

Belisa Bordin de Sales

**Clonagem e expressão heteróloga de transportadores de xilose em  
linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação de Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina como requisito para obtenção  
do Grau de Doutor em Bioquímica.  
Orientador: Prof. Dr. Boris U. Stambuk

Florianópolis  
2015

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

Sales, Belisa Bordin de  
Clonagem e expressão heteróloga de transportadores de  
xilose em linhagem *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes  
/ Belisa Bordin de Sales ; orientador, Boris U. Stambuk -  
Florianópolis, SC, 2015.  
134 p.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. transportador de xilose. 3.  
*Saccharomyces cerevisiae*. 4. *Scheffersomyces stipitis*. 5.  
*Spathaspora* sp.. I. Stambuk, Boris U.. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica. III. Título.

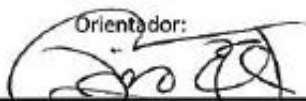
**"Clonagem e expressão heteróloga de transportadores de xilose em linhagem de Saccharomyces cerevisiae recombinante"**

Por

**Belisa Bordin de Sales**

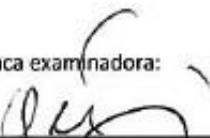
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (13/BQA/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:

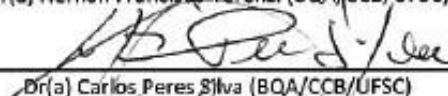


Dr(a) Boris U. Stambuk (BQA/CCB/UFSC)

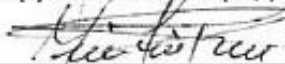
Banca examinadora:



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



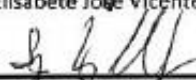
Dr(a) Carlos Peres Silva (BQA/CCB/UFSC)



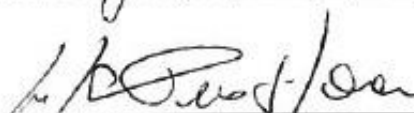
Dr(a) Márcio José Rossi (BQA/CCB/UFSC)



Dr(a) Elisabete José Vicente (Microbiologia/ICB/USP)



Dr(a) Sérgio Luiz Alves Junior (Campus Chapecó/UFS)



Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva  
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Bioquímica



Aos meus pais, Eliana e José Sales,  
e meu marido Leandro Campos,  
pelo apoio incondicional durante  
todo o processo.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Boris U. Stambuk pela oportunidade e orientação na obtenção deste título.

Aos meus pais, Eliana e José Sales, e irmão Fábio pelo amor, carinho, paciência e conselhos tão preciosos.

Ao meu marido Leandro pelo amor, companheirismo e dedicação. Nosso próximo título está a caminho!

À todos os colegas de trabalho que fizeram parte do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras ao longo dos anos, pelo crescimento profissional e também pessoal: Adriane Mouro, Alice Prompt, Augusto Buckner, Bruna Scheid, Catarina Figueiredo, Davi Gonçalves, Débora Trichez, Denis Dall Agnolo, Gabriela Müller, Marcelo Dário, Margareth Patiño, Maria de Lurdes Magalhães, Marília Knychala e Víctor Godoy. Obrigada também pelo auxílio tão importante na fase final!

Às amigadas conquistadas e mantidas em Floripa: Adriane Mouro, Gabriela Müller, Catarina Figueiredo, Débora Trichez, Bianca Primak, Sinara Backes, Claudia Gai. Sucesso e felicidades nas suas conquistas!

À família Backes por terem me recebido e hospedado de forma tão carinhosa e generosa na etapa final!

Aos amigos e familiares de Três Lagoas/MS e Assis/SP, obrigada por se mostrarem presentes mesmo quando a distância física é enorme.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela seriedade ao trabalho e atenção.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado; FINEP e JICA (Japanese International Cooperation Agency) pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.





[...] à medida que nosso conhecimento cresce,  
crescem também as margens de nossa ignorância.  
John Horgan



## RESUMO

Na produção de etanol de segunda geração o transporte dos açúcares para o interior da levedura *Saccharomyces cerevisiae* constitui um passo limitante, principalmente no caso da pentose xilose, o segundo açúcar mais abundante na biomassa lignocelulósica. Para caracterizar o efeito de diferentes transportadores na fermentação de xilose, neste trabalho foi utilizada uma linhagem *hxt*-null de *S. cerevisiae* (*hxt1-hxt7* $\Delta$  e *gal2* $\Delta$ ), mas capaz de metabolizar xilose devido à sobre-expressão dos genes *XYL1*, *XYL2* e *XKS1* que codificam as enzimas xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulocinase, respectivamente. Essa linhagem *hxt*-null foi utilizada para expressar transportadores de *S. cerevisiae* e de leveduras fermentadoras de xilose *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum*. Os resultados indicam que nenhuma das permeases de *S. cerevisiae* analisadas (Hxt1, Hxt2, Hxt5 e Hxt7) possui propriedades adequadas para captação de xilose, quando esta é a única fonte de carbono ou em misturas de xilose/glicose. Uma biblioteca genômica de *S. stipitis* foi inserida na linhagem *hxt*-null, resultando na clonagem de três permeases que realizam o transporte de xilose: o já conhecido transportador Xut1 e duas novas permeases (Hxt2.6 e Qup2) que ainda não tinham sido caracterizadas nessa levedura. No entanto, nenhuma dessas proteínas mostrou-se específica para xilose, pois também captam hexoses presentes no meio. O genoma sequenciado das leveduras *S. arborariae* e *S. passalidarum* foi analisado na busca por genes com homologia à transportadores de xilose, e três genes selecionados foram clonados e expressos na linhagem *hxt*-null. Desses, apenas a permease Sut1 de *S. passalidarum* realizou transporte de xilose (além de outras hexoses) e, quando o gene *HXT4* de *S. arborariae* era expresso, não houve consumo ou fermentação de nenhum dos açúcares testados. Outra permease dessa levedura (Get1) apresentou uma característica peculiar, ocorrendo a captação de xilose apenas quando maltose ou outras fontes de carbono estavam presentes. Os resultados indicam que a caracterização de novos transportadores de açúcares presentes no genoma de leveduras fermentadoras de xilose é necessária para desenvolver novas estratégias para otimizar a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos por linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes.

**Palavras-chave:** Xilose 1. Transportador 2. Expressão heteróloga 3. *Saccharomyces cerevisiae* 4. *Scheffersomyces stipitis* 5. *Spathaspora arborariae* 6. *Spathaspora passalidarum* 7.



## ABSTRACT

The internalization of sugars in *Saccharomyces cerevisiae* during second generation ethanol production is a limiting step, primarily because of xylose, the second most abundant sugar in lignocellulosic biomass. To typify the influence of different transporter in the xylose fermentation, in this work it was used a *hxt*-null *S. cerevisiae* strain, deleted in its main hexoses permeases (*hxt1-hxt7* $\Delta$  e *gal2* $\Delta$ ), but capable of metabolize xylose, due to the overexpression of genes *XYL1*, *XYL2* and *XKS1*, that code of the enzymes xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylulokinase. This *hxt*-null strain was used to express transporters from the genome of *S. cerevisiae* and from xylose-fermenting yeasts *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora arborariae* and *Spathaspora passalidarum*. The results show that none of the *S. cerevisiae* permeases analyzed (Hxt1, Hxt2, Hxt5 and Hxt7) had properties suitable for xylose fermentation or xylose/glucose mixtures. In order to obtain new transporters, a genomic library from *S. stipitis* was transformed into the *hxt*-null strain, which resulted in cloning three permeases that allowed growth and fermentation of xylose: the already known Xut1, and two new permeases (Hxt2.6 and Qup2) that were not characterized before in this yeast. However, none of these proteins was specific for xylose, since they also allowed efficient fermentation of hexoses in the *hxt*-null strain. Regarding *S. arborariae* and *S. passalidarum*, both yeasts had their genome sequenced and were used to search genes homologues to xylose transporters. Three gene selected were cloned and expressed in the *hxt*-null *S. cerevisiae* strain. Of these permeases coded, only Sut1 from *S. passalidarum* restored xylose (and hexoses) fermentation, and when *HXT4* from *S. arborariae* was expressed, there were no uptake or fermentation of any sugar tested. Another permease from this yeast (Get1) had a peculiar characteristic: it consumed xylose only in co-fermentation, with maltose or other carbon source. The results indicate that the characterization of new sugar transporters present in the genome of xilose-fermenting yeasts is needed to develop new strategies to optimize lignocellulosic hydrolisates fermentations by recombinants *S. cerevisiae* strains.

**Key words:** Xylose 1. Transporter 2. Heterologous expression 3. *Saccharomyces cerevisiae* 4. *Scheffersomyces stipitis* 5. *Spathaspora arborariae* 6. *Spathaspora passalidarum* 7.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas do processo de produção de etanol lignocelulósico...	25
Figura 2: Rotas de metabolização de xilose e rendimento teórico de etanol a partir de glicose e xilose.....	30
Figura 3: Principais problemas na fermentação de xilose em <i>S. cerevisiae</i> .....	34
Figura 4: Esquema da estrutura secundária dos transportadores de açúcares pertencentes à MFS.....	37
Figura 5: Fusão do módulo <i>GFP-Kan<sup>r</sup></i> ao gene de interesse por recombinação homóloga.....	52
Figura 6: Crescimento das linhagens recombinantes <i>S. cerevisiae</i> DLG-K1 transformadas com a biblioteca genômica de <i>S. stipitis</i> .....	61
Figura 7: Mapa de restrição dos insertos presentes nos plasmídeos obtidos a partir da biblioteca genômica de <i>S. stipitis</i> utilizados para transformara linhagem recombinante <i>S. cerevisiae</i> DLG-K1.....	62
Figura 8: Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm da linhagem recombinante <i>S. cerevisiae</i> BBY-SsHXT2.6, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% maltose, glicose ou frutose como fontes de carbono.....	64
Figura 9: Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm da linhagem recombinante <i>S. cerevisiae</i> BBY-SsXUT1, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% maltose, glicose ou frutose como fontes de carbono.....	65
Figura 10: Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes <i>S. cerevisiae</i> BBY-SsQUP2, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% maltose, glicose ou frutose como fontes de carbono.....	66
Figura 11: Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes <i>S. cerevisiae</i> BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% xilose como fonte de carbono.....	69
Figura 12: Fermentações das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1, BBY-SsQUP2 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com glicose ou xilose como fontes de carbono.....	70
Figura 13: Co-fermentações das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1, BBY-SsQUP2 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com glicose e xilose como fontes de carbono.....	72
Figura 14: Filograma com os transportadores de <i>S. stipitis</i> depositados no banco de dados NCBI.....	74

Figura 15: Alinhamento múltiplo entre as sequências dos transportadores Hxt2,6, Xut1 e Qup2 de <i>S. stipitis</i> e Gxf1 de <i>C. intermedia</i> .....	76
Figura 16: Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> BBY-SaGET1 e BBY-SaHXT4 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com maltose como fonte de carbono.....	78
Figura 17: Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> BBY-SaGET1 e BBY-SaHXT4 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com xilose, glicose ou frutose como fontes de carbono.....	79
Figura 18: Co-fermentações da linhagem recombinante <i>S. cerevisiae</i> BBY-SaGET1 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com maltose e glicose; maltose e xilose e maltose e frutose como fontes de carbono.....	80
Figura 19: Co-fermentações da linhagem recombinante <i>S. cerevisiae</i> BBY-SaGET1 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com glicerol mais glicose e etanol mais glicose como fontes de carbono.....	81
Figura 20: Localização celular do transportador SaGet1 fusionado com GFP em células <i>S. cerevisiae</i> BBY-SaGET1.....	82
Figura 21: Localização celular do transportador SaHxt4 fusionado com GFP em células <i>S. cerevisiae</i> BBY-SaHXT4.....	83
Figura 22: Fermentações da linhagem recombinante de <i>S. cerevisiae</i> BBY-SpSUT1 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com maltose, glicose, xilose ou frutose como fontes de carbono.....	85
Figura 23: Co-fermentações da linhagem recombinante de <i>S. cerevisiae</i> BBY-SpSUT1 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com maltose e glicose; maltose e xilose e maltose e frutose como fontes de carbono.....	86
Figura 24: Alinhamento múltiplo entre as sequências dos transportadores Get1, Hxt4 ( <i>S. arborariae</i> ) e Sut1 de <i>S. passalidarum</i> e Gxf1 de <i>C. intermedia</i> .....	88
Figura 25: Alinhamento dos segmentos transmembrana 4 e 5 dos transportadores Fsy1 ( <i>Saccharomyces pastorianus</i> ) e Get1 ( <i>Spathaspora arborariae</i> ).....	104



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de levedura utilizadas neste trabalho.....	44
Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste trabalho.....	46
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	47
Tabela 4. Números de acesso dos transportadores utilizados para alinhamento das sequências e/ou análise filogenética e seus micro-organismos de origem.....	56
Tabela 5. Atividade de xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulocinase (XK) em extratos celulares de linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-K2C e DLG-K1.....	58
Tabela 6. Parâmetros fermentativos da linhagem <i>hxt</i> -null DLG-K1 transformada com os genes <i>HXT</i> indicados, em meios contendo xilose....	59
Tabela 7. Parâmetros fermentativos da linhagem <i>hxt</i> -null DLG-K1 transformada com os genes <i>HXT</i> indicados, em meios contendo xilose e glicose.....	59
Tabela 8. Parâmetros fermentativos durante o crescimento em diferentes açúcares pelas linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2.....	69
Tabela 9. Consumo de açúcares e produção de etanol em fermentações com glicose ou xilose pelas linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2.....	73
Tabela 10. Consumo de açúcares e produção de etanol em co-fermentações com glicose e xilose pelas linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2.....	75
Tabela 11. Consumo de açúcares e produção de etanol em fermentações com maltose, glicose, frutose ou xilose pela linhagem recombinante de <i>S. cerevisiae</i> BBY-SpSUT1.....	87
Tabela 12. Consumo de açúcares e produção de etanol em co-fermentações com maltose mais glicose, maltose mais frutose e maltose mais xilose pela linhagem recombinante de <i>S. cerevisiae</i> BBY-SpSUT1..	89



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
Produção de etanol.....	21
Etanol de segunda geração e biomassa lignocelulósica.....	22
Micro-organismos para fermentação.....	26
Metabolização de xilose.....	29
Transporte de açúcares.....	35
<b>OBJETIVOS</b> .....	41
Objetivo geral.....	41
Objetivos específicos.....	41
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
Linhagens e meios de cultura utilizados.....	42
Condições de crescimento e fermentação.....	42
Plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados.....	43
Clonagem de transportadores de xilose.....	47
Programas utilizados para Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).....	48
Análise de fragmentos de DNA em gel de agarose.....	48
Transformações de bactérias e leveduras.....	49
Determinação da atividade enzimática da xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulocinase.....	49
Sequenciamento dos genes clonados em vetor de expressão pPGK.....	50
Fusão de GFP à extremidade C-terminal das proteínas SaGet1 e SaHxt4.....	51
Microscopia de Fluorescência.....	52
Determinação dos substratos e produtos dos crescimentos e fermentações.....	53
Alinhamento de sequências e análise filogenética.....	53
<b>RESULTADOS</b> .....	55
Construção de uma linhagem recombinante de <i>S. cerevisiae</i> para caracterizar proteínas transportadoras de xilose.....	55
Clonagem de transportadores de xilose a partir de uma biblioteca genômica de <i>Scheffersomyces stipitis</i> .....	58
Identificação e clonagem de transportadores de açúcares das leveduras <i>Spathaspora arborariae</i> e <i>Spathaspora passalidarum</i> .....	77
<b>DISCUSSÃO</b> .....	91
<b>CONCLUSÕES</b> .....	108
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	110



## INTRODUÇÃO

### Produção de etanol

A necessidade de produzir combustíveis renováveis baratos para substituir os combustíveis fósseis reflete-se nas agendas políticas de muitos países, objetivando desenvolver uma fonte de energia confiável para garantir o fornecimento de combustível, promover o desenvolvimento rural e enfrentar as mudanças climáticas ao reduzir as emissões de gases de efeito estufa oriundas de combustíveis fósseis (revisto por MACRELLI; GALBE; WABERG, 2014).

No Brasil, a produção de etanol conta com tecnologias convencionais, amplamente conhecidas e desenvolvidas, baseadas na utilização da sacarose contida na cana-de-açúcar (GOLDEMBERG, 2008; SOCCOL *et al.*, 2010; CHANDEL *et al.*, 2011), sendo que 30% das usinas produz apenas etanol e 64% são associadas à produção de açúcar (MAPA, 2014). Essa tecnologia está em uso comercial há mais de 30 anos e pode ser considerada madura uma vez que os custos com matéria-prima - cerca de 60 a 70% - são responsáveis pela maior parte dos custos de produção (BAJAY *et al.*, 2011). Comparado com outras culturas usadas na produção de etanol (como a partir de amido do milho), o bioetanol de cana-de-açúcar é o que tem menor custo de produção no mundo todo (MACRELLI; MOGENSEN; ZACCHI, 2012). Os Estados Unidos e o Brasil são hoje os maiores produtores de etanol, com produção de 54 e  $27,5 \times 10^6 \text{ m}^3$  em 2014, respectivamente (ETHANOL INDUSTRY OUTLOOK, 2015; UNICA, 2015).

Com o aumento da população mundial, a demanda por produção de energia renovável deve aumentar significativamente, sendo que o aumento do consumo de etanol deve triplicar até 2035. Essa projeção também estima que biocombustíveis atendam, em 2035, à demanda de 37% do transporte rodoviário no Brasil, 19% nos Estados Unidos e 16% na União Europeia (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, WORLD ENERGY OUTLOOK, 2012). Apesar de o Brasil apresentar condições particularmente favoráveis para a plantação de cana-de-açúcar como clima e disponibilidade de área para plantio, é importante salientar que outros países apresentam condições semelhantes. Dessa forma, é possível estimular a produção moderna e sustentável de biocombustíveis em condições parecidas às do Brasil e adaptadas à realidade local (NOGUEIRA *et al.*, 2013).

O uso de etanol combustível no Brasil teve início na década de 1970, com o Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL),

representando uma estratégia do governo brasileiro em resposta à crise mundial do petróleo com altos preços internacionais e aos baixos preços do açúcar no mercado. Devido ao clima favorável e tradição histórica com o cultivo, a cana-de-açúcar foi o substrato escolhido para a produção de etanol no Brasil. Com os subsídios do governo e investimentos em pesquisa, iniciou-se a produção de automóveis abastecidos com etanol, juntamente com o aumento do número de destilarias e regulamentação para adicionar 10% de etanol à gasolina (ROSILLO-CALLE e CORTEZ, 1998; DE HOLLANDA e POOLE, 2001; SOCCOL *et al.*, 2005). Apesar do futuro promissor desta fonte renovável, a produção sofreu considerável queda nas décadas seguintes. Fatores como a diminuição de subsídios governamentais, mudanças dos preços internacionais do açúcar, estabilização do preço do petróleo e baixos preços do etanol importado convergiram para o declínio da popularidade do etanol (ZANIN *et al.*, 2000).

