSEN, J.; LARSSON, C.; VAN MARIS, A.; PRONK, J. Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. **Curr Opin Biotechnol**, v. 24, p. 398-404, 2013.
- NGUYEN, N. H.; SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycol Res**, v. 110, p. 1232 – 1241. 2006.
- NOGUEIRA, L. A. H.; SEABRA, J. E. A.; BEST, G.; LEAL, M. R. L. V.; POPPE, M. K. **Sugarcane-based bioethanol: energy for sustainable development**, BNDES and CGEE; Rio de Janeiro. 2008.
- OREB, M.; DIETZ, H.; FARWICK, A.; BOLES, E. Novel strategies to improve co-fermentation of pentoses with d-glucose by recombinant yeast strains in lignocellulosic hydrolysates. **Bioengineered**, v. 3, p. 347-351, 2012.
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 64, p. 34–50, 2000.
- ÖZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 63, p. 554-569, 1999.
- ÖZCAN, S.; JOHNSTON, M. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by

- different levels of glucose. **Mol Cell Biol**, v. 15, p. 1564-1572, 1995.
- ÖZCAN, S.; VALLIER, L. G.; FLICK, J. S.; CARLSON, M.; JOHNSTON, M. Expression of the *SUC2* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. **Yeast**, v. 13, p. 127-137, 1997.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresour Technol**, v. 74, p. 25-33, 2000.
- PARACHIN, N. S.; BERGDAHL, B.; VAN NIEL, E. W. J.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Kinetic modelling reveals current limitations in the production of ethanol from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metab Eng**, v. 13, p. 508–517, 2011.
- PARISI, F. Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. **Adv Biochem Eng**, v. 38, p.53-87, 1989.
- 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. **Appl Biochem Biotech**, v. 121, p. 59-70, 2005.
- PROMPT, A. H. **Análise da fermentação de glicose e xilose por leveduras spathaspora isoladas de madeira em decomposição**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2012.
- QUINTERO, J. A.; MONTOYA, M. I.; SÁNCHEZ, O. J.; GIRALDO, O. H.; CARDONA, C. A. Fuel ethanol production from sugarcane and corn: comparative analysis for a Colombian case. **Energy**, v. 33, p. 385–399, 2008.
- RAJ, N. T.; INIYAN, S.; GOIC, R. A review of renewable energy based cogeneration technologies. **Renew Sust Energ Rev**, v. 15, p. 3640–3648, 2011.
- REDDY, V. A.; JOHNSON, R. S.; BIEMANN, K.; WILLIAMS, R. S.; ZIEGLER, F. D.; TRIMBLE, R. B.; MALEY, F. Characterization of

- the glycosylation sites in yeast external invertase. **J Biol Chem**, v. 263, p. 6978-6985, 1988.
- REINDERS, A.; WARD, J. M. Functional characterization of the a glucoside transporter Sut1p from *Schizosaccharomyces pombe*, the first fungal homologue of plant sucrose transporters. **Mol Microbiol**, v. 39, p. 445-454, 2001.
- REIFENBERGER, E.; BOLES, E.; CIRIACY, M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **Eur J Biochem**, v. 245, p. 324-333, 1997.
- REIFENBERGER, E.; FREIDEL, K.; CIRIACY, M. Identification of novel *HXT* genes in reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. **Mol Microbiol**, v. 16, p.157-167, 1995.
- RESTUTI, D.; MICHAELOWA, A. The economic potential of bagasse co-generation as CDM projects in Indonesia. **Energ Policy**, v. 35, p. 3952-3966, 2007.
- RICHARD, P.; TOIVARI, M. H.; PENTTILÄ, M. Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylitol dehydrogenase. **FEBS Lett**, v. 457, p. 135-138, 1999.
- RICHARD, P.; TOIVARI, M. H.; PENTTILÄ, M. The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism. **FEMS Microbiol Lett**, v. 190, p. 39-43, 2000.
- RIZZI, M.; HARWART, K.; ERLEMANN, P.; BUI THANH, N. A.; DELLWEG, H. Purification and properties of the NAD⁺-xylitol-dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. **J Ferment Bioeng**, v. 67, p. 20-24, 1989.
- RODRIGUEZ-PEÑA, J. M.; CID, V. J.; ARROYO, J.; NOMBELA, C. The YGR194c (*XKS1*) gene encodes the xylulokinase from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 162, p. 155-60, 1998.
- RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RADSTROM, P.

- Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisia*. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, p. 1-7, 2010.
- RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BETTIGA, M. Increased expression of the oxidative pentose phosphate pathway and gluconeogenesis in anaerobically growing xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb Cell Fact**, v. 8, p.1-12, 2009.
- 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. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 74, p. 1041-1052, 2007.
- SARITHA, M.; ARORA, A.; LATA. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. **Indian J Microbiol**, v. 52, p. 122–130, 2012.
- SARTHY, A. V.; MCCONAUGHY, B. L.; LOBO, Z.; SUNDSTROM, J. A.; FURLONG, C. E.; HALL, B. D. Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, v. 53, p. 1996–2000, 1987.
- SEDLAK, M.; HO, N. W. Y. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. **Yeast**, v. 21, p. 671–684, 2004.
- SENAC, T.; HAHN-HÄGERDAL, B. Effects of increased transaldolase activity on D-xylose and D-glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* cell extracts. **Appl Environ Microbiol**, v. 57, p. 1701–1706, 1991.
- SHAMANNA, D. K.; SANDERSON, K. E. Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. **J Bacteriol**, v. 139, p. 64–70, 1979.
- SILVA, A. S.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BON, E. P. S. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresour Technol**, v. 101, p. 7402-7409, 2010.