Entretanto, atualmente o Brasil é um dos países com maior presença de fontes renováveis de energia na matriz de transporte. Em 2012, a participação da bioenergia (etanol e biodiesel) na matriz de transporte foi de 15,1%. Nos países que participam da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), as fontes renováveis participavam com apenas 3,4%, percentual influenciado pelo consumo de etanol nos Estados Unidos (MME, 2013). Veículos com a tecnologia *flexfuel*, que permite a utilização de etanol ou gasolina (KAMIMURA e SAUER, 2008), é o tipo de carro mais comprado no Brasil: do total de veículos licenciados no ano de 2013, 88,5% são carros *flexfuel*. É interessante destacar que, desde 2004, o preço do etanol aos produtores brasileiros tem se mantido menor que os preços da gasolina importada, e que o preço do etanol é ditado pelo preço internacional do açúcar, e não pelo mercado do petróleo (GOLDEMBERG; SCHAEFFER; LUCCHESI, 2014; MACRELLI; GALBE; WALLBERG, 2014).

### **Etanol de segunda geração e biomassa lignocelulósica**

A pesquisa por alternativas renováveis para substituição de combustíveis é impulsionada por fatores climáticos e econômicos, além dos progressos tecnológicos e demandas nacionais e internacionais (MILANEZ *et al.*, 2012; MOUTTA; FERREIRA-LEITÃO; BON, 2014). É importante salientar que todo recurso natural, e particularmente áreas aráveis, devem ser utilizados de maneira racional (NOGUEIRA *et al.*, 2013). O etanol de segunda geração ou etanol lignocelulósico é uma

alternativa de produção de combustível que utiliza materiais subaproveitados e disponíveis localmente, sem aumentar a área plantada ou alterar seu mercado (FERNANDES *et al.*, 2012). Além disso, não tem problemas referentes ao fornecimento de matéria-prima, já que 7-18 bilhões de toneladas/ano de biomassa lignocelulósica estão disponíveis para utilização (LIN e TANAKA, 2006). Embora a produção de biocombustíveis muitas vezes seja responsabilizada pelo aumento de preços dos alimentos e pela perda de biodiversidade, a sua área plantada representava, em 2011, apenas 2,3% do total (1.553 Mha) da produção agrícola mundial, ou seja, 36,1 Mha (GOLDEMBERG e COELHO, 2013).

Visando o incremento da produção de etanol, é possível utilizar o bagaço de cana-de-açúcar assim como sua palha e folhas, além de outros resíduos agrícolas e florestais (provindos de culturas de milho e da produção de papel e celulose), e também de culturas dedicadas à produção do biocombustível (*switchgrass* e capim-elefante). Tais recursos constituem mais de 80% da biomassa total (que inclui as fontes alimentícias) e seu conteúdo energético equivale a 3,8 bilhões de barris de petróleo (CORTEZ, 2010).

Produzido em grande quantidade nas usinas sucroalcooleiras do Brasil (AMORIM *et al.*, 2011) e em outros países produtores de cana-de-açúcar, parte do bagaço da cana-de-açúcar é queimado para produção de energia, conferindo auto sustentabilidade energética para as usinas e destilarias que podem ainda vender o excedente (DANTAS *et al.*, 2013). De fato, 15,4% da produção de energia elétrica no país provêm dessa biomassa (MME, 2013). No entanto, estima-se que em torno de 10% do bagaço continua sendo desprezado pelas usinas (SOCCOL *et al.*, 2010). Considerando os resíduos gerados na geração de etanol a partir da sacarose, ou seja, bagaço, folhas e palha, é possível aumentar entre 40-50% a produção de etanol sem alterar a área plantada (STAMBUK *et al.*, 2008) e com custos restritos apenas à estocagem do material (LEAL e WALTER, 2010).

Os materiais lignocelulósicos são mais difíceis de serem convertidos em etanol do que açúcares e amidos. O bagaço da cana-de-açúcar consiste em aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (WHEALS *et al.*, 1999; PANDEY *et al.*, 2000). A lignina é composta de macromoléculas formadas de unidades propilfenólicas encapsuladas e ligadas à hemicelulose e confere rigidez à estrutura (SILVA *et al.*, 2009). A celulose é formada por polímeros de glicose de alta massa molar que são mantidos unidos de forma rígida como um feixe de fibras, contribuindo para a rigidez do material. A

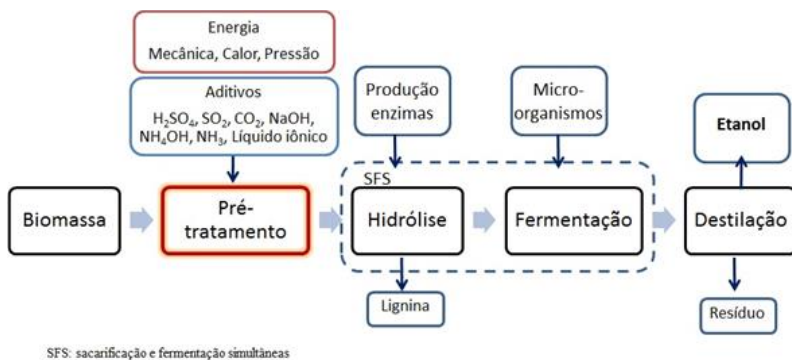
hemicelulose consiste em um heteropolímero amorfo e ramificado de xilose, arabinose, galactose, glicose e manose (SILVA *et al.*, 2013). A xilose é uma pentose e o segundo carboidrato mais abundante na natureza. Sua fermentação em etanol representa uma importante alternativa para a obtenção de biocombustível, contudo, apresenta alguns desafios (JEFFRIES, 2006).

O processo de obtenção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica ainda é limitado por desafios técnicos e econômicos, a começar pela recalcitrância da biomassa e pela necessidade de rigorosos pré-tratamentos. O segundo desafio reside na produção de enzimas eficientes para hidrólise da celulose e da hemicelulose e a um custo competitivo com as enzimas de hidrólise de amido de primeira geração (KOPPRAM *et al.*, 2014; LENNARTSSON *et al.*, 2014). O terceiro consiste em obter concentrações altas de etanol no mostro (de 4-4,5% peso/volume) para reduzir os custos de destilação e com a lavagem dos resíduos. Este não parece ser um grande problema, mas é necessário iniciar a fermentação com carga de biomassa de 15%, o que causa problemas como aumento da viscosidade, dificuldade na homogeneização da mistura e alta presença de inibidores (VIKARI; VEHMAANPERÄ; KOIVULA, 2012; KOPPRAM *et al.*, 2014). Esses problemas podem aumentar o consumo energético, anulando os benefícios da alta carga inicial de biomassa (KOPPRAM *et al.*, 2014). Este desafio pode ser resolvido, ao menos parcialmente, ao integrar os processos de primeira e segunda geração, já que concentrações altas de etanol são atingidas facilmente na primeira geração. Essa integração também pode reduzir custos com investimentos e riscos, comparados ao processo de segunda geração em separado (LENNARTSSON *et al.*, 2014). Além disso, o processo torna-se mais rentável, uma vez que as fontes de energia e material são compartilhadas na mesma usina (MACRELLI; GALBE; WALLBERG, 2014). O quarto desafio é a fermentação simultânea e eficiente dos diferentes açúcares presentes no mostro de fermentação. Esses açúcares são monossacarídeos hexoses e pentoses, além de dissacarídeos que continuam presentes devido à hidrólise parcial da celulose e hemicelulose.

A bioconversão da biomassa lignocelulósica renovável em etanol envolve cinco passos principais: (1) escolha da biomassa adequada, que dependerá da disponibilidade local; (2) pré-tratamento, que consiste em deslignificação da celulose e da hemicelulose; (3) hidrólise para desestruturação dos polímeros dos carboidratos resultando em açúcares livres; (4) fermentação rápida e robusta de hexoses e pentoses; e (5) processamento dos produtos (SUN e CHENG, 2002;



NAIK *et al.*, 2010; SARKAR *et al.*, 2011; JORDAN *et al.*, 2012; MENON e RAO, 2012). A Figura 1 resume os passos de tratamento da biomassa para obtenção de etanol. O pré-tratamento pode ser físico, químico, físico-químico ou biológico e busca diminuir a cristalinidade da celulose por meio da quebra/desestabilização da estrutura da biomassa lignocelulósica, aumentando a área superficial e a porosidade da biomassa para liberar os carboidratos da associação com lignina. O processo determina a composição resultante dos licores quanto à presença de hexoses e pentoses e proporciona o acesso das enzimas celulolíticas ao substrato na etapa posterior de hidrólise enzimática (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010; SARITHA; ARORA; LATA, 2012; TOQUERO e BOLADO, 2014).



**Figura 1: Etapas do processo de produção de etanol lignocelulósico.** Adaptado de Silva *et al.*, 2013.

Pré-tratamentos hidrotermais e ácidos removem a fração hemicelulósica da biomassa, permitindo que a desconstrução da estrutura de lignocelulose e liberação de monômeros de açúcar derivem, principalmente, da hemicelulose (SILVA *et al.*, 2013). Mas ocorre a degradação parcial de carboidratos e lignina, resultando em maior formação de compostos tóxicos que afetarão a hidrólise enzimática e fermentação (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010; TOQUERO e BOLADO, 2014). Os pré-tratamentos alcalinos removem a lignina, enquanto que processos baseados em moagem mantém a composição inicial de biomassa (SILVA *et al.*, 2013).

A etapa de hidrólise pode ser realizada pelo emprego de ácido (diluído ou concentrado) ou de enzimas. É um estágio crítico para atingir um processo de obtenção de etanol que assegure uma conversão máxima desses açúcares e seja compatível com um custo de produção

viável, sob uma visão técnica e econômica (CORTEZ, 2010). Os principais problemas associados à hidrólise ácida devem-se à formação de compostos tóxicos da degradação da biomassa e da corrosão dos equipamentos. Tais produtos tóxicos causam inibição no metabolismo celular quando a biomassa hidrolisada é usada para bioconversão (SILVA *et al.*, 2013). A hidrólise enzimática de celulose em glicose é altamente específica e ocorre em condições amenas de temperatura, pressão e pH. Essas condições são vantajosas porque requerem pouca energia e, por isso, o impacto ambiental é baixo. Esse processo não está totalmente desenvolvido, pois são necessárias grandes quantidades de enzimas, devido à baixa atividade, o que reflete em alto custo financeiro (MOUTTA; FERREIRA-LEITÃO; BON, 2014). Porém, considera-se atualmente que o emprego de enzimas possibilita o melhor aproveitamento dos açúcares presentes na biomassa, pois elas catalisam apenas reações de hidrólise e não degradam os açúcares (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010; SILVA *et al.*, 2010; DANTAS *et al.*, 2013).

Além do exposto, deve-se considerar a forma como a fermentação do hidrolisado pode ser realizada. As duas principais estratégias são: fermentação e hidrólise separadas (SHF – *separate hydrolysis and fermentation*); e sacarificação (hidrólise) e fermentação simultâneas – SFS: *simultaneous saccharification and fermentation* (TOMAS-PEJO *et al.*, 2008; WINGREN; GALBE; ZACCHI, 2003). Para a escolha de cada processo, há vários aspectos a serem analisados, sendo que a principal diferença é que no SHF a hidrólise e fermentação ocorrem em suas condições ótimas, especialmente quanto à temperatura. Já em SSF, a temperatura ótima deve ser a do micro-organismo (geralmente não superior a 35 °C), o que implica que a hidrólise enzimática está em condição sub-ótima. Apesar de a hidrólise enzimática estar em sua temperatura ótima (45 a 50 °C) em SHF, o rendimento da hidrólise é afetado pela inibição provocada pelas altas concentrações de glicose, produto final da hidrólise. Isso não ocorre no SFS, devido ao consumo simultâneo do açúcar pelo micro-organismo fermentativo (CANELLA e JØRGENSEN, 2014).

## **Micro-organismos para fermentação**

Leveduras são micro-organismos eucariotos unicelulares que, de modo geral, preferem usar glicose, frutose ou manose, porém são capazes de crescer em uma grande variedade de fontes de carbono, podendo ser encontrados em diversos ambientes (LAUNDRY *et al.*, 2006). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é quase um organismo

domesticado, fundamentalmente associado à panificação e produção de bebidas alcoólicas e, por este fator, é o micro-organismo melhor estabelecido para fermentação de hexoses em escala industrial. Isso porque é capaz de fermentar mesmo na presença de oxigênio, tolerar as altas concentrações de etanol na fase final da fermentação; suportar baixos níveis de pH do meio e o estresse osmótico provocado pelas altas concentrações de açúcares; além de sobreviver à pressão hidrostática provocada pelo grande volume de líquido contido nas dornas de fermentação (LAGUNAS, 1986; LANDRY *et al.*, 2006). Historicamente, *S. cerevisiae* também é o micro-organismo mais utilizado para experimentação laboratorial, tendo sido o primeiro eucarionte a ser transformado com plasmídeos, o primeiro cujos genes foram silenciados e o primeiro a ter seu genoma sequenciado (FORSEBURG, 2001). No entanto, é incapaz de metabolizar eficientemente pentoses como a xilose (MATSUSHIKA *et al.*, 2008), embora possua genes que codificam enzimas capazes de metabolizar esse açúcar (TOIVARI *et al.*, 2004; HARCUS *et al.*, 2013).

Diferentemente de *S. cerevisiae*, outras espécies de leveduras como *Candida intermedia*, *C. jeffriesii*, *C. shehatae*, *C. succiphila*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia tannophilus*, *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis*, são capazes de crescer e fermentar xilose com diferentes graus de rendimento de etanol (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 1994; TAVARES *et al.*, 2000; GARDONYI *et al.*, 2003; RYABOVA; CHMIL;SIBIRNY, 2003; STAMBUK *et al.*, 2003; NGUYEN *et al.*, 2006; JEFFRIES *et al.*, 2007; CADETE *et al.*, 2009). Estas leveduras foram isoladas de vários locais – geralmente ricos em açúcares, incluindo exsudados de árvores, intestinos de insetos perfuradores de madeira, além de madeira, frutas em decomposição e resíduos agrícolas ou agroindustriais (TOIVOLA *et al.*, 1984; NIGAM *et al.*, 1985; SUH *et al.*, 2003; RAO *et al.*, 2006; CADETE *et al.*, 2009; LARA *et al.*, 2014). Elas, entretanto, não demonstram a mesma capacidade fermentativa de *S. cerevisiae* em condições industriais, uma vez que apresentam baixa tolerância ao etanol, à pressão osmótica, à presença de inibidores e aos níveis de pH ácido e requerem, em sua maioria, condições micro-aeróbias para uma fermentação mais eficiente (JEFFRIES e SHI, 1999; HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2001).

A levedura *Scheffersomyces stipitis*, previamente conhecida como *Pichia stipitis* (KURTZMAN e SUZUKI, 2010), foi isolada do intestino de besouros digestores de madeira, um ambiente rico em pentoses. É capaz de fermentar uma ampla variedade de açúcares

contidos na biomassa lignocelulósica (BALAGURUNATHAN *et al.*, 2012) e uma das melhores espécies fermentadoras de xilose encontradas na natureza, capaz de produzir altos níveis de etanol a partir deste açúcar (TOIVOLA *et al.*, 1984; DU PREEZ *et al.*, 1986, 1989; NIGAM, 2001). Entretanto, para a indústria, têm algumas desvantagens como baixa tolerância ao etanol e incapacidade de crescimento em condições anaeróbias (DU PREEZ *et al.*, 1989; SHI e JEFFRIES, 1998; BALAGURUNATHAN *et al.*, 2012). Além disso, o aumento no rendimento de etanol por *S. stipitis* é difícil porque a micro-aeração aumenta a produtividade de etanol significativamente, mas se não for bem controlada - dificilmente conseguida na indústria - irá diminuir o rendimento por permitir que a cultura respire o açúcar ao invés de fermentá-lo (SLININGER *et al.*, 2014).

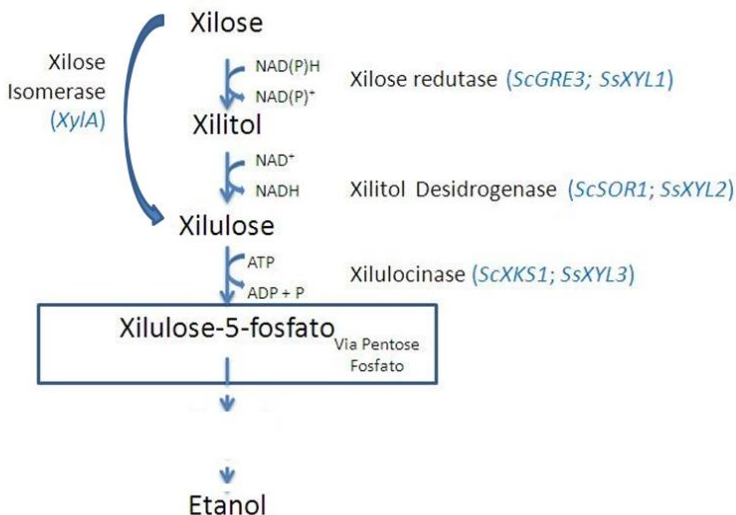
*Spathaspora passalidarum* e *Spathaspora arborariae* também são importantes espécies de leveduras fermentadoras de xilose. A primeira foi isolada do intestino de besouros que se alimentam de madeira (NGUYEN *et al.*, 2006) e a segunda foi isolada a partir da madeira em decomposição de duas diferentes localidades do Brasil (CADETE *et al.*, 2009). Ambas as espécies são reconhecidas pela sua capacidade de produção de etanol por meio da fermentação de xilose e também de hidrolisados lignocelulósicos de cana-de-açúcar, com a vantagem de serem tolerantes a compostos inibidores gerados a partir da hidrólise da biomassa lignocelulósica (NGUYEN *et al.*, 2006; CADETE *et al.*, 2009, 2012, 2013; CUNHA-PEREIRA *et al.*, 2011). Em recente estudo, *S. passalidarum* demonstrou capacidade em converter xilose em etanol em condições anaeróbias com eficiência superior àquela observada em *S. stipitis*, com menor acúmulo de xilitol. Além disso, ao contrário de *S. stipitis* que não consegue co-utilizar xilose e glicose, *S. passalidarum* consumiu simultaneamente xilose e glicose em condições aeróbias (apesar de não produzir etanol). Quando apenas um açúcar estava presente, essa levedura consumiu xilose mais rápido que glicose. Também co-fermentou misturas de glicose com xilose e glicose, xilose e celobiose, além de hidrolisados em condições de restrição de oxigênio (HOU, 2012; LONG *et al.*, 2012). Essa levedura ainda foi capaz, em condições anaeróbias, de consumir simultaneamente xilose e glicose (HOU, 2012).

Apesar da existência desses micro-organismos, é desafiador alcançar altos rendimentos de etanol a partir de pentoses em larga escala, porque ainda não foi encontrado um micro-organismo que combine a capacidade de converter pentoses em etanol de maneira robusta e que suporte a presença de inibidores da fermentação (HAHN-

HÄGERDAL e PAMMENT, 2004; CHANDEL *et al.*, 2011; CADETE *et al.*, 2012). No entanto, podem fornecer genes para transformação de linhagens *S. cerevisiae* industriais que não possuam a capacidade de fermentação de xilose (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2007; WOLBACH *et al.*, 2011). Os genomas de *S. stipitis*, *S. passalidarum* e *S. arborariae* foram sequenciados e diferentes genes para a bioconversão de lignocelulose foram identificados (JEFFRIES *et al.*, 2007; WOLBACH *et al.*, 2011; LOBO *et al.*, 2014).

### **Metabolização de xilose**

As pentoses são uma fonte de carbono e energia para os fungos e o metabolismo destes açúcares envolve uma via diferente das hexoses. Após a entrada na célula, a xilose pode ser convertida em xilulose pela rota de oxido-redução (FIGURA 2) – presente em fungos filamentosos e leveduras – em que a xilose é reduzida a xilitol pela xilose redutase (XR) e, depois o xilitol é oxidado a xilulose pela xilitol desidrogenase (XDH). Outra rota existente (FIGURA 2) utiliza apenas uma etapa de isomerização do açúcar diretamente em xilulose, por meio da enzima xilose isomerase (XI), presente em bactérias e alguns fungos filamentosos. No passo seguinte, a xilulose é fosforilada pela enzima xilulocinase (XK) para formar xilulose-5-fosfato, que é direcionada para a via (não-oxidativa) das pentoses fosfato. Intermediários de três e seis carbonos resultantes entram, então, na glicólise e são fermentados até etanol (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2007; JEFFRIES, 2006). A Figura 2 também apresenta a estequiometria e rendimento teórico de etanol a partir da glicose e xilose.



**Figura 2: Rotas de metabolização de xilose e rendimento teórico de etanol a partir de glicose e xilose.** *Sc: Saccharomyces cerevisiae; Ss: Scheffersomyces stipitis.* Adaptado de Kim *et al.*, 2013.

Em *S. cerevisiae*, o gene *GRE3* codifica uma xilose redutase. Esse gene é homólogo aos genes *XYL1* de *S. stipitis* e *GRE3* de *C. albicans*. Para a enzima xilitol desidrogenase, os genes correspondentes nessas três leveduras (*ScSOR1*, *SsXYL2* e *CaXYL2*) também são conservados. Recentemente, foi demonstrado que os genes *GRE3* e *SOR1* de *S. cerevisiae* restabeleceram a capacidade de utilizar xilose quando expressos em linhagem de *C. albicans* mutante *gre3Δ* e *xyl2Δ* (HARCUS *et al.*, 2013). Além disso, em trabalho recente, foi demonstrado que a expressão de *GRE3* e *XYL2* em linhagem industrial *Saccharomyces cerevisiae* foi maior na fermentação contendo xilose como única fonte de carbono do que em meio com glicose (MATSUSHIKA, GOSHIMA, HOSHINO, 2014).

Entretanto, as expressões de *GRE3* e *SOR1* são muito baixas em *S. cerevisiae*, sendo um dos fatores pelos quais a levedura não fermenta xilose. Existem outras dificuldades como o fato da fermentação de xilose ser estritamente dependente do nível de oxigenação, sendo favorecida sob condições micro-aeróbias (MORAIS *et al.*, 2013). Além disso, na maioria das espécies, XR utiliza preferencialmente NADPH, enquanto XDH utiliza estritamente NAD<sup>+</sup>, causando um desequilíbrio dos cofatores. Em *S. stipitis*, apesar de XR preferir NADPH, a enzima

exibe boa afinidade com NADH. Por isso, seus genes, *XYL1* (que codifica XR) e *XYL2* (XDH) são comumente expressos em *S. cerevisiae* para possibilitar a utilização dessa pentose (KÖTTER e CIRIACY, 1993; TANTIRUNGKIJ *et al.*, 1993; HO *et al.*, 1998; HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2007).

Porém, mesmo com avanços no conhecimento bioquímico e sequenciamentos completos do genoma disponíveis, o metabolismo de xilose e o desbalanço redox dos cofatores são ainda pouco compreendidos (GUO e JIANG, 2013). Recentemente foi demonstrado que a enzima xilose redutase de *S. passalidarum* possui afinidade maior por NADH quando comparada a NADPH (HOU, 2012), tornando a expressão heteróloga de seus genes em *S. cerevisiae* uma interessante estratégia para melhorar a produção de etanol.

O desequilíbrio de cofatores ocorre também em linhagens recombinantes. Essa situação é uma das principais razões da baixa produtividade de etanol a partir de xilose, produção significativa de xilitol como coproduto e dependência de oxigênio para crescimento em xilose (BRUINENBERG *et al.*, 1983; ELIASSON *et al.*, 2000; JEFFRIES, 2006). Várias estratégias para equilibrar o reciclo de cofatores têm sido experimentadas, como mutagênese sítio-dirigida de XR ou XDH para alternar a dependência de cofatores de modo que utilizem o mesmo tipo (JEPSSON *et al.*, 2006; MATSUSHIKA *et al.*, 2008; BENGTTSSON *et al.*, 2009; XIONG; CHEN; BARFORD, 2011; KHATTAB; SAIMURA; KODAKI, 2013), ou aumento na sobre-expressão de *XYL1* e *XYL2* para aumentar o direcionamento da xilose para xilulose (JEPSSON *et al.*, 2003, 2006; KARHUMAA *et al.*, 2007a; KIM *et al.*, 2012; ZHA *et al.*, 2012).

Uma estratégia bastante empregada é o aprimoramento da expressão coordenada de XR e XDH para diminuir a produção de xilitol e, assim, aumentar a produção de etanol (JEPSSON *et al.*, 2002, 2003; ROCA; HAACK; OLSSON, 2004). A enzima XR é considerada um fator limitante (ZHA *et al.*, 2012; LATIMER *et al.*, 2014) nas primeiras reações do metabolismo de xilose. A razão de expressão dos genes *XYL1* e *XYL2* é muito importante para manter o balanço redox das células (JUN e JIAYI, 2012; ZHA *et al.*, 2012) e a expressão de *XYL2* deve ser em torno de 10 vezes maior que a expressão de *XYL1* (GUO e JIANG, 2013). Porém, essas abordagens nem sempre atingem uma produção de etanol eficiente a partir de xilose, indicando que o desbalanço de cofatores não é a única limitação na via das enzimas XR-XDH (HOU *et al.*, 2007; KRAHULEC; KLIMACEK; NIDETZKY, 2009; KRAHULEC *et al.*, 2010).

A xilose isomerase não necessita de cofatores para converter xilose em xilulose e é comumente utilizada para melhorar a metabolização de xilose em *S. cerevisiae* (KUYPER *et al.*, 2005; KARHUMAA *et al.*, 2007b; PARACHIN *et al.*, 2011, MOON, 2013). A primeira expressão de XI bem-sucedida em *S. cerevisiae* foi a do gene de *Thermus thermophilus* (WALFRIDSSON *et al.*, 1996). Porém, a expressão não foi o suficiente para obter etanol a partir da utilização de xilose. O gene que codifica a enzima XI de *Piromyces* sp. foi isolado em diferentes substratos como das fezes de elefante indiano (KUYPER *et al.*, 2003) ou do solo (PARACHIN e GORWA-GRAUSLUND, 2011). Enzimas XI de outros micro-organismos foram isoladas e funcionalmente expressas em *S. cerevisiae*, como: *Clostridium phytofermentans* (BRAT *et al.*, 2009); *Orpinomyces* sp. (MADHAVAN *et al.*, 2009) e *Prevotella ruminicola* (HECTOR *et al.*, 2013). A atividade das enzimas xilose isomerase foi maior quando a seleção foi realizada diretamente em *S. cerevisiae* ou realizada otimização de códons e evolução dirigida (KUYPER *et al.*, 2005; BRAT *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013). O acúmulo de xilitol também ocorre em linhagens expressando XI, porque a xilose redutase codificada pelo gene *GRE3*, produz xilitol a partir de xilose (BRAT *et al.*, 2009; HA *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2013). Mas já foi demonstrado que a deleção do gene desta redutase permite que a levedura expressando XI produza etanol mesmo em co-fermentação com glicose e xilose (TANINO *et al.*, 2010).

Estudos para otimização do metabolismo de xilose ainda estão em andamento e, em vista disso, é difícil determinar qual via é melhor para a engenharia metabólica de *S. cerevisiae* (KIM *et al.*, 2013). Após a isomerização ou oxido-redução de xilose em xilulose, a próxima reação é fosforilação da xilulose em xilulose 5-fosfato pela enzima xilulocinase (XK). Embora *S. cerevisiae* possa metabolizar a xilulose, essa metabolização ocorre de maneira bastante lenta devido à baixa expressão da enzima na levedura (DENG e HO, 1990; ELIASSON *et al.*, 2000). Para aumentar a atividade de XK em *S. cerevisiae*, geralmente é realizada a sobre-expressão do seu gene endógeno (*XKS1*).

Altas atividades de XR e XDH e atividade moderada de XK em uma linhagem *S. cerevisiae* resultaram em acúmulo basal de xilitol e maior produção de etanol (MATSUHIKA e SAWAYAMA, 2008). Recentemente, foi demonstrado que a expressão de *XKS1* em linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* é duas vezes maior em meio contendo xilose como única fonte de carbono do que em meio com glicose. Mais especificamente, a expressão de *XKS1* na linhagem



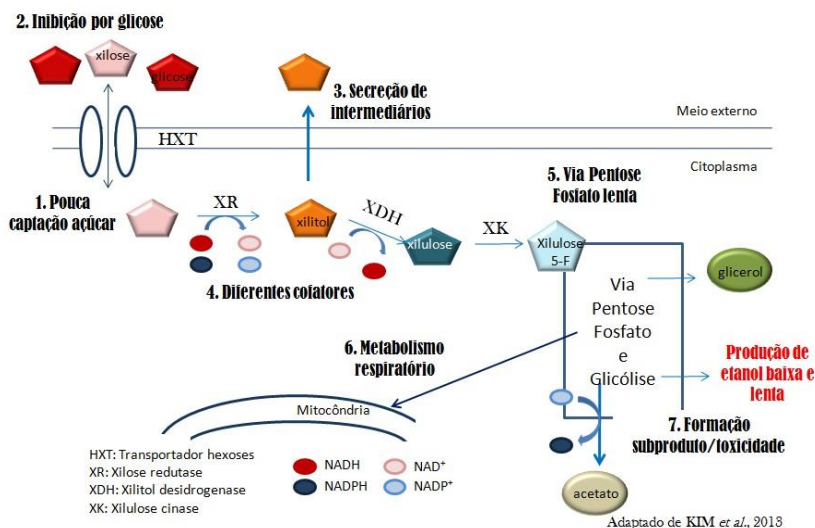
industrial foi maior do que em linhagem laboratorial sob as mesmas condições de fermentação (MATSUSHIKA, GOSHIMA, HOSHINO, 2014). No entanto, alguns trabalhos sugerem que a alta expressão dos genes da xilulocinase (XK) pode causar inibição de crescimento em xilose ou reduzir o consumo de xilose. O efeito deletério da sobre-expressão do gene de XK pode ser explicado pelo efeito “morte acelerada por substrato” (TEUSINK *et al.*, 1998). Esse efeito não acontece na glicólise, pois a enzima hexocinase é regulada pelo seu produto (glicose-6-fosfato) para evitar sua atividade acelerada. Entretanto, a sobre-expressão de XK não tem nenhum sistema de regulação e um consumo elevado de ATP pela XK pode exceder sua produção, resultando na depleção de energia (JIN *et al.*, 2003). Por outro lado, também foi sugerido que a alta expressão do gene de XK foi o fator mais importante para diminuir o acúmulo de xilitol em linhagens sobre-expressando XR-XDH (MATSUSHIKA e SAWAYAMA, 2011) ou XI (PARACHIN *et al.*, 2011). Estas contradições sugerem que o fluxo metabólico na via de metabolização de xilose com as três enzimas integradas pode ser mais importante que as atividades individuais das enzimas para minimizar o acúmulo de xilitol e aumentar o rendimento de etanol (KIM *et al.*, 2013).

Além das estratégias já comentadas, existem outras amplamente pesquisadas: o equilíbrio de expressão dos genes *XYL1*, *XYL2* e *XKS1* conjuntamente (ELIASSON *et al.*, 2000; MATSUSHIKA *et al.*, 2008); engenharia evolutiva para melhorar a expressão dos genes envolvidos na metabolização da xilose (ZHA *et al.*, 2014); sobre-expressão dos genes da via das pentoses fosfato (JOHANSSON e HAHN-HÄGERDAL, 2002; JIN *et al.*, 2005; KARHUMAA; HAHN-HÄGERDAL; GORWA-GRAUSLUND, 2005; KUYPER *et al.*, 2005; MATSUSHIKA *et al.*, 2012; PENG *et al.*, 2012; HASUNUMA *et al.*, 2014); sobre-expressão de genes heterólogos para melhorar o balanço dos cofatores necessários (SALUSJÄRVI *et al.*, 2013; HOU *et al.*, 2014), e expressão heteróloga de transportadores de xilose (HECTOR *et al.*, 2008; KATAHIRA *et al.*, 2008).

É apontado também que, para conseguir boa utilização de xilose, é necessário que os genes para o metabolismo dessa pentose estejam sob a atividade de um promotor forte e estejam preferencialmente inseridos no genoma da levedura (ZHA *et al.*, 2012). Mas Cao e colaboradores (2014) observaram que as expressões de *XYL1*, *XYL2*, *XKS1* e *TAL1* sob a atividade de promotores fortes como PGK e ADH1 eram mais efetivos durante a fase com glicose. Entretanto, suas expressões durante a fase de xilose foi insuficiente para

o rápido metabolismo de xilose. Os pesquisadores então verificaram quais genes eram induzidos por xilose e obtiveram a melhor utilização de xilose e maior rendimento de etanol quando os genes *XKS1* e *TAL1* estavam em plasmídeos sob o promotor do gene *KGD1* (codifica a enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase) que é induzível mas relativamente fraco (CAO *et al.*, 2014).

A Figura 3 apresenta as principais limitações do metabolismo de xilose em leveduras recombinantes *S. cerevisiae*. Além dos desafios existentes quanto à metabolização de xilose, deve-se considerar que em condições industriais será exigido que o micro-organismo seja capaz de fermentar outros açúcares simultaneamente no mostro de fermentação, como a glicose e sacarose. Em *S. cerevisiae*, a glicose tem dois efeitos principais na expressão gênica: induz a transcrição de genes de enzimas glicolíticas, proteínas ribossomais e transportadores de glicose necessários para o metabolismo de glicose por um processo chamado indução por glicose; e também reprime a expressão de uma variedade de genes para proteínas necessárias para a respiração.



**Figura 3: Principais problemas na fermentação de xilose em *S. cerevisiae*.** 1: pouca captação de xilose pelos transportadores; 2: inibição dos transportadores pela glicose; 3: secreção de intermediários como xilitol; 4: utilização de diferentes cofatores pelas enzimas XR e XDH; 5: baixa atividade das enzimas da via das pentose fosfato; 6: transferência dos carbonos para metabolismo respiratório; 7: formação de subprodutos, causando toxicidades às células. Adaptado de Kim *et al.*, 2013.

## Transporte de açúcares

Leveduras, como outros micro-organismos, são capazes de utilizar uma variedade de açúcares como fonte de energia para o metabolismo e crescimento celular. Um passo obrigatório para a utilização desses compostos de carbono é seu transporte através da membrana plasmática, seja de maneira intacta, ou pela ação de hidrolases extracelulares que hidrolisam o açúcar em seus componentes monossacarídeos (HORAK, 2013).

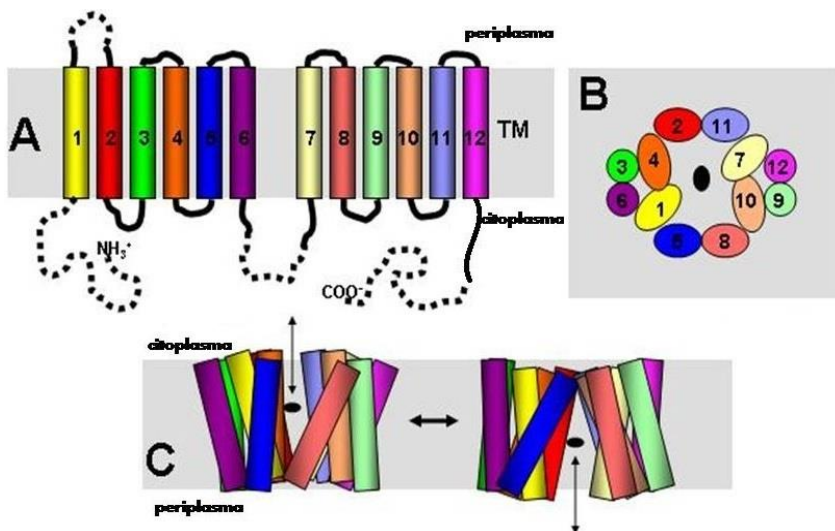
É amplamente reconhecido que o transporte de compostos de carbono, na maioria dos casos, é o fator limitante para a fermentação até mesmo de açúcares utilizados eficientemente pelas leveduras (REIJENGA *et al.*, 2001; ROSSEL *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2007, 2008). Nesse sentido, alguns estudos têm demonstrado que o aumento da atividade de transporte – seja com a sobre-expressão dos transportadores ou com a utilização de proteínas mutantes com maior afinidade pelo substrato ou maior resistência à inativação – tende a incrementar a capacidade fermentativa das células diante das respectivas fontes de carbono (KODAMA *et al.*, 1995; STAMBUK *et al.*, 2006; SMIT; CORDERO-OTERO; PRETORIUS, 2007; HATANAKA *et al.*, 2009; VIDGREN *et al.*, 2009).

Os transportadores de açúcares são proteínas transmembrana ancoradas na membrana celular (MARTIN-GALIANO e FRISHMAN, 2006) e pertencem à família de transportadores *Major Facilitator Superfamily* (MFS), que é a maior superfamília de carreadores secundários classificados. MFS é universalmente distribuída em todos os filos conhecidos, com mais de 5.000 membros já sequenciados. Foram classificadas pelo menos 74 famílias de transportadores, sendo que cada uma está envolvida em uma variedade de processos fisiológicos ou captação de substrato e mostram distintas especificidades (REDDY *et al.*, 2012).

Os transportadores podem realizar a captação de açúcares por difusão facilitada, sem gasto de energia e a favor do gradiente de concentração do açúcar, ou por transporte ativo, com gasto de energia e contra gradiente de concentração. As proteínas de transporte ativo transportam juntamente com o açúcar um ou mais prótons através da membrana. Esse co-transporte pode ser na mesma direção do açúcar (simporte) ou em direção contrária, chamado de antiporte (LAGUNAS, 1993; KOTYK, 1997; HORAK, 1997; BALDWIN, 2000). Além disso, os transportadores podem ser classificados conforme sua afinidade pelo substrato: baixa, moderada ou alta afinidade. Transportadores de baixa

afinidade apresentam alto  $K_m$  e geralmente são expressos quando o açúcar está presente em alta concentração. O componente de alta-afinidade é expresso em meios com pouco açúcar, e reprimido e inativado por altas concentrações de açúcar (BISSON e FRAENKEL, 1983a; 1983b; MCCLELLAN e BISSON, 1988; RAMOS; SZKUTINICKA; CIRILLO, 1988; POSTMA; SCHEFFERS; VAN DIJKEN, 1989; DU PREEZ *et al.*, 2000). O sistema de transporte de difusão facilitada é usualmente um transporte de baixa afinidade, enquanto que o componente de alta afinidade são os transportadores ativos que usam a força próton motriz para transportar ativamente o açúcar para dentro das células. Esses diferentes sistemas de transporte são fortemente regulados pela concentração de substrato extracelular (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 2007; LEANDRO; FONSECA; GONÇALVES, 2009).