- SIMS, R. E. H.; MABEE, W.; SADDLER, J. N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresour Technol**, v. 101, p. 1570–1580, 2010.
- SMILEY, K. L.; BOLEN, P. L. Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnol. Lett**, v. 4, p. 607–610, 1982.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTCALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresour Technol**, v. 101, p. 4820–4825, 2010.
- STAMBUK, B. U.; BATISTA, A. S.; DE ARAUJO, P. S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biosci Bioeng**, v. 89, p. 212-214, 2000.
- STAMBUK, B. U.; DUNN, B.; ALVES JR, S. L.; DUVAL, H. D.; SHERLOCK, G. Industrial fuel ethanol yeast contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. **Genome Res**, v. 19, p. 2271-2278, 2009.
- 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. **J Sci Ind Res**, v. 67, p. 918-926, 2008.
- STAMBUK, B. U.; FRANDEN, M. A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 105, p. 255-263, 2003.
- SUBTIL, T.; BOLES, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Biofuels**, v. 5, p. 2-12, 2012.
- TOIVARI, M. H.; ARISTIDOU, A.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces*

cerevisiae: importance of xylulokinase (*XKS1*) and oxygen availability. **Metab Eng**, v. 3, p. 236–249, 2001.

TOIVARI, M. H.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environm Microbiol**, v. 70, p. 3681-3686, 2004.

TRÄFF, K. L.; JÖNSSON, L. J.; HAHN-HÄGERDAL, B. Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 19, p. 1233–1241, 2002.

VAN MARIS, A. J. A.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A. H.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 391-418, 2006.

VAN SUYLEKOM, D.; VAN DONSELAAR, E.; BLANCHETOT, C.; NGUYEN, D. O.; NGOC, L.; HUMBEL, B. M.; BOONSTRA, J. Degradation of the hexose transporter Hxt5p in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biol Cell**, v. 99, p.13-23, 2007.

VAN VLEET, J. H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Curr Opin Biotechnol**, v. 20, p. 300-306, 2009.

VERDUYN, C.; VAN KLEEF, R.; FRANK, J.; SCHREUDER, H.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Properties of the NAD(P)H dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Biochem J**, v. 226, p. 669–677, 1985.

VERSTREPEN, K. J.; ISERENTANT, D.; MALCORPS, P.; DERDELINCKX, G.; VAN DIJCK, P.; WINDERICKX, J.; PRETORIUS, I. S.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? **Trends Biotechnol**, v. 22, p. 531-537, 2004.

VILELA, L. F.; MELLO, V. M.; REIS, V. C. B.; BON, E. P. S.; TORRES, F. A. G.; NEVES, B. C.; ELEUTHERIO, E. C. A. Functional expression of *Burkholderia cenocepacia* xylose isomerase

in yeast increases ethanol production from a glucose–xylose blend. **Bioresour Technol**, v. 128, p. 792–796, 2013.

WAHLBOM, C. F.; CORDERO OTERO, R. R.; VAN ZYL, W. H.; HAHN-HÄGERDAL, B.; JÖNSSON, L. J. Molecular analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with improved ability to utilize xylose shows enhanced expression of proteins involved in transport, initial xylose metabolism, and the pentose phosphate pathway. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p.740-746, 2003.

WALFRIDSSON, M.; ANDERLUND, M.; BAO, X.; HAHN-HÄGERDAL, B. Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* *XYL1* and *XYL2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on product formation during xylose utilization. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 48, p. 218–224, 1997.

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. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p. 4648–4651, 1996.

WALTER, A.; DOLZAN, P.; QUILODRÁN, O.; GARCIA, J.; SILVA, C.; PIACENTE, F.; SEGERSTEDT, A. **A sustainability analysis of the Brazilian ethanol**. Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, SP. 167 p. Disponível em:<http://www.globalbioenergy.org/uploads/media/0811_Unicamp_-_A_sustainability_analysis_of_the_Brazilian_ethanol.pdf>, 2008.

WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc. **J Biol Chem**, v. 280, p. 10340–10349, 2005.

WIECZORKE, R.; DLUGAI, S.; KRAMPE, S.; BOLES, E. Characterisation of mammalian GLUT glucose transporters in a heterologous yeast expression system. **Cell Physiol Biochem**, v. 13, p. 123-134, 2003.

WIECZORKE, R.; KRAMPE, S.; WEIERSTALL, T.; FREIDEL, K.; HOLLENBERG, C. P.; BOLES, E. Concurrent knock-out of at least

20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, v. 464, p. 123-128, 1999.

WOHLBACH, D. J.; KUO, A.; SATO, T. K.; POTTS, K. M.; SALAMOV, A. A.; LABUTTI, K. M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGILINAN, J. L.; LINDQUIST, E. A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; JIN, M.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. E.; JEFFRIES, T. W.; ZINKEL, R.; BARRY, K. W.; GRIGORIEV, I. V.; GASCH, A. P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108, p. 13212-13217, 2011.

XU, Q.; SINGH, A.; HIMMEL, M. E. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. **Curr Opin Biotechnol**, v. 20, p. 364–371, 2009.

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

YOUNG, E.; LEE, S. M.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, p. 1-12, 2010.

YOUNG, E.; POUCHER, A.; COMER, A.; BAILEY, A.; ALPER, H. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, p. 3311-3319, 2011.

ZALDIVAR, J.; BORGES, A.; JOHANSSON, B.; SMITS, H. P.; VILLAS-BÔAS, S. G.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fermentation performance and intracellular metabolite patterns in laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 59, p. 436-442, 2002.