Os transportadores (FIGURA 4) caracterizam-se pela presença de 12  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas, conectadas entre si por *loops* hidrofílicos, atravessando a membrana em zigue-zague (HENDERSON, 1993). Possuem sequências amino e carboxila-terminal longos voltados para o citoplasma da célula, além de um domínio citoplasmático separando os segmentos transmembrana (TMs) em dois blocos de seis (SAIER-JR, 2000). Estas informações estruturais foram deduzidas a partir da análise da hidrofobicidade da sequência de aminoácidos e da estrutura das proteínas (LAW; MALONEY; WANG, 2009). Há poucas estruturas tridimensionais resolvidas e, apesar das proteínas transportadoras de açúcares na levedura *S. cerevisiae* serem importantes para os inúmeros processos fermentativos em que estão envolvidas, pouco se sabe acerca de suas estruturas (NISHIZAWA *et al.*, 1995; KASAHARA e KASAHARA, 1996; 1997; 2000a; 2000b; 2003; 2004).



**Figura 4:** Esquema da estrutura secundária dos transportadores de açúcares pertencentes à MFS. **A:** Arranjo dos 12 segmentos transmembrana em dois domínios. **B:** Posição dos 12 segmentos no plano da membrana (substrato representado pela esfera preta). **C:** Modelo de acesso alternante para o transporte do substrato. Adaptado de Abramson *et al.*, 2003; Sorgen *et al.*, 2003.

Embora haja diferenças nas sequências primárias das proteínas pertencentes à MFS, elas partilham uma estrutura tridimensional bastante similar. Como exemplo, dois transportadores ativos de *E. coli*: Glpt, que é um antiporte de glicerol-fosfato e Lacy, que faz a captação de galactosídeos. Essas proteínas possuem apenas 21% de identidade de sequências, mas compartilham praticamente a mesma estrutura tridimensional (LAW; MALONEY; WANG, 2009). Assim, acredita-se que todos os membros de MFS compartilham estrutura preservada, mas com diferentes sequências de aminoácidos como já observado para outras famílias de proteínas (VARDY *et al.*, 2004). Já as funções específicas dos transportadores são obtidas por vários conjuntos de aminoácidos no domínio de ligação do substrato e de translocação. Isto sugere a possibilidade de que os dobramentos constituem um arcabouço comum para todos os membros da superfamília com 12 segmentos transmembrana e, que a especificidade pelos substratos é resultante de variações no conjunto de resíduos presentes nos domínios de translocação e de ligação do substrato (LAW; MALONEY; WANG, 2009; KASAHARA e KASAHARA, 2010; MADEJ *et al.*, 2013).

Transportadores envolvidos na captação de hexoses em *S. cerevisiae* já são conhecidos e amplamente pesquisados, sendo descritos mais de 20 genes envolvidos no transporte por difusão facilitada desses açúcares (*HXT1-HXT17*, *GAL2*, *SNF3*, *RGT2*). Desses, os genes *ScHXT1-ScHXT7* codificam as principais permeases responsáveis pelo transporte das hexoses, enquanto que *ScSNF3* e *ScRGT2* são proteínas da membrana plasmática, com alta similaridade aos transportadores ScHxt, mas acredita-se serem incapazes de fazer o transporte de substrato, atuando como sensores da presença de açúcares (LAGUNAS, 1993; WIECZORKE *et al.*, 1999). A levedura *S. cerevisiae* é capaz de transportar pentoses por meio de algumas das proteínas transportadoras de hexoses que possui (Hxt1, Hxt2, Hxt4, Hxt5, Hxt7 e Gal2). Contudo, a falta de um sistema de transporte específico de xilose em *S. cerevisiae* é um fator limitante para a utilização eficiente desse açúcar (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2001; YOUNG *et al.*, 2011; MOON *et al.*, 2013). O transporte de açúcares e mais especificamente de xilose também é um problema em outros micro-organismos, como na bactéria *Zymomonas mobilis*, que produz grande quantidade de etanol a partir de glicose, mas não a partir de xilose (DUNN e RAO, 2014). Nesse sentido, já foi demonstrado que quando há o melhoramento da via de utilização da xilose em leveduras recombinantes, o transporte de xilose apresenta controle significativo na utilização desse açúcar (GARDONYI *et al.*, 2003).

Os transportadores ScHxt possuem afinidade muito mais alta para hexoses que pentoses (KRUCKEBERG *et al.*, 1999; DU; LI; ZHAO, 2010; JOJIMA *et al.*, 2010) e logo, são mais eficientes no transporte de glicose que xilose (KÖTTER e CIRIACY, 1993). Assim, ocorre inibição por competição em uma co-fermentação contendo os dois açúcares (HO *et al.*, 1999, 2000; HA *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2010), resultando na utilização sequencial de glicose e xilose, com baixo rendimento e produtividade de etanol (KIM *et al.*, 2012).

Mesmo em leveduras capazes de utilizar xilose, a maioria dos micro-organismos prefere utilizar inicialmente glicose (JUN e JIAYI, 2012). Obter cepas capazes de utilizar simultaneamente hexoses e pentoses é atualmente um dos maiores desafios para a produção competitiva de combustíveis celulósicos (LIAN *et al.*, 2014). Com esse objetivo, a expressão de transportadores exclusivos para pentoses é uma estratégia interessante (YOUNG *et al.*, 2010). Diversas pesquisas realizaram a expressão heteróloga em *S. cerevisiae* de transportadores de diferentes micro-organismos: *Arabidopsis thaliana*, *Candida intermedia*, *Debaryomyces hansenii*, *S. stipitis* e *Trichoderma reesei*

(SALOHEIMO *et al.*, 2007; HECTOR *et al.*, 2008; LEANDRO; SPENCER-MARTINS; GONÇALVES, 2008; RUNQUIST *et al.*, 2009; DU; LI; ZHAO, 2010; YOUNG *et al.*, 2011, 2012). Entretanto, apenas alguns transportadores de pentose foram identificados até agora, com melhora limitada na fermentação de pentoses (HECTOR *et al.*, 2008; KATAHIRA *et al.*, 2008; RUNQUIST *et al.*, 2009, 2010; SUBTIL e BOLES, 2011, 2012).

Todos os transportadores de baixa afinidade para xilose descobertos transportam também a glicose, com maior afinidade por esta. Ademais, a captação de xilose é fortemente reprimida por glicose, por causa da competição pelo mesmo transportador e desse modo, essa pentose só é utilizada após a depleção da glicose no meio (WEBB e LEE, 1990; SANCHEZ *et al.*, 2002; YABLOCHKOVA *et al.*, 2003; WIECZORKE *et al.*, 2003; SEDLAK e HO, 2004; LEANDRO; GONÇALVES; SPENCER-MARTINS, 2006; LEANDRO; SPENCER-MARTINS; GONÇALVES, 2008). Além da competição pelo transportador, a concentração de glicose no meio regula o metabolismo e atividade celular de *S. cerevisiae*, além de regular também sua expressão gênica (KRUCKEBERG *et al.*, 1999). A repressão catabólica por glicose também dificulta a eficiente utilização de xilose por inibir a transcrição de genes envolvidos na utilização de fontes alternativas de carbono (TRUMBLY, 1992; CARLSON, 1999; WESTERGAARD *et al.*, 2007).

Tanino e colaboradores (2012) expressaram em plasmídeos os genes *ScHXT1*, *ScHXT7*, *GXS1* e *GXF1* (os dois últimos são transportadores de *C. intermedia*) em *S. cerevisiae* com XI integrado no genoma e *gre3* deletado. Em meio com xilose como única fonte de carbono, o consumo de xilose foi maior pela linhagem expressando *ScHXT1*, seguido de *CiGXF1* e *CiGXS1*. Em geral, foram consumidos 80% do açúcar presente com produção de etanol de 71% do máximo teórico por grama de xilose. É considerando como máximo teórico 0,46 g de etanol por grama de xilose (KIM *et al.*, 2013). A permeasse expressa pelo gene *ScHXT7* não melhorou a captação e a produção de etanol quando comparado com a linhagem controle.

Transportadores de xilose também podem ser isolados de fungos filamentosos, como *Neurospora crassa*. A utilização de genomas de fungos é um bom recurso para encontrar novos elementos genéticos, como transportadores de xilose, para a engenharia metabólica na fermentação de xilose por *S. cerevisiae*. Recentemente, Li e colegas (2014), por meio de análise do transcriptoma de *N. crassa*, identificaram e caracterizaram três novos genes: um que codifica transportador de

glicose, *NaGLT1* (NCU01633) e dois transportadores de pentoses, sendo um capaz de transportar apenas xilose, *NaXYT1* (NCU05627), e o outro capaz de transportar xilose e arabinose, *NaXAT1* (NCU01132).

Transportadores para xilose já foram descritos em *S. stipitis* (KILIAN e VAN UDEN, 1988; DOES e BISSON, 1989), evidenciando que essa levedura, amplamente utilizada para melhorar o metabolismo de xilose, pode ser também fonte para expressão de permeases em *S. cerevisiae*, mas ainda não foi possível clonar transportadores de xilose com alta eficiência de *S. stipitis* (YOUNG *et al.*, 2010). Além disso, permeases de espécies como *C. succiphila* e *K. marxianus*, que apresentam sistemas de transporte de alta e baixa afinidade para xilose (STAMBUK *et al.*, 2003), ainda não foram expressos em *S. cerevisiae*. Também não foram expressos transportadores das leveduras fermentadoras de xilose *Spathaspora passalidarum* (NGUYEN *et al.*, 2006) e *S. arborariae* (CADETE *et al.*, 2009).

No presente trabalho foi obtida uma linhagem de *S. cerevisiae* que possibilitasse a investigação da expressão de novos genes codificadores de transportadores de xilose. A linhagem *S. cerevisiae hxt-null*, com expressão de genes para a metabolização de xilose (*SsXYL1*, *SsXYL2* e *ScXKS1*), foi transformada com genes que codificam transportadores endógenos dessa levedura. Ainda, essa linhagem foi utilizada para identificar transportadores de xilose a partir de uma biblioteca genômica da levedura fermentadora de xilose *Scheffersomyces stipitis*. Numa outra abordagem, a partir do sequenciamento do genoma das leveduras *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum*, sequências de possíveis transportadores foram expressos pela primeira vez em *S. cerevisiae*.



## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Contribuir com a melhoria da produção de etanol de segunda geração pela identificação de novos transportadores de xilose em linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*.

### Objetivos específicos

**Construir uma linhagem de *S. cerevisiae* para caracterizar transportadores de xilose:** em linhagem de *S. cerevisiae hxt-null* foram inseridos genes necessários para o metabolismo de xilose.

**Clonar genes que codificam transportadores de açúcares de *S. cerevisiae*:** os genes de *S. cerevisiae HXT1*, *HXT2*, *HXT5* e *HXT7* foram clonados e expressos na linhagem *S. cerevisiae hxt-null*.

**Identificar genes de *Scheffersomyces stipitis* que codificam transportadores de xilose:** uma biblioteca genômica de *S. stipitis* foi utilizada para identificar insertos capazes de conferir o crescimento em xilose à linhagem *S. cerevisiae hxt-null*.

**Clonar genes de *Spathaspora arborariae* e *S. passalidarum* que apresentem homologia a transportadores de açúcares:** foram identificados genes de interesse no genoma dessas leveduras, clonados e expressos na linhagem *S. cerevisiae hxt-null*.

**Analisar a utilização de xilose e outros açúcares pela linhagem de *S. cerevisiae* expressando os transportadores endógenos e heterólogos:** a capacidade das linhagens recombinantes em consumir e fermentar açúcares como glicose, frutose e xilose foram avaliadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Linhagens e meios de cultura utilizados

As linhagens de levedura utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1. A bactéria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi usada para clonagem. *E. coli* foi crescida a 37 °C, em meio Luria Bertani (10% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio, pH 7,5) suplementado, quando necessário, com ampicilina (100 mg/L). As leveduras foram crescidas em meio complexo YP (1% extrato de levedura, 2% Bacto Peptona) contendo 2 % do açúcar requerido, ou meio sintético YNB sem adição de uracila (0,67% base nitrogenada para leveduras sem aminoácidos, suplementado com 1,92 g/L de mistura de aminoácidos sem uracila – ambos da Sigma-Aldrich) contendo 2% de maltose ou das quantidades indicadas de glicose, xilose, frutose, galactose ou manose. O pH dos meios foi ajustado para pH 5,0 com HCl. Quando necessário, foram adicionados 2% de Bacto ágar, 200 mg/L de Geneticina e/ou 0,5 mg/L de Aureobasidina A (Takara Bio, Kyoto, Japão). Todos os meios foram esterilizados em autoclave, a 120 °C por 20 minutos (AUSUBEL *et al.*, 1995).

### Condições de crescimento e fermentação

As linhagens de levedura foram pré-crescidas em meio sintético YNB sem uracila contendo 2% de maltose por 36 horas a 28 °C. Foram então centrifugadas a 6.000 g por 5 minutos em temperatura de 25 °C e lavadas duas vezes com água destilada estéril. As células foram usadas para inocular 50 mL de meio estéril indicado. A biomassa inicial para os crescimentos foi ajustada para 0,1 g/L  $\pm$  0,02. Os experimentos foram realizados em frascos fechados de 250 mL em *shaker* com agitação rotacional a 160 rpm por um período de até 96 horas. Para os experimentos de fermentação, as células foram pré-crescidas como descritas acima e inoculadas em um litro do mesmo meio estéril para obter alta densidade celular. Em seguida as células foram centrifugadas a 6.000 g por 5 minutos em temperatura de 25 °C e lavadas duas vezes com água destilada estéril. As células foram usadas para inocular 25 mL de meio estéril indicado. A biomassa inicial foi ajustada para 5 g/L  $\pm$  2. Os experimentos foram realizados em frascos fechados de 100 mL em *shaker* com agitação rotacional a 160 rpm por um período de até 56 horas. Durante os experimentos, a densidade celular foi monitorada através da medição da absorbância a 600 nm. Amostras foram

recolhidas em períodos de tempo pré-determinados e congeladas a -20 °C para posteriores análises.

Alternativamente, os crescimentos foram realizados com as células pré-crescidas como descrito anteriormente e inoculadas em placa de 96 poços contendo 100 µL de meio sintético *dropout* sem uracila com 2% de maltose, glicose, xilose, frutose ou galactose a 28 °C. O crescimento começou com absorbância a 600 nm inicial de 0,1. As células foram mantidas em agitação rotacional de 160 rpm por até 45 horas em um leitor multifuncional (Tecan Echisto Infinite M200 PRO), sendo a absorbância a 600 nm determinada a cada 15 minutos.

### **Plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados**

Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 2. O plasmídeo integrativo pAUR-XKXDHXR (MASTUSHIKA *et al.*, 2008) contém o promotor e terminador do gene *PGK* que codifica a proteína fosfogliceratocinase. Esse plasmídeo possui três genes que codificam enzimas do metabolismo de xilose. As sequências amplificadas por PCR ou obtidas nas bibliotecas genômicas foram clonadas no plasmídeo pPGK (KANG *et al.*, 1990), um vetor multicópia contendo o promotor e terminador do gene *PGK*, além dos genes *AMP<sup>r</sup>* e *URA3* usados como marcadores de seleção em bactérias e leveduras, respectivamente. Para a construção do módulo de fusão de *GFP* nos genes *SaGET1* e *SaHXT4* foi utilizado o plasmídeo pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6, contendo o gene *KAN<sup>r</sup>* que confere resistência à geneticina (LONGTINE *et al.*, 1998; PETRACEK; LONGTINE, 2002). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste trabalho para amplificação dos genes, fusão do gene *GFP* aos genes e sequenciamento das sequências clonadas estão listados na Tabela 3.

Quando necessário, plasmídeos foram extraídos de bactéria *E. coli* por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Para extração de plasmídeos em leveduras foi utilizado o *kit Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep II* (Zymo Research).

**Tabela 1.** Linhagens de levedura utilizadas neste trabalho.

<b>Linhagens</b>	<b>Genótipo ou Descrição</b>	<b>Fonte ou Referência</b>
<i>Spathaspora arborariae</i>	Linhagem HMD19.1A; isolada de madeira em decomposição; Minas Gerais Brasil	CADETE <i>et al.</i> , 2009
<i>S. passalidarum</i>	Linhagem HMD16.2A; isolada de madeira em decomposição; Amazonas, Brasil	CADETE <i>et al.</i> , 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KY73	<i>MATa hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6 hxt5::LEU2 hxt7::HIS3 gal2Δura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC2</i>	BATISTA <i>et al.</i> , 2004
DLG-K1	KY73, <i>AUR1::pAUR-XKXDHXR</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
DLG-K2C	KY73, <i>AUR1::pAUR-101</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
DLG-K1T1	DLG-K1, <i>pPGK-HXT1</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
DLG-K1T2	DLG-K1, <i>pPGK-HXT2</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
DLG-K1T5	DLG-K1, <i>pPGK-HXT5</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
DLG-K1T7	DLG-K1, <i>pPGK-HXT7</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
BBY-pPGK	DLG-K1, <i>Ppgk</i>	Este trabalho
BBY-D1Ss6	DLG-K1, <i>pPGK-Ss6</i>	Este trabalho
BBY-D1Ss24	DLG-K1, <i>pPGK-Ss24</i>	Este trabalho
BBY-D1Ss37	DLG-K1, <i>pPGK-Ss37</i>	Este trabalho
BBY-D1Ss41	DLG-K1, <i>pPGK-Ss41</i>	Este trabalho
BBY-D1Ss53	DLG-K1, <i>pPGK-Ss53</i>	Este trabalho
BBY-D1Ss80	DLG-K1, <i>pPGK-Ss80</i>	Este trabalho
BBY-D1Ss86	DLG-K1, <i>pPGK-Ss86</i>	Este trabalho
BBY-D1Ss90	DLG-K1, <i>pPGK-Ss90</i>	Este trabalho
BBY-SsHXT2.6	DLG-K1, <i>pPGK-Ss6</i> após retransformação	Este trabalho
BBY-SsXUT1	DLG-K1, <i>pPGK-Ss24</i> após retransformação	Este trabalho

**Tabela 1.** Linhagens de levedura utilizadas neste trabalho (continuação).

<b>Linhagens</b>	<b>Genótipo ou Descrição</b>	<b>Fonte ou Referência</b>
BBY-SsQUP2(37)	DLG-K1, pPGK-Ss37 após retransformação	Este trabalho
BBY-SsQUP2(90)	DLG-K1, pPGK-Ss90 após retransformação	Este trabalho
BBY-SaGET1	DLG-K1, pPGK-SaGET1	Este trabalho
BBY-SaHXT4	DLG-K1, pPGK-SaHXT4	Este trabalho
BBY-SaGET1-GFP	DLG-K1, pPGK-SaGET1-GFP	Este trabalho
BBY-SaHXT4-GFP	DLG-K1, pPGK-SaHXT4-GFP	Este trabalho
BBY-SpSUT1	DLG-K1, pPGK-SpSUT1	Este trabalho

**Tabela 2.** Plasmídeos utilizados neste trabalho.

<b>Plasmídeos</b>	<b>Descrição</b>	<b>Fonte ou Referência</b>
pAUR-101	<i>AURI-C</i>	Takara Bio
pAUR-XXDXHR	<i>AURI-C [PGK1p-XKS1-PGK1t, PGK1p-XYL2-PGK1t, PGK1p-XYL1-PGK1t]</i>	MATSUSHIKA <i>et al.</i> , 2008
pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6	Amp <sup>r</sup> ori GFP(S65T)-T <sub>AHD1</sub> -P <sub>TEF</sub> -kan <sup>r</sup> -T <sub>EF</sub>	LONGTINE <i>et al.</i> , 1998
Ppgk	<i>URA3PGK1p--PGK1t</i>	KANG <i>et al.</i> , 1990
pPGK-HXT1	<i>URA3PGK1p-HXT1-PGK1t</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
pPGK-HXT2	<i>URA3PGK1p-HXT2-PGK1t</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
pPGK-HXT5	<i>URA3PGK1p-HXT5-PGK1t</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
pPGK-HXT7	<i>URA3PGK1p-HXT7-PGK1t</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
pPGK-Ss6	<i>URA3PGK1p-SsHXT2.6-PGK1t</i>	Este trabalho
pPGK-Ss24	<i>URA3PGK1p-SsXUT1-PGK1t</i>	Este trabalho
pPGK-Ss37	<i>URA3PGK1p-SsQUP2-PGK1t</i>	Este trabalho
pPGK-Ss90	<i>URA3PGK1p-SsQUP2-PGK1t</i>	Este trabalho
pPGK-SaGET1	<i>URA3PGK1p-SaGET1-PGK1t</i>	Este trabalho
pPGK-SaHXT4	<i>URA3PGK1p-SaHXT4-PGK1t</i>	Este trabalho
pPGK-SaGET1-GFP	<i>URA3PGK1p-SaGET1-GFP-PGK1t</i>	Este trabalho
pPGK-SaHXT4-GFP	<i>URA3PGK1p-SaHXT4-GFP-PGK1t</i>	Este trabalho
pPGK-SpSUT1	<i>URA3PGK1p-SpSUT1-PGK1t</i>	Este trabalho

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Oligonucleotídeo	Seqüência <sup>a</sup> (5' -- 3')	Utilização
Transp_1F	CCG <u>GGATCC</u> GCATGGCTGATTATAAACAGTAG	Amplificação do gene <i>GET1</i> de <i>S. arborariae</i>
Transp_1R	CGGGATCCC <u>GTTACAACATTTGTCTACGTTCA</u>	Amplificação do gene <i>GET1</i> de <i>S. arborariae</i>
Transp_4F	CCG <u>GGATCC</u> GCATGTCAGGAACAATTAGCCC	Amplificação do gene <i>HXT4</i> de <i>S. arborariae</i>
Transp_4R	CGGGATCCC <u>GTTACTTAAAATACCTCTTCATATTTTC</u>	Amplificação do gene <i>HXT4</i> de <i>S. arborariae</i>
pPGK_SUT1_F	TCGGAATTCAAGCTTGGATCCATGGCTCGCTCAGAAAC TTTAC	Amplificação do gene <i>SUT1</i> de <i>S. passalidarum</i>
SUT1_R1	CCCAAGCTTGGGTTATACGTGTTCTTGGCTTGG	Amplificação do gene <i>SUT1</i> de <i>S. passalidarum</i>
pPGK_seq_F	CAGATCATCAAGGAAGTAATTATCT	Sequenciamento dos genes clonados no pPGK.
tPGK_seq_R	TCTATCGATTTCAATTCAATTCAAT	Sequenciamento dos genes clonados no pPGK.
GET1_GFP_F2	AGAGATTAATGATTTGGACTATGAACGTAGACAAATGT TG <u>CGGATCCCCGGGTTAATTAA</u>	Amplificação do módulo de fusão no gene <i>SaGET1</i> ao <i>GFP</i> do plasmídeo pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6

NOTAS: Nucleotídeos sublinhados indicam o sítio de restrição da enzima *Bam*HI, nucleotídeos em negrito indicam o sítio de restrição da enzima *Hind*III. Nucleotídeos sublinhados e em negrito indicam a seqüência de *GFP-Kan<sup>r</sup>* para o módulo de fusão.

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho (continuação).

Oligonucleotídeo	Sequência <sup>a</sup> (5' -- 3')	Utilização
<b>PGK_KAN_R1</b>	GATCTATCGATTTCAATTCAATTCAAT <u>G</u> CATAGGCCAC <u>T</u> AGTGGATC	Amplificação do módulo de fusão dos genes <i>SaGET1</i> e <i>SaHXT4</i> à GFP do plasmídeo pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6
<b>V-GET1-F</b>	CAACATTTGTCTACGTTTCATAGTCC	Verificação da construção do módulo de fusão do gene <i>SaGET1</i> ao gene <i>GFP</i>
<b>V-HXT4-F</b>	CTTAAAATACCTCTTCATATTTTC	Verificação da construção do módulo de fusão do gene <i>SaHXT4</i> ao gene <i>GFP</i>
<b>V-KAN-R</b>	GGAATCGAATGCAACCGG	Verificação da construção do módulo de fusão do gene <i>SaGET1</i> ou <i>SaHXT4</i> ao gene <i>GFP</i>
<b>HXT4_GFP_F2</b>	TGCCAAAGAGAATTTAAGAAATATGAAGAGGTATTT <u>C</u> G <u>GATCCCCGGGTTAATTAA</u>	Amplificação do módulo de fusão do gene <i>SaHXT4</i> ao <i>GFP</i> do plasmídeo pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6

NOTAS: Nucleotídeos sublinhados indicam o sítio de restrição da enzima *Bam*HI, nucleotídeos em negrito indicam o sítio de restrição da enzima *Hind*III. Nucleotídeos sublinhados e em negrito indicam a sequência de *GFP-Kan<sup>r</sup>* para o módulo de fusão.



## Clonagem de transportadores de xilose

Uma biblioteca genômica comercial (Takara Bio, Japão), preparada cortando-se o DNA genômico da linhagem NBRC-1687 de *S. stipitis* (PIGNAL, 1967) com a enzima de restrição *Bam*HI e inserindo os fragmentos no plasmídeo pPGK, foi utilizada para clonar transportadores de xilose dessa levedura. Alternativamente, transportadores putativos presentes no genoma das leveduras *S. arborariae* (LOBO *et al.*, 2014) e *S. passalidarum* (WOHLBACH *et al.*, 2011) foram identificados através da ferramenta de busca BLAST do site NCBI (ALTSCHUL *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 2008; BORATYN *et al.*, 2013). Através de ferramentas de bioinformática foi verificado que as sequências continham 12 segmentos transmembrana em suas conformações protéicas: *TMpred* (HOFMANN e STOFFEL, 1993), *HMMTOP* (TUSDÁDY e SIMON, 2001) e *TMHMM Server* (MOLLER *et al.*, 2001). Dois genes (denominados *SaGET1* e *SaHXT4*) da linhagem de *S. arborariae* HMD19.1A, e um gene (denominado *SpSUT1*) da linhagem de *S. passalidarum* HMD16.2A foram selecionados para a clonagem no vetor de expressão pPGK. O DNA genômico de *S. arborariae* e de *S. passalidarum* foi extraído utilizando-se o kit comercial YeaStar Genomic DNA (ZymoResearch), de acordo com instruções do fabricante. Cada gene foi amplificado a partir do DNA genômico por PCR. Os oligonucleotídeos empregados foram Transp\_1F e Transp\_1R para o gene *SaGET1*, e os oligonucleotídeos Transp\_4F e Transp\_4R para o gene *SaHXT4* (vide Tabela 3). Esses genes tem cerca de 1,7 Kb e foram amplificados tendo o sítio de restrição da enzima *Bam*HI em suas extremidades. Para o gene *SpSUT1* foram utilizados os oligonucleotídeos pPGK\_SUT1\_F e SUT1\_R1 (vide Tabela 3). Esse gene tem cerca de 1,6 Kb e foi amplificado tendo o sítio de restrição da enzima endonuclease *Hind*III em suas extremidades. Os fragmentos de DNA obtidos por PCR foram analisados por eletroforese em agarose e extraídos do gel utilizando-se o *kit* Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences). Em seguida, as sequências foram clonadas separadamente no plasmídeo pPGK (KANG *et al.*, 1990) no sítio de clonagem da enzima de restrição *Bam*HI ou *Hind*III usando a enzima de ligação T4 ligase (New England Biolabs).

## Programas utilizados para Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Para a amplificação dos genes de *S. arborariae* *GET1* e *HXT4*, de *S. passalidarum* *SUT1* e para amplificação dos módulos para sequenciamento foi utilizada a enzima de alta fidelidade (Phusion High Fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific). Já as reações de PCR realizadas com objetivo de verificar a correta clonagem dos plasmídeos, foi utilizada a enzima GoTaq DNA Polimerase (Promega). As condições das reações foram realizadas conforme orientações dos fabricantes. Foi utilizado o termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) para ambas as finalidades das reações de polimerase em cadeia (PCR).

As reações de polimerase em cadeia foram realizadas utilizando os diferentes oligonucleotídeos mostrados na Tabela 3 com um passo inicial de desnaturação a 94 °C, por 2 minutos, seguido de 30 ciclos compostos por: desnaturação a 94 °C, por 30 segundos; anelamento a 58 °C (para amplificação de *SaGET1*), a 56 °C (amplificação de *SaHXT4*), 59 °C quando utilizados os oligonucleotídeos de sequenciamento, e 60 °C para as amplificações dos módulos de fusão *GFP-Kan<sup>r</sup>* aos genes *SaGET1* e *SaHXT4* e verificação da inserção correta dos módulos aos plasmídeos; e extensão a 68 °C, com duração de 1 minuto por kilobase de fragmento a ser amplificado. As PCRs foram finalizadas com um passo de 5 minutos, a 68 °C, para concluir todas as extensões incompletas.

## Análise de fragmentos de DNA em gel de agarose

Os fragmentos de DNA gerados por PCR ou digestões enzimáticas foram analisados através de seus perfis de migração em géis de agarose submetidos a corridas eletroforéticas. Foram empregados géis de agarose 1,0% (Sigma) em tampão de TBE 0,5 X (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e 2,5 µg/ml de brometo de etídeo. As corridas eletroforéticas foram realizadas com tampão de corrida TBE 0,5 X, a 75 V por 40 a 60 minutos. Após o término da corrida, o gel foi analisado e fotografado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Molecular Imager<sup>®</sup> Gel Doc<sup>™</sup> XR<sup>+</sup> System (BioRad). Os marcadores de tamanho molecular de DNA, utilizados como referência nas corridas eletroforéticas para as análises dos fragmentos de DNA, foram de procedência da New England Biolabs.

## **Transformações de bactérias e leveduras**

As transformações de bactérias foram realizadas pelo método de cloreto de cálcio, ou por eletroporação (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). As transformações de levedura foram realizadas pelo método de acetato de lítio (GIETZ; WOODS, 1992). Alternativamente, foi utilizado um *kit* comercial para transformação de levedura (YEASTMAKER Yeast Transformation System, Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA). As linhagens transformadas com os plasmídeos derivados de pPGK foram selecionadas em meio sintético completo sem uracila com 2% maltose e 0,5 mg/L de Aureobasidina A.

## **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 complexo contendo 2% de maltose e 0,5 mg/L de Aureobasidina A por 24 horas a 30 °C. Após dois ciclos de lavagens com água destilada estéril, as células foram centrifugadas (5.000 rpm, 5 minutos, 4 °C) e ressuspensas em quantidade apropriada de reagente Y-PER (*Yeast Protein Extraction*, Pierce, Rockford, IL, USA). As células foram lisadas em agitador orbital (100 rpm) por 20 minutos. Os lisados celulares foram centrifugados (10.000 rpm, 10 minutos, 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) utilizando-se espectrofotômetro (WPA, Cambridge, UK), utilizando BSA (Bovine Serum Albumin) 2 mg/ml, como padrão.

A atividade de XR foi determinada pelo monitoramento da oxidação de NADPH a 340 nm e 30 °C (SMILEY; 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 pelo monitoramento da redução de NAD<sup>+</sup> a 340 nm a 35 °C (SMILEY; BOLEN, 1982; WALFRIDSSON *et al.*, 1997). A mistura racional para este ensaio contém 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 300 mM de xilitol, 1 mM de NAD<sup>+</sup> 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, a reação foi acoplada com reações da piruvatoquinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH). Dessa forma, a atividade de XK foi determinada pelo monitoramento da oxidação de NADH a 340 nm a 30 °C (SHAMANNA; SANDERSON; 1979; ELIASSON *et al.*, 2000; KATAHIRA *et al.*, 2006). A mistura reacional para esse ensaio contém 100 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,0), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 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 de NADH, 8,5 mM de D-xilulose e 10 µL de extrato enzimático, em reação com volume final de 1 mL.

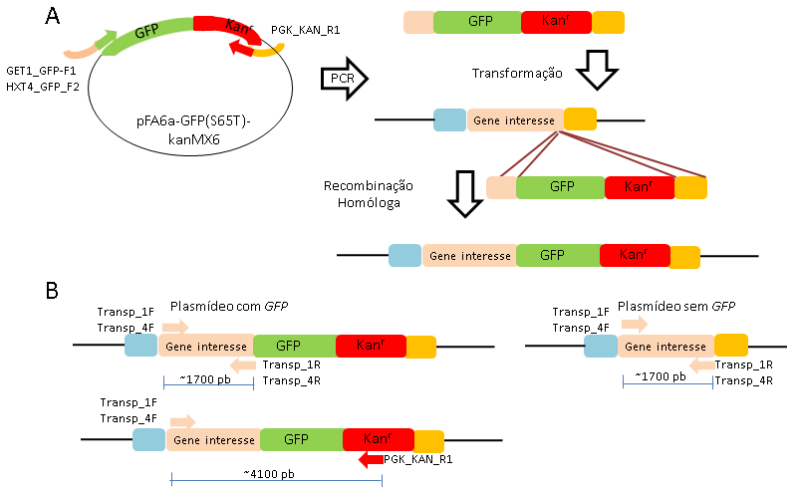
O monitoramento das reações em espectrofotômetro U-3000 (Hitachi, Tokio, Japão) foi feito por 5 minutos, com leituras a cada 30 segundos por amostra, iniciadas logo após a adição das coenzimas. Uma unidade de enzima U corresponde à quantidade de enzima capaz de reduzir ou oxidar 1 µmol de NAD<sup>+</sup>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

### **Sequenciamento dos genes clonados em vetor de expressão pPGK**

Os genes clonados no vetor de expressão pPGK obtidos da biblioteca genômica de *S. stipitis*, e os genes selecionados a partir da análise do genoma das leveduras *S. arborariae* e *S. passalidarum*, tiveram seu DNA sequenciado. Os genes foram amplificados a partir do vetor de expressão, utilizando os oligonucleotídeos pPGK\_seq\_F e tPGK\_seq\_R (Tabela 3). O oligonucleotídeo pPGK\_seq\_F anela-se 100 nucleotídeos anteriores do final da região 5' do promotor de *PGK* no plasmídeo pPGK. O oligonucleotídeo tPGK\_seq\_R anela-se após 100 nucleotídeos do início da região 3' do terminador de *PGK* no plasmídeo pPGK. Em seguida os genes foram extraídos de gel de agarose e purificados com *kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences). Para envio das amostras, 100 a 250 ng do DNA foi adicionado a 4,5 pmol do oligonucleotídeo de sequenciamento (pPGK\_seq\_F ou tPGK\_seq\_R) em um volume final de 6 µL. O sequenciamento foi realizado no Centro de Pesquisa Sobre o Genoma Humano e Células-tronco da Universidade de São Paulo. Alternativamente, amostras foram enviadas também para ACTGene Análises Moleculares LTDA. Além do sequenciamento dos genes clonados nos plasmídeos, foram construídos mapas de restrições dos insertos presentes em cada plasmídeo utilizando-se diferentes enzimas de restrição para analisar os fragmentos gênicos gerados pela hidrólise dos genes com cada enzima.

## Fusão de GFP à extremidade C-terminal das proteínas SaGet1 e SaHxt4

O gene *GFP* foi fusionado à porção 3' dos genes dos transportadores putativos *SaGET1* e *SaHXT4* através da substituição do códon de terminação dos genes *SaGET1* e *SaHXT4* pelo módulo GFP-KanMX por recombinação homóloga e metodologias baseadas em PCR como descrito por Petracek e Longtine (2002). Módulos lineares de DNA com cerca de 2,4 kb foram produzidos através de PCR. Foram utilizados os oligonucleotídeos GET1\_GFP\_F2 e HXT4\_GFP\_F2 (para os genes *SaGET1* e *SaHXT4*, respectivamente) e PGK\_KAN\_R1 para ambos os genes (Tabela 3). Os oligonucleotídeos anelaram-se ao plasmídeo pFA6-GFP(S65T)-kanMX6. Os módulos *GET1*-GFP-KanMX e *HXT4*-GFP-KanMX tem em suas extremidade regiões homólogas às regiões 5' do genes *SaGET1* e *SaHXT4*, respectivamente. Os módulos também tem homologia com a região 3' do terminador *PGK* localizado após os genes *SaGET1* e *SaHXT4* nos plasmídeos pPGK-SaGET1 e pPGK-SaHXT4. Entre essas extremidades estão localizados os genes *GFP* e *Kan<sup>r</sup>* – este confere resistência à Geneticina. Os módulos, quando usados para transformar as linhagens *S. cerevisiae* BBY-SaGET1 e BBY-SaHXT4, integraram-se aos plasmídeos pPGK-SaGET1 ou pPGK-SaHXT4, substituindo o códon de terminação dos genes pelo códon de início de *GFP*. Para isolar as células contendo as modificações esperadas, as linhagens foram plaqueadas em meio SC sólido contendo 2% maltose e 200 mg/L de Geneticina. Na Figura 5 é mostrado esquematicamente como é realizada a fusão do gene *GFP* a um gene de interesse previamente clonado em vetor de expressão.



**Figura 5: Fusão do módulo *GFP-Kan<sup>r</sup>* ao gene de interesse por recombinação homóloga.** A) os módulos *GFP-KanMX*, obtidos por PCR, foram utilizados para transformar células competentes das linhagens BBY-SaGET1 e BBY-SaHXT4, que abrigavam os plasmídeos pPGK-GET1 e pPGK-HXT4, respectivamente. Nessas células, o módulo foi integrado corretamente por recombinação homóloga. B) Após a seleção dos transformantes em meio com geneticina, os oligonucleotídeos Transp\_1F, Transp\_4F e PGK\_KAN\_R1 foram utilizados para a verificação da correta integração do módulo.

Em seguida, as linhagens parentais e os transformantes selecionados foram analisados por PCR com os oligonucleotídeos Transp\_1F e PFK\_KAN\_R1 (para o gene *SaGET1*) e Transp\_4F e PFK\_KAN\_R1 (para o gene *SaHXT4*), permitindo a amplificação de uma banda de aproximadamente 4100 pb nas linhagens contendo a correta inserção do módulo de fusão de *GFP* e nenhuma banda nas linhagens parentais. Além disso, um controle positivo foi feito amplificando os *loci SaGET1* e *SaHXT4* dos plasmídeos nas linhagens parentais e recombinantes, utilizando os oligonucleotídeos Transp\_1F e Transp\_1R, e Transp\_4F e Transp\_4R, respectivamente.

## Microscopia de Fluorescência

A localização das proteínas SaGetT1 e SaHxt4 foram baseadas na observação da distribuição dessas proteínas fusionadas a GFP em células vivas de *S. cerevisiae*, através da microscopia de fluorescência. As linhagens BBY-SaGET1 e BBY-SaHXT4 portando os plasmídeos

pPGK-GET1-GFP e pPGK-HXT4-GFP, respectivamente, foram crescidas em maltose e glicose, centrifugadas e lavadas com água. Amostras das suspensões celulares foram misturadas a um mesmo volume de agarose 1% (pre-aquecida a 60 °C) em lâminas de microscopia e foram visualizadas em um microscópio confocal. As análises foram feitas em um microscópio LSM 510 Meta Confocal Zeiss, com objetiva de 100x, laser de excitação de 488 nm e filtros de emissão NFT 545 (Secondary Dichroic Beam Slitter) e BP 505-530 (Main Dichroic Beam Splitter) ou por contraste de fase. Alternativamente, foi utilizado o Leica DMI6000 B Microscope, com objetiva de 60x. As imagens são representativas dos resultados obtidos.

### **Determinação dos substratos e produtos dos crescimentos e fermentações**

As determinações de maltose, glicose, xilose, frutose, etanol, xilitol, glicerol e ácido acético foram realizadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) equipado com detector de índice de refração (RI-2031Plus, JASCO, Tóquio, Japão) utilizando coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). O HPLC foi operado a 40 °C utilizando como fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM com fluxo de 0,1 mL/min e 10 µL de volume de injeção.

### **Alinhamento de sequências e análise filogenética**

Sequências gênicas e/ou sequências de aminoácidos de transportadores, obtidas do banco de dados NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), foram utilizadas para análises com programas de bioinformática. Os números de acesso dos transportadores utilizados e o micro-organismo de origem estão anotados na Tabela 4. Foram realizados alinhamentos múltiplos utilizando o programa de bioinformática ClustalW Omega de EMBL-EBI – European Bioinformatics Institute (GOUJON *et al.*, 2010; SIEVERS *et al.*, 2011; MCWILLIAM *et al.*, 2013). Para análise filogenética, as sequências foram primeiramente alinhadas com ClustalW Omega e o filograma construído utilizando o programa Dendroscope 2.3 (HUSON *et al.*, 2007).

**Tabela 4.** Números de acesso dos transportadores utilizados para alinhamento das sequências e/ou análise filogenética e seus micro-organismos de origem.

<b>Gene</b>	<b>Origem</b>	<b>GeneID/GenBank</b>
<i>SUT1</i>	<i>S. passalidarum</i>	18873510
<i>SUT1</i>	<i>S. stipitis</i>	4851252
<i>SUT2</i>	<i>S. stipitis</i>	4838413
<i>SUT3</i>	<i>S. stipitis</i>	4839762
<i>SUT4</i>	<i>S. stipitis</i>	4850775
<i>XUT1</i>	<i>S. stipitis</i>	4839826
<i>XUT2</i>	<i>S. stipitis</i>	4852047
<i>XUT3</i>	<i>S. stipitis</i>	4851844
<i>XUT4</i>	<i>S. stipitis</i>	4840896
<i>XUT5</i>	<i>S. stipitis</i>	4840252
<i>XUT6</i>	<i>S. stipitis</i>	4841106
<i>XUT7</i>	<i>S. stipitis</i>	4851701
<i>QUP2</i>	<i>S. stipitis</i>	4840652
<i>HXT2.4</i>	<i>S. stipitis</i>	4850978
<i>HXT2.6</i>	<i>S. stipitis</i>	4838414
<i>AUT1</i>	<i>S. stipitis</i>	4836720
<i>STL1</i>	<i>S. stipitis</i>	4838168
<i>HGT2</i>	<i>S. stipitis</i>	4851832
<i>RGT2</i>	<i>S. stipitis</i>	4840859
<i>GXF1</i>	<i>C. intermedia</i>	AJ937350.1



## RESULTADOS

### Construção de uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* para caracterizar proteínas transportadoras de xilose

Para que seja possível analisar a expressão de novos transportadores de xilose, é necessário que a linhagem a ser transformada seja capaz de metabolizar essa pentose. Além disso, é interessante que a atividade de transporte apresentada pela célula corresponda à atividade do transportador sendo investigado, isto é, que seja da única permease sendo expressa. Com esse objetivo, foi utilizada a linhagem laboratorial *S. cerevisiae* KY73 (BATISTA *et al.*, 2004), cujos principais genes de transportadores de açúcares foram deletados (*hxt1-hx7Δ* e *gal2Δ*). Apesar de existirem mais de 20 genes que codificam transportadores de açúcares em *S. cerevisiae*, a linhagem KY73 deletada em apenas oito desses genes é incapaz de crescer ou consumir monossacarídeos (glicose, manose etc), mas cresce em maltose e outros  $\alpha$ -glucosídeos (maltotriose, isomaltose etc). Essa linhagem foi transformada com o plasmídeo integrativo pAUR-XKXDHXK (MATSUSHIKA *et al.*, 2008) para sobre-expressar os genes *XYL1* e *XYL2* de *S. stipitis*, genes que codificam as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), respectivamente, e sobre-expressar o gene *XKS1* de *S. cerevisiae* que codifica a terceira enzima necessária para a metabolização de xilose, a xilulocinase (XK), já que linhagens *S. cerevisiae* selvagens apresentam níveis muito baixos dessa enzima (DENG; HO, 1990; ELIASSON *et al.*, 2000). A linhagem de *S. cerevisiae* KY73 transformada com o plasmídeo integrativo pAUR-XKXDHXK foi denominada DLG-K1 (GONÇALVES *et al.*, 2014).

A linhagem *S. cerevisiae* KY73 foi também transformada com o plasmídeo controle pAUR-101, sem nenhum gene para metabolizar xilose, dando lugar à linhagem DLG-K2C (GONÇALVES *et al.*, 2014). Na Tabela 5 são mostradas as atividades enzimáticas das linhagens DLG-K1 e DLG-K2C. A linhagem DLG-K1 exhibe altas atividades da xilose redutase ( $1,780 \pm 0,010$  U [mg proteína]<sup>-1</sup>), xilitol desidrogenase ( $2,003 \pm 0,013$  U [mg proteína]<sup>-1</sup>) e xilulocinase ( $0,275 \pm 0,002$  U [mg proteína]<sup>-1</sup>). Pela tabela é possível notar que a linhagem DLG-K2C (*S. cerevisiae* *hxt*-null sem a expressão dos genes para o metabolismo de xilose) apresentou atividades muito baixas (embora mensuráveis) tanto para a atividade de XR, quanto para XDH. As atividades observadas provavelmente são devido à ação endógena de uma xilose redutase, codificada pelo gene *GRE3* de *S. cerevisiae* (ORF YHR104W; TRÄFF

*etal.*, 2002) e XDH codificada pelo gene *XYL2* de *S. cerevisiae* (ORF YLR070C; RICHARD *et al.*, 1999). Por outro lado, a atividade XK na linhagem DLG-K1 é aproximadamente 10 vezes maior do que a observada na linhagem controle DLG-K2C, confirmando a sobre-expressão do gene *XKS1* de *S. cerevisiae*.

**Tabela 5.** Atividade de xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulocinase (XK) em extratos celulares de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-K2C e DLG-K1.

Linhagens	Atividade enzimática <sup>a</sup> (U [mgproteína] <sup>-1</sup> )		
	XR	XDH	XK
DLG-K2C	0,001 ± 0,004	0,008 ± 0,002	0,030 ± 0,003
DLG-K1	1,780 ± 0,010	2,003 ± 0,013	0,275 ± 0,002

NOTA: <sup>a</sup> os valores são a média de três experimentos independentes. FONTE: Gonçalves *et al.*, 2014.

Após a obtenção da linhagem recombinante *S. cerevisiae* DLG-K1, esta foi utilizada para analisar a capacidade de transporte e fermentação de xilose por linhagens contendo genes de transportadores de hexoses de *S. cerevisiae* (*HXT1*, *HXT2*, *HXT5* e *HXT7*) expressados individualmente. Os genes foram obtidos a partir do genoma da linhagem de laboratório *S. cerevisiae* S288C e inseridos no plasmídeo pPGK (KANG *et al.*, 1990) sob o controle do promotor e terminador do gene da enzima fosfogliceratocinase (gene *PGK1*). As linhagens obtidas foram nomeadas DLG-K1T1, DLG-K1T2, DLG-K1T5 E DLG-K1T7, respectivamente (GONÇALVES *et al.*, 2014). As Tabelas 6 e 7 apresentam as velocidades de consumo do açúcar e rendimentos em etanol das fermentações anaeróbias em bateladas pelas linhagens DLG-K1T1, DLG-K1T2, DLG-K1T5 e DLG-K1T7 em meio sintético *dropout* (sem uracila) contendo xilose como única fonte de carbono (Tabela 6) ou misturas de xilose com glicose (Tabela 7).

**Tabela 6.** Parâmetros fermentativos da linhagem *hxt*-null DLG-K1 transformada com os genes *HXT* indicados, em meios contendo xilose.

Transportador	Xilose Consumida (%)	$V_X$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$V_E$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	$Y_{E/S}$ (g g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
<i>ScHXT1</i>	< 5	0,03 ± 0,01	0	0
<i>ScHXT2</i>	58	0,60 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,36 ± 0,00
<i>ScHXT5</i>	< 2	0,03 ± 0,01	0	0
<i>ScHXT7</i>	85	0,70 ± 0,02	0,29 ± 0,00	0,38 ± 0,01

NOTAS: <sup>a</sup> As fermentações foram realizadas em meio sintético com 4-5% de xilose por 72 horas. <sup>b</sup> Velocidade de consumo volumétrico máximo de xilose. <sup>c</sup> Velocidade de produção volumétrica máxima de etanol. <sup>d</sup> Rendimento baseado em g de etanol produzido por g de xilose consumida. Os valores são a média de dois experimentos independentes. FONTE: Gonçalves *et al.*, 2014.

**Tabela 7.** Parâmetros fermentativos da linhagem *hxt*-nullDLG-K1 transformada com os genes *HXT* indicados, em meios contendo xilose e glicose.

Transportador <sup>a</sup>	Glicose Consumida (%)	$V_G$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Xilose Consumida (%)	$V_X$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	$V_E$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	$Y_{E/S}$ (g g <sup>-1</sup> ) <sup>e</sup>
<i>ScHXT1</i>	100	1,65 ± 0,03	57	0,53 ± 0,02	0,77 ± 0,04	0,35 ± 0,02
<i>ScHXT2</i>	59	0,58 ± 0,01	58	0,61 ± 0,02	0,24 ± 0,00	0,17 ± 0,01
<i>ScHXT5</i>	64	0,66 ± 0,01	11	0,10 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,33 ± 0,07
<i>ScHXT7</i>	95	0,87 ± 0,02	45	0,44 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,29 ± 0,01

NOTAS: <sup>a</sup>As fermentações foram realizadas em meio sintético com 4-5% de xilose e 4-5% glicose por 72 horas. <sup>b</sup> Velocidade de consumo volumétrico máximo de glicose. <sup>c</sup> Velocidade de consumo volumétrico máximo de xilose. <sup>d</sup> Velocidade de produção volumétrica máxima de etanol. <sup>e</sup> Rendimento baseado em g de etanol produzido por g de açúcar consumido. Os valores são a média de dois experimentos independentes. FONTE: Gonçalves *et al.*, 2014.

Os resultados mostram que as linhagens DLG-K1T1 e DLG-K1T5, expressando os genes *ScHXT1* (um transportador com baixa afinidade pela glicose) e *ScHXT5* (um transportador com afinidade moderada pela glicose), não consumiram xilose quando essa pentose era a única fonte de carbono (Tabela 6). Entretanto, a linhagem DLG-K1T1 teve o consumo máximo de açúcares e produção de etanol durante co-fermentações de xilose com glicose (Tabela 7). A linhagem DLG-K1T2 apresentou consumo de xilose (Tabela 6) semelhante ao consumo de glicose (dados não mostrados) em fermentações separadas e durante asco-fermentações glicose/xilose, mas de forma incompleta (Tabela 7). O consumo de xilose por essa linhagem contendo a permease *ScHxt2* (um transportador com afinidade moderada pela glicose) foi de menos de 60% do açúcar disponível, exibindo baixo rendimento em etanol (Tabela 6). Quando o transportador *ScHxt7* (com alta afinidade pela glicose) foi expresso na linhagem *hxt-null* (linhagem DLG-K1T7), houve eficiente fermentação de glicose (dados não mostrados) ou xilose (Tabela 6), mas durante a co-fermentação, a xilose só foi consumida após a glicose ter sido depletada do meio (Tabela 7 e dados não mostrados). Esses resultados indicam que nenhum dos transportadores *HXT* endógenos de *S. cerevisiae* analisados tem as propriedades ideais para todos os processos fermentativos industriais possíveis usando biomassa lignocelulósica (GONÇALVES *et al.*, 2014). Dessa forma, e considerando a existência de outras leveduras que consomem e fermentam xilose eficientemente, a linhagem *hxt-null* recombinante DLG-K1 foi utilizada para clonar transportadores de xilose de outros micro-organismos.

### **Clonagem de transportadores de xilose a partir de uma biblioteca genômica de *Scheffersomyces stipitis***

Bibliotecas genômicas são utilizadas para identificar novos genes oriundos de diferentes organismos (LUESCH *et al.*, 2005). Quando um micro-organismo é transformado com os plasmídeos gerados pela biblioteca genômica, seleciona-se micro-organismos recombinantes que, através de expressão heteróloga, adquiriram o fenótipo desejado. Com essa técnica, é possível realizar a prospecção de um micro-organismo com as características procuradas e em seguida, identificar os genes responsáveis.

O DNA genômico da levedura fermentadora de xilose *S. stipitis* foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI, e os fragmentos gerados foram clonados no vetor de expressão pPGK (KANG *et al.*, 1990). A

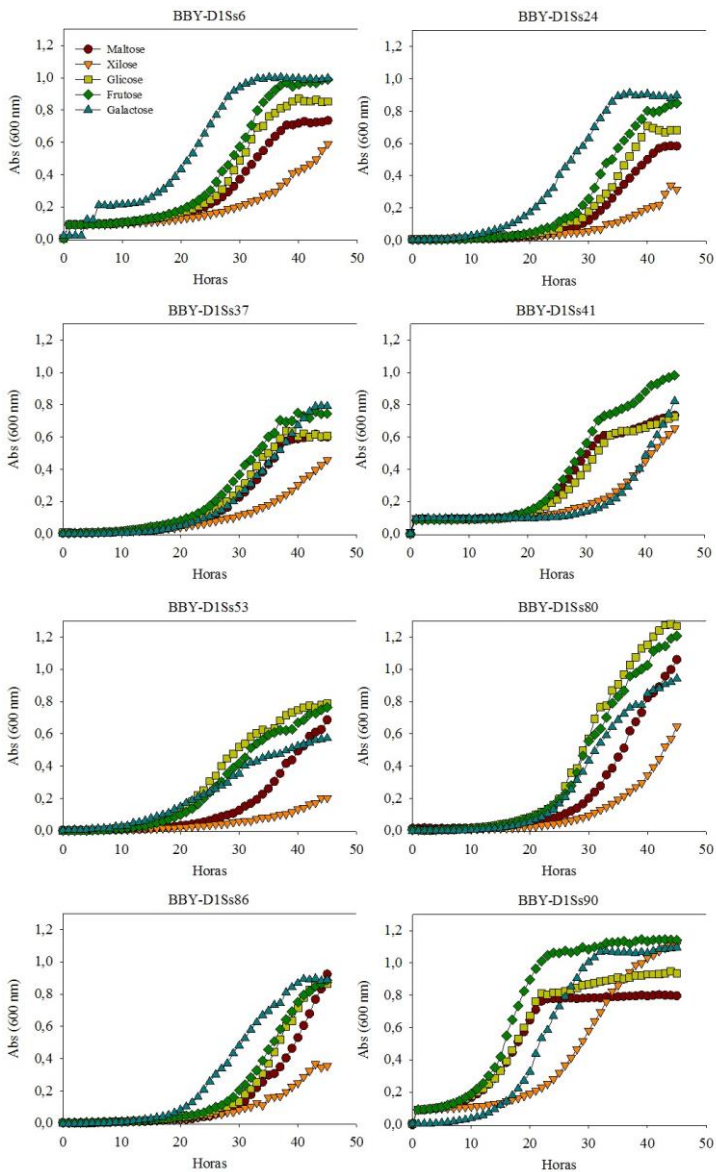
construção dessa biblioteca genômica foi encomendada pelo Dr. Akinori Matsushika, pesquisador do AIST (*Nacional Institute of Advanced Industrial Science and Technology*) à empresa TakaraBio no Japão. Esses plasmídeos foram transformados em linhagem *E. coli* DH5 $\alpha$ , extraídos novamente e utilizados para transformar a linhagem DLG-K1. A seleção dos transformantes foi realizado diretamente em placas de meio sintético *dropout* (sem uracila, para selecionar linhagens com o plasmídeo pPGK), contendo Aureobasidina A, e xilose como única fonte de carbono. Das dezenas de colônias obtidas inicialmente, apenas oito transformantes de *S. cerevisiae* obtidos foram capazes de crescer após repetidos repiques em meio mínimo com xilose como única fonte de carbono. Essas linhagens foram nomeadas BBY-D1Ss6, -D1Ss24, -D1Ss37, -D1Ss41, -D1Ss53, -D1Ss80, -D1Ss86 e -D1Ss90. O crescimento das linhagens em diferentes açúcares (maltose, xilose, glicose, frutose, e galactose) foi avaliado porque *S. stipitis* é capaz de crescer em diferentes fontes de carbono, incluindo xilose (JEFFRIES *et al.*, 2007). Os resultados demonstraram que nenhum dos transformantes tem crescimento exclusivo em xilose (Figura 7). Considerando que a linhagem parental DLG-K1 conseguia crescer apenas em maltose, os diferentes perfis de crescimento indicam que os prováveis genes de transportadores clonados não são específicos para um único açúcar.

As linhagens BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24 e BBY-D1Ss86 cresceram em galactose mais rapidamente do que na presença dos outros açúcares. Por outro lado, nas condições utilizadas, todas as linhagens transformadas cresceram mais lentamente em xilose quando comparado com os outros açúcares, com exceção da linhagem BBY-D1Ss41 que cresceu com a mesma velocidade tanto em xilose quanto em galactose (Figura 6). Nas linhagens BBY-D1Ss37 e BBY-D1Ss80 o crescimento em todos os açúcares (exceto xilose) foi semelhante ao observado na presença de maltose, enquanto que no caso da linhagem BBY-D1Ss53 o crescimento neste açúcar foi mais lento do que na presença de glicose, frutose ou galactose. Nas condições testadas a linhagem BBY-D1Ss90 foi o transformante que melhor cresceu em xilose, quando comparado com as outras linhagens analisadas (Figura 6).

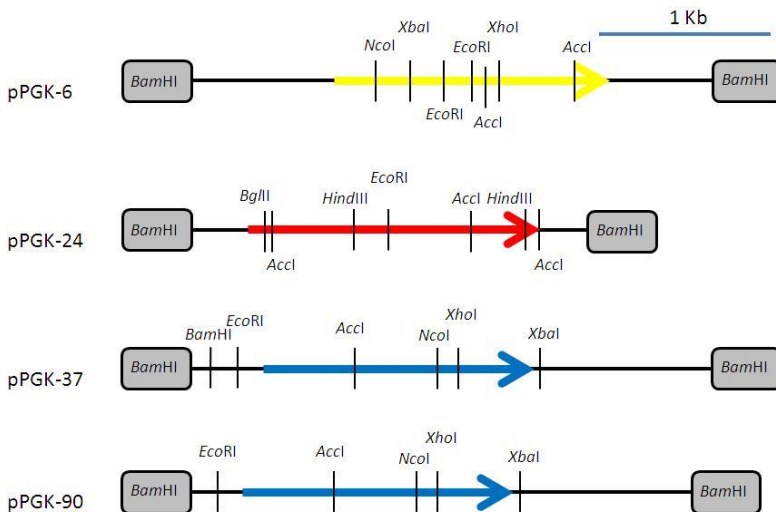
Para garantir que os fenótipos observados pelas linhagens transformantes são determinados pelos genes presentes nos plasmídeos, os vetores foram extraídos das linhagens de levedura, inseridos na linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$ , e extraídos novamente para re-transformar a linhagem DLG-K1. Das oito linhagens descritas acima, apenas de quatro delas (linhagens BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37 e BBY-D1Ss90) foi possível obter plasmídeos para re-transformar a linhagem

DLG-K1, obtendo-se linhagens recombinantes com o mesmo perfil de crescimento mostrado na Figura 6.

Os plasmídeos obtidos dessas linhagens foram hidrolisados com *Bam*HI para a confirmação da presença de um inserto no plasmídeo. Os insertos também foram amplificados por PCR com os oligonucleotídeos pPGK\_seq\_F e pPGK\_seq\_R (vide Tabela 3) e os fragmentos obtidos, após purificação em gel, foram sequenciados com os mesmos iniciadores. Os insertos amplificados foram também hidrolisados com diferentes enzimas de restrição para elaborar um mapa de restrição de cada DNA clonado no vetor pPGK. Essas abordagens - tamanho e mapa de restrição do inserto e as sequências parciais obtidas a jusante e a montante dos genes – permitiram identificar os genes de *S. stipitis* clonados (Figura 7), ao comparar os mesmos com a sequência genômica desta levedura disponível no banco de dados NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).



**Figura 6: Crescimento das linhagens recombinantes *S. cerevisiae* DLG-K1 transformadas com a biblioteca genômica de *S. stipitis*.** O crescimento das linhagens transformantes indicadas foram realizadas em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% maltose, xilose, glicose, frutose ou galactose como fontes de carbono.

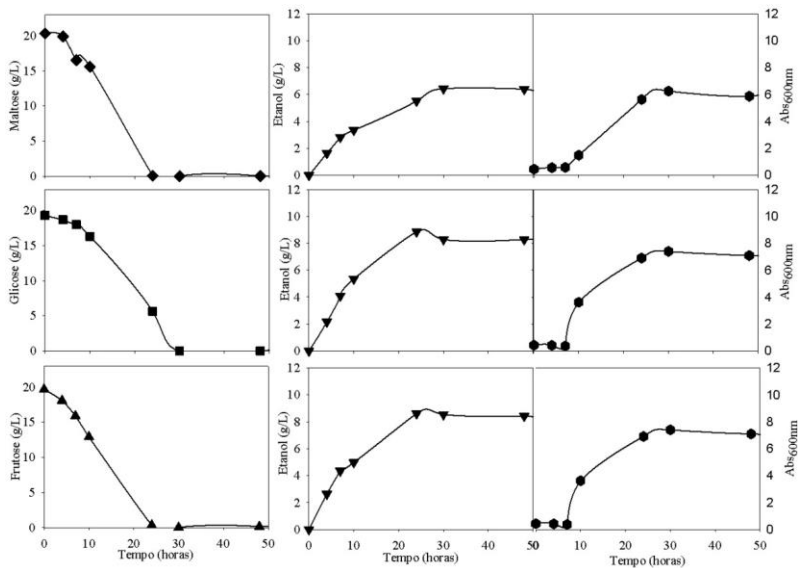


**Figura 7: Mapa de restrição dos insertos presentes nos plasmídeos obtidos a partir da biblioteca genômica de *S. stipitis* utilizados para transformar a linhagem recombinante *S. cerevisiae* DLG-K1.** São mostradas as enzimas de restrição que possuem sítio de restrição nos fragmentos presentes nos plasmídeos indicados. As setas representam as ORFs presentes em cada plasmídeo e as sequências clonadas a jusante e montante delas. Em amarelo, é representado o gene *SsHXT2.6*, em vermelho, o gene *SsXUT1*, e em azul, o gene *SsQUP2*.

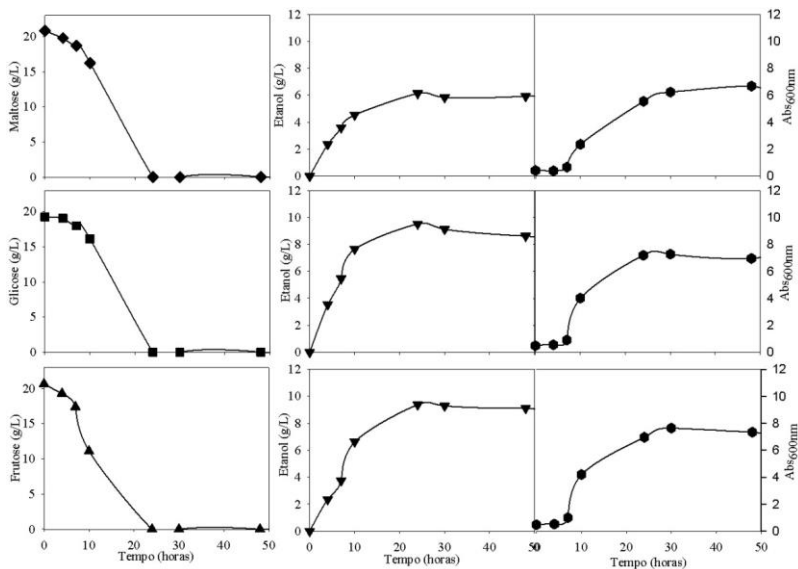
Três genes diferentes estavam presentes nos quatro plasmídeos: o plasmídeo denominado pPGK-6, extraído da linhagem BBY-D1Ss6, contém a sequência do gene *SsHXT2.6* com inserto de 3 kb; o plasmídeo pPGK-24 (linhagem BBY-D1Ss24), com o inserto de 2 kb, contém a sequência do gene *SsXUT1*; e os plasmídeos pPGK-37 e pPGK-90, que foram extraídos das linhagens BBY-D1Ss37 e BBY-D1Ss90, respectivamente, contém o gene *SsQUP2* (Figura 7). Os plasmídeos pPGK-37 e pPGK-90 (ambos com insertos de cerca de 3 kb) são diferentes em apenas 130 pares de bases na região 5' anterior à da ORF do gene *SsQUP2*, diferença devido à presença de dois sítios de restrição da enzima *Bam*HI que existem na sequência e usados para a preparação da biblioteca genômica de *S. stipitis*. As novas linhagens da levedura DLG-K1 transformadas com os plasmídeos cujas ORFs foram identificadas (Figura 7) foram denominadas BBY-SsHXT2.6 (transformado com pPGK-6); BBY-SsXUT1 (pPGK-24); BBY-SsQUP2(37) (pPGK-37) e BBY-SsQUP2(90) (pPGK-90).



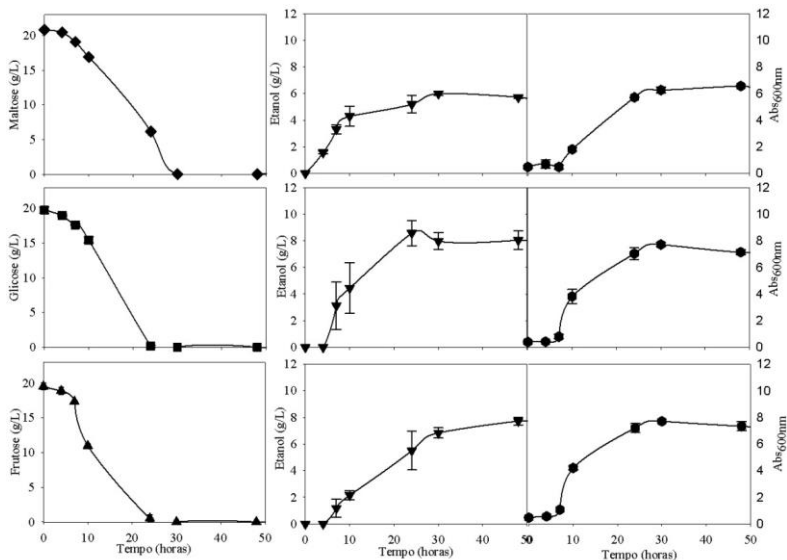
As Figuras 8 a 10 mostram o crescimento aeróbio em 2% maltose, glicose ou frutose pelas linhagens recombinantes obtidas após a re-transformação com os plasmídeos já caracterizados. Na Tabela 8 são apresentados os parâmetros fermentativos das linhagens nesses cultivos. Considerando que as linhagens BBY-SsQUP2(37) e BBY-SsQUP2(90) apresentam o mesmo gene no vetor pPGK, os dados apresentados para essas linhagens (Figura 10) são uma média de dois experimentos independentes (um obtido com cada transformante independentemente). Como pode ser observado nas Figuras 8 a 10, o consumo da maltose, glicose ou frutose ocorreu nas primeiras 30 horas de cultivo, quando ocorreu a produção máxima de etanol. Cabe salientar que a produção de etanol a partir da maltose foi ligeiramente inferior (~6 g/L) à obtida durante o crescimento em glicose (8,5-9,5 g/L) ou frutose (8-9,5 g/L), independentemente do transformante analisado. Resultados semelhantes aos apresentados nas Figuras 8 a 10 foram obtidos ao analisar o cultivo em 2% maltose, glicose ou frutose pelas linhagens originais (linhagens BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37 e BBY-D1Ss90) obtidas diretamente do *screening* da biblioteca genômica de *S. stipitis* (dados não mostrados).



**Figura 8:** Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm da linhagem recombinante *S. cerevisiae* BBY-SsHXT2.6, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% maltose, glicose ou frutose como fontes de carbono. São mostrados os consumos de maltose (diamantes), glicose (quadrado) ou frutose (triângulo para cima), produção de etanol (triângulo para baixo) e crescimento celular (absorbância do meio a 600 nm, círculos).



**Figura 9:** Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm da linhagem recombinante *S. cerevisiae* BBY-SsXUT1, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% maltose, glicose ou frutose como fontes de carbono. São mostrados os consumos de maltose (diamantes), glicose (quadrado) ou frutose (triângulo para cima), produção de etanol (triângulo para baixo) e crescimento celular (absorbância do meio a 600 nm, círculos).



**Figura 10: Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes *S. cerevisiae* BBY-SsQUP2, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% maltose, glicose ou frutose como fontes de carbono. São mostrados os consumos de maltose (diamantes), glicose (quadrado) ou frutose (triângulo para cima), produção de etanol (triângulo para baixo) e crescimento celular (absorbância do meio a 600 nm, círculos). Os dados são uma média e desvio padrão de dois crescimentos independentes obtidos com as linhagens transformadas independentemente com os plasmídeos pPGK-37 e pPGK-90.**

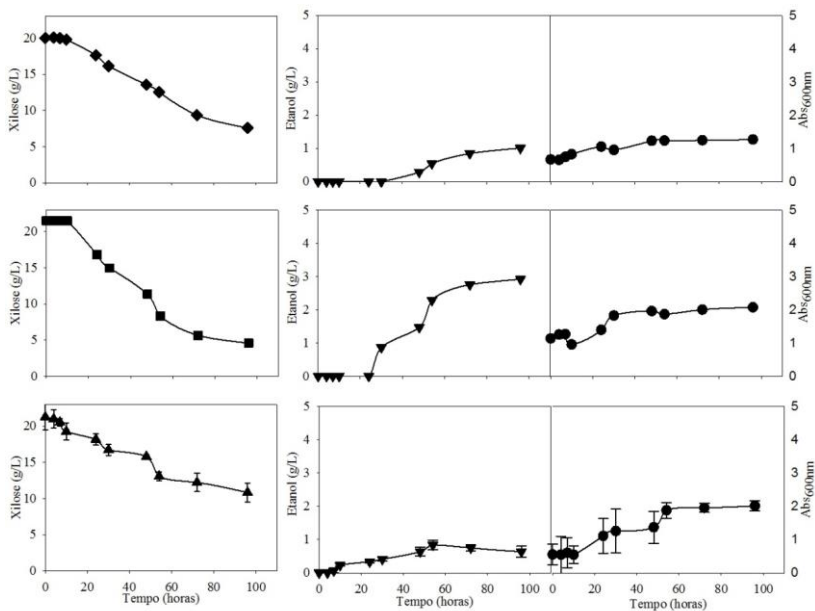
**Tabela 8.** Parâmetros fermentativos durante o crescimento em diferentes açúcares pelas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2.

Açúcar/Linhagem <sup>a</sup>	Consumo de açúcar (%)	$V_s$ (g/L/h) <sup>b</sup>	$V_E$ (g/L/h) <sup>c</sup>	$Y_{E/S}$ (g/g) <sup>d</sup>
<b>Maltose<sup>e</sup></b>				
BBY-SsHXT2.6	100	0,99 ± 0,03	0,38 ± 0,13	0,30 ± 0,02
BBY-SsXUT1	100	0,93 ± 0,07	0,48 ± 0,17	0,30 ± 0,01
BBY-SsQUP2	100	0,70 ± 0,20	0,40 ± 0,07	0,31 ± 0,03
<b>Glicose<sup>e</sup></b>				
BBY-SsHXT2.6	100	0,78 ± 0,06	0,61 ± 0,10	0,44 ± 0,10
BBY-SsXUT1	100	0,94 ± 0,10	0,80 ± 0,16	0,49 ± 0,01
BBY-SsQUP2	100	0,88 ± 0,10	0,40 ± 0,04	0,42 ± 0,02
<b>Frutose<sup>e</sup></b>				
BBY-SsHXT2.6	100	0,80 ± 0,09	0,33 ± 0,05	0,46 ± 0,02
BBY-SsXUT1	100	0,86 ± 0,10	0,69 ± 0,06	0,46 ± 0,01
BBY-SsQUP2	100	0,92 ± 0,06	0,34 ± 0,03	0,39 ± 0,0
<b>Xilose<sup>f</sup></b>				
BBY-SsHXT2.6	53 ± 0,1	0,14 ± 0,05	0,02 ± 0,02	0,10 ± 0,01
BBY-SsXUT1	64 ± 0,6	0,20 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,19 ± 0,03
BBY-SsQUP2	48 ± 0,22	0,14 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,14 ± 0,04

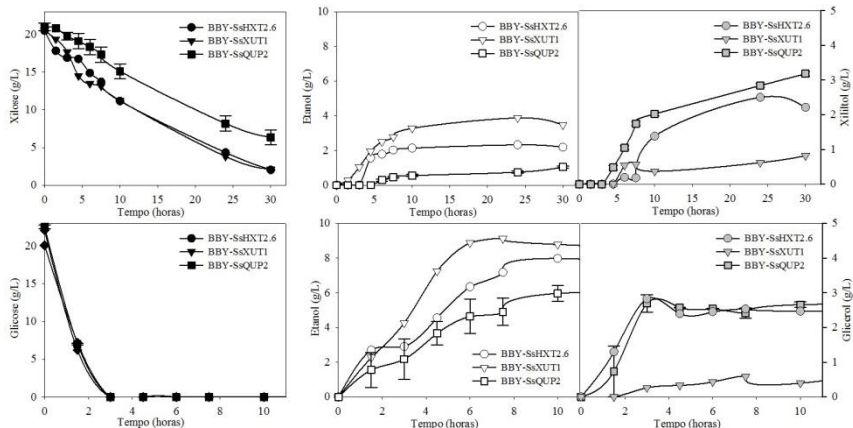
NOTAS: <sup>a</sup> Dados obtidos a partir das Figuras 8 a 11. <sup>b</sup> Consumo volumétrico máximo de açúcar. <sup>c</sup> Produção volumétrica máxima de etanol. <sup>d</sup> Rendimento baseado na quantidade (gramas) de etanol produzido pela quantidade (gramas) de açúcar consumido. <sup>e</sup> Consumo de açúcar em 30 horas de crescimento. <sup>f</sup> Consumo de açúcar em 100 horas de crescimento.

A Figura 11 mostra os perfis de crescimento em xilose pelas linhagens *S. cerevisiae* DLG-K1 contendo os diferentes transportadores clonados a partir do genoma de *S. stipitis*. Como pode ser observado nessa figura, o consumo dessa pentose pelas linhagens BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2 é significativamente mais lenta durante o crescimento nessa fonte de carbono, sendo que o açúcar não foi totalmente consumido mesmo após 96 horas de incubação, quando as células já tinham parado de crescer (Tabela 8). Dos três transportadores, o que permitiu o melhor consumo de xilose, e conseqüentemente a maior produção de etanol (~3 g/L), foi o presente na linhagem BBY-SsXUT1. Nas outras duas linhagens a produção de etanol não passou de 1 g/L (Figura 11). As linhagens originais BBY-D1Ss6, BBY-D1Ss24, BBY-D1Ss37 e BBY-D1Ss90 apresentaram o mesmo perfil de crescimento em xilose apresentado na Figura 11 (dados não mostrados).

Considerando esses resultados, foram realizados ensaios fermentativos com xilose ou glicose (Figura 12, Tabela 9) e co-fermentação com xilose e glicose (Figura 13, Tabela 10) com essas quatro linhagens. As fermentações foram realizadas com alta concentração celular, que diminui a disponibilidade de oxigênio para as células, o que torna um meio com restrição de oxigênio, limitando o crescimento celular, além que o tempo de conversão do açúcar é menor (AMORIM *et al.*, 2011).



**Figura 11: Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes *S. cerevisiae* BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% xilose como fonte de carbono.** São mostrados os consumo de xilose pelas linhagens BBY- SsHXT2.6 (losangos), BBY-SsXUT1 (quadrados), e BBY-SsQUP2 (triângulos para cima), produção de etanol pelas linhagens (triângulos para baixo) e crescimento celular (valores de absorbância 600 nm, círculos). Os dados da linhagem BBY-SsQUP2 são uma média e desvio padrão de dois crescimentos obtidos com as linhagens transformadas com os plasmídeos pPGK-37 e pPGK-90.



**Figura 12:** Fermentações das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1, BBY-SsQUP2 em meio sintético dropout (sem uracila) com glicose ou xilose como fontes de carbono. São mostrados os consumos de açúcares, produções de etanol, glicerol e xilitol pelas linhagens BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1, BBY-SsQUP2. Os dados de BBY-SsQUP2 são uma média de dois crescimentos, com o desvio padrão entre os crescimentos.

Quando apenas glicose estava presente (Figura 12), as três linhagens consumiram essa fonte de carbono em três horas. A produção máxima de etanol foi em quatro horas, sendo que as linhagens BBY-SsXUT1 e BBY-SsHXT2.6 tiveram as maiores produções de etanol (8-9 g/L). A linhagem BBY-SsXUT1 foi a que menos produziu glicerol (menos de 1 g/L), enquanto as outras linhagens produziram cerca de 2,5 g/L de glicerol. Quanto ao consumo total de xilose, as linhagens BBY-SsXUT1 e BBY-SsHXT2.6 consumiram até 90% da xilose presente ao final da fermentação, mas a linhagem BBY-SsQUP2 consumiu apenas 70% da xilose, ou seja, 20% a menos que as outras linhagens (Tabela 9). A produção de etanol foi maior nas linhagens BBY-SsXUT1 e BBY-SsHXT2.6 (3,8 e 2,2 g/L, respectivamente), enquanto que o consumo de xilose pela linhagem BBY-SsQUP2 resultou na produção de xilitol (2,2 g/L) ao invés de produção de etanol.

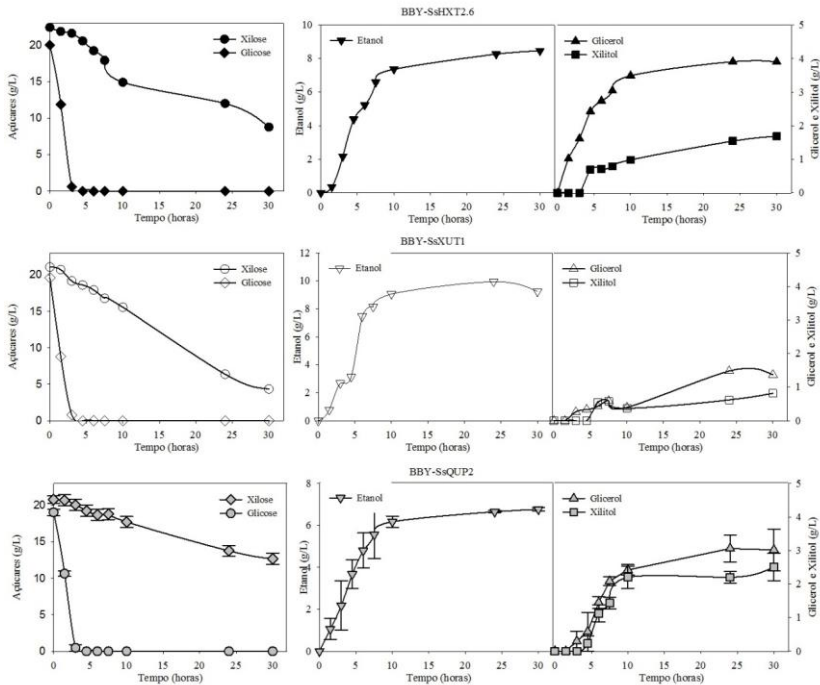


**Tabela 9.** Consumo de açúcares e produção de etanol em fermentações com glicose ou xilose pelas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2.

Açúcar/ Linhagem <sup>a</sup>	Consumo de açúcar (%)	$V_S$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$V_E$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	$Y_{E/S}$ (g g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
<b>Glicose</b>				
BBY-SsHXT2.6	100	6,70 ± 0,01	1,76 ± 0,01	0,40 ± 0,01
BBY-SsXUT1	100	7,36 ± 0,01	1,62 ± 0,02	0,41 ± 0,01
BBY-SsQUP2	100	7,51 ± 0,07	1,48 ± 0,05	0,27 ± 0,03
<b>Xilose</b>				
BBY-SsHXT2.6	90	0,94 ± 0,01	0,60 ± 0,02	0,14 ± 0,01
BBY-SsXUT1	90	1,17 ± 0,02	0,55 ± 0,03	0,23 ± 0,02
BBY-SsQUP2	70	0,55 ± 0,04	0,15 ± 0,05	0,07 ± 0,02

NOTAS: <sup>a</sup> As fermentações foram realizadas em meio sintético completo, contendo os açúcares indicados durante 30 horas (Figura 12). <sup>b</sup> Consumo volumétrico máximo de açúcar <sup>c</sup> Produção volumétrica máxima de etanol <sup>d</sup> Rendimento baseado na quantidade (gramas) de etanol produzido pela quantidade (gramas) de açúcar consumido

Nas co-fermentações com glicose e xilose (Figura 13), a glicose foi totalmente consumida em três horas pelas três linhagens. Entretanto, para as três linhagens, o consumo de xilose foi menor quando glicose estava presente do que quando xilose era a única fonte de carbono (Tabelas 9 e 10). A limitação de consumo de xilose por glicose foi menor na linhagem BBY-SsXUT1, que consumiu ao final da co-fermentação 80% da xilose do meio (Tabela 10) e a produção de etanol por essa linhagem (10 g/L) indica que, pelo menos parcialmente, a xilose foi convertida a etanol. As linhagens BBY-SsHXT2.6 e BBY-SsQUP2 produziram mais glicerol (4 e 3 g/L) e xilitol (2 e 3 g/L) que a linhagem BBY-SsXUT1 (cerca de 1 g/L para cada co-produto). Dessa forma, ao analisar os dados apresentados, é possível observar que as linhagens tiveram preferência por glicose ou frutose e não à xilose. Quando as hexoses estavam presentes, as células foram capazes de produzir mais etanol e xilose só era consumida quando a glicose já estava sendo depletada do meio.



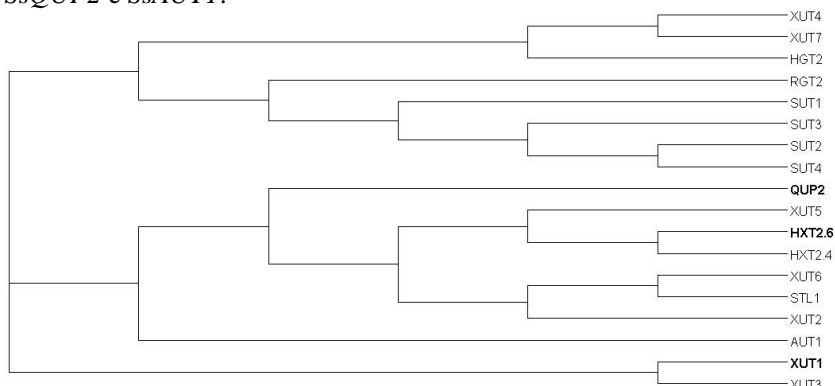
**Figura 13: Co-fermentações das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1, BBY-SsQUP2 em meio sintético dropout (sem uracila) com glicose e xilose como fontes de carbono. São mostrados os consumos de xilose e glicose e produções de etanol, glicerol e xilitol pelas linhagens BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2. Os dados de BBY-SsQUP2 são uma média de dois crescimentos, com o desvio padrão entre os crescimentos.**

**Tabela 10.** Consumo de açúcares e produção de etanol em co-fermentações com glicose e xilose pelas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2.

Linhagem <sup>a</sup>	Glicose		Xilose		$V_E$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	$Y_{E/S}$ (g g <sup>-1</sup> ) <sup>e</sup>
	Consumida (%)	$V_G$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Consumida (%)	$V_X$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>		
BBY-SsHXT2.6	100	6,46 ± 0,03	61	0,59 ± 0,01	1,80 ± 0,02	0,43 ± 0,02
BBY-SsXUT1	100	6,26 ± 0,01	80	0,62 ± 0,02	1,53 ± 0,00	0,51 ± 0,01
BBY-SsQUP2	100	06,19 ± 0,02	39	0,34 ± 0,03	1,25 ± 0,04	0,33 ± 0,03

NOTAS<sup>a</sup> As co-fermentações foram realizadas em meio sintético completo, contendo os açúcares indicados durante 30 horas (Figura 13) <sup>b</sup> Consumo volumétrico máximo de açúcar. <sup>c</sup> Produção volumétrica máxima de etanol. <sup>d</sup> Rendimento baseado na quantidade (gramas) de etanol produzido pela quantidade (gramas) de açúcar consumido

As seqüências de aminoácidos desses três transportadores clonados a partir da biblioteca genômica de *S. stipitis* foram analisadas utilizando-se ferramentas de bioinformática. Uma das análises foi a construção de um filograma (Figura 14) dos transportadores das linhagens BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2 com outros 15 transportadores de açúcares já caracterizados em *S. stipitis*. Os genes *SsSUT1-SsSUT4* estão agrupados, sendo que os genes *SsSUT2* e *SsSUT4* são mais próximos entre si que *SsSUT1* e *SsSUT3*. O gene *SsRGT2* dentre os outros genes, é mais próximo dos genes *SsSUTs*, tendo divergido anteriormente. *SsXUT4* e *SsXUT7* são muito próximos, e o gene *SsHGT2* compartilha um ancestral comum com esses dois genes. Os genes *SsXUT1* e *SsXUT3* também são muito próximos, mas não compartilham nenhum representante comum com os outros transportadores (nem mesmo com os outros membros da família *SsXUT*). O gene *SsXUT6* é mais próximo de *SsSTL1* do que de *SsXUT2*, apesar de compartilharem um ancestral comum. *SsXUT5* não está agrupado com outros representantes da família *SsXUT*, mas com *SsHXT2.6* e *SsHXT2.4*; porém os genes *SsXUT5/SsHXT2.6/SsHXT2.4* e *SsXUT6/SsSTL1/SsXUT2* apresentam ancestrais comuns: os genes *SsQUP2* e *SsAUT1*.



**Figura 14: Filograma com os transportadores de *S. stipitis* depositados no banco de dados NCBI.** As seqüências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW Omega (EMBL-EBI – European Bioinformatics Institute); em seguida, a árvore filogenética foi construída utilizando o programa Dendroscope 2.3 (HUSON *et al.*, 2007).

Além do filograma, foi realizado alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos dos transportadores *SsHxt2.6*, *SsXut1*, *SsQup2* e do transportador de difusão facilitada da levedura *Candida*

*intermedia*, CiGxf1 (Figura 15). Esse transportador foi selecionado como modelo de comparação por ser uma permease reconhecidamente capaz de transportar glicose e xilose (LEANDRO; GONÇALVES; SPENCER-MARTINS, 2006; RUNQUIST *et al.*, 2009). O programa utilizado para o alinhamento múltiplo foi o mesmo utilizado para filograma, o ClustalW Omega. Os transportadores de *S. stipitis* (Hxt2.6, Xut1 e Qup2) tem similaridade de 41,7%, 47,3% e 44,2% com Gxf1, respectivamente. Na Figura 15, são destacados alguns motivos geralmente presentes em transportadores de açúcares, como o motivo PESPR, localizado logo após o segmento transmembrana 6, e os resíduos de glutamina (Q) que se localizam no TM7 (WEIERSTALL; HOLLEBERG; BOLES, 1999). Os resíduos de glutamina estão localizados na posição 314 (CiGxf1), 327 (SsXut1), 311 (SsHxt2.6) e 277 (SsQup2). Além desses dois motivos, CiGxf1 também possui um motivo conservado em transportadores de xilose, localizado no TM1 que tem a seguinte sequência degenerada: G-G/F-XXX-G (YOUNG *et al.*, 2014). Esse motivo é composto de seis resíduos de aminoácidos, sendo que nos resíduos representados por X podem estar presentes qualquer aminoácido. Além de CiGxf1, o transportador SsXut1 também apresenta esse motivo, mas SsHxt2.6 não. Quanto ao transportador SsQup2, este possui uma variação do motivo, em que ao invés da primeira glicina, está presente uma alanina (Figura 15), outro aminoácido não-polar.

Existem dois outros aminoácidos muito importantes para a afinidade do transportador ao seu substrato (FARWICK *et al.*, 2014; NIJLAND *et al.*, 2014) e consequente translocação do açúcar para dentro das células: treonina (T, localizado no segmento transmembrana 5) e asparagina (N, segmento transmembrana 8). No transportador CiGxf1, treonina está localizada na posição 192 e asparagina na posição 349. No transportador SsXut1, estão localizados nas posições 181 e 351 (treonina e asparagina, respectivamente). No transportador SsHxt2.6, esses resíduos estão localizados nas posições 177 e 341 (respectivamente). Já no transportador SsQup2, nenhum desses dois resíduos conservados nos outros transportadores estão presentes.



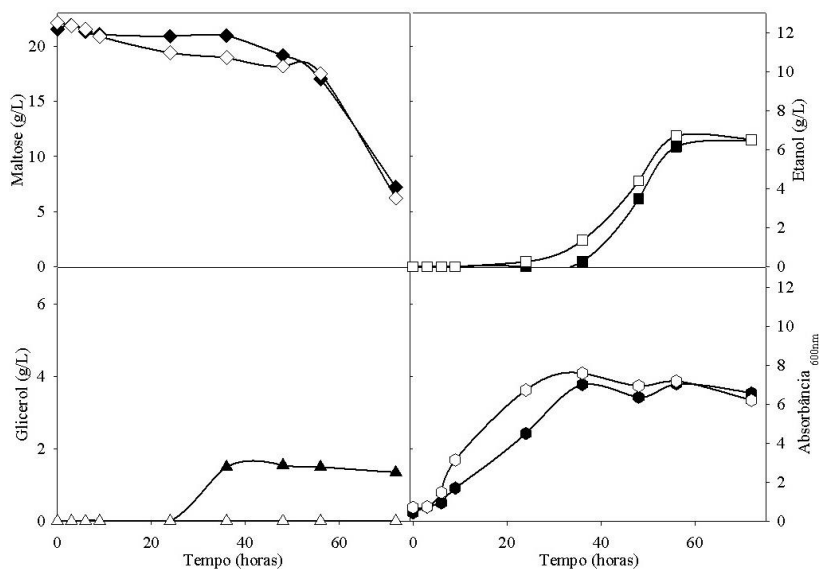
## Identificação e clonagem de transportadores de açúcares das leveduras *Spathaspora arborariae* e *Spathaspora passalidarum*

Nosso grupo de pesquisa, em colaboração com a Embrapa Informática Agropecuária (Campinas, SP), e o Laboratório Nacional de Computação Científica (Petrópolis, RJ) realizou o sequenciamento do genoma da levedura *Spathaspora arborariae*. O genoma completo está anotado sob o número de acesso AYLH00000000 (LOBO *et al.*, 2014). Utilizando BLAST (CAMACHO *et al.*, 2009), o genoma desse micro-organismo foi analisado para identificar sequências similares a sequências de transportadores de açúcares conhecidos. Dez sequências foram identificadas como possíveis transportadores de açúcares, pois são homólogas às de transportadores de açúcares de fungos filamentosos e leveduras. As sequências de aminoácidos foram examinadas em programas de bioinformática para realizar predição de suas estruturas secundárias e a existência de segmentos transmembrana: *TMpred* (HOFMANN; STOFFEL, 1993), *TMHMM Server* (MOLLER *et al.*, 2001) e *HMMTOP* (TUSDÁDY; SIMON, 2001). Todas as sequências tiveram o perfil desejado de 12 segmentos de  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas, que é considerado um pré-requisito para transportadores, especialmente transportadores de monossacarídeos (REDDY *et al.*, 2012).

Prompt, em 2012, analisou por PCR em tempo real a expressão dos genes *GET1* e *HXT4* da linhagem *S. arborariae* HMD19.1A crescendo em xilose e glicose. Nesse trabalho verificou-se que as expressões relativas desses genes eram maiores quando as células foram cultivadas em xilose, do que suas expressões relativas quando as células foram cultivadas em glicose. Além disso, SaGet1 tem 50% de similaridade com os transportadores de xilose SsXut1 (GeneID 4839826) e SsXut3 (GeneID 4851844) da levedura fermentadora de xilose *Scheffersomyces stipitis* (JEFFRIES *et al.*, 2007), e com o transportador putativo de xilose DhXylhP (GeneID 2900246) de *Debaryomyce shansanii* (DUJON *et al.*, 2004), enquanto que SaHxt4 apresenta 63% de similaridade a um transportador ativo de frutose de *Candida dubliniensis* (GAMBLE, 2009).

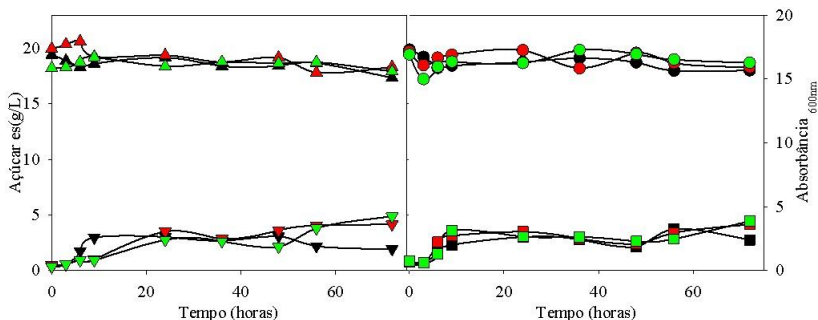
Os genes foram clonados em vetor de expressão pPGK. As corretas inserções dos genes nos vetores pPGK-SaGET1 e pPGK-SaHXT4 foram confirmadas utilizando os oligonucleotídeos Transp\_1F e tPGK-seq\_R (para *SaGET1*) e Transp\_4F e tPGK-seq\_R (para *SaHXT4*) para amplificação dos genes por PCR, e também pela análise de fragmentos dos genes obtidos pela hidrólise de enzimas de restrição que possuem sítio de clivagem previamente localizados nas sequências

de *SaGET1* e *SaHXT4*. As novas linhagens de *S. cerevisiae* transformadas com os plasmídeos pPGK-*SaGET1* e pPGK-*SAHXT4* foram chamadas de BBY-*SaGET1* e BBY-*SaHXT4*, respectivamente. Crescimentos aeróbios em meio sintético *dropout* (sem uracila) foram realizados para investigar a capacidade dos transportadores de captar açúcares como maltose, glicose, xilose e frutose (Figuras 16 e 17). As duas linhagens consumiram, como esperado, a maltose. A produção de etanol foi bastante similar entre as duas linhagens e apenas no crescimento de BBY-*SaGET1* foi possível detectar a produção de glicerol (Figura 16). Apesar dos genes *SaGET1* e *SaHXT4* terem suas expressões induzidas por xilose (PROMPT, 2012), as linhagens de *S. cerevisiae* BBY-*SaGET1* e BBY-*SaHXT4* não consumiram os açúcares xilose, glicose ou frutose (Figura 17).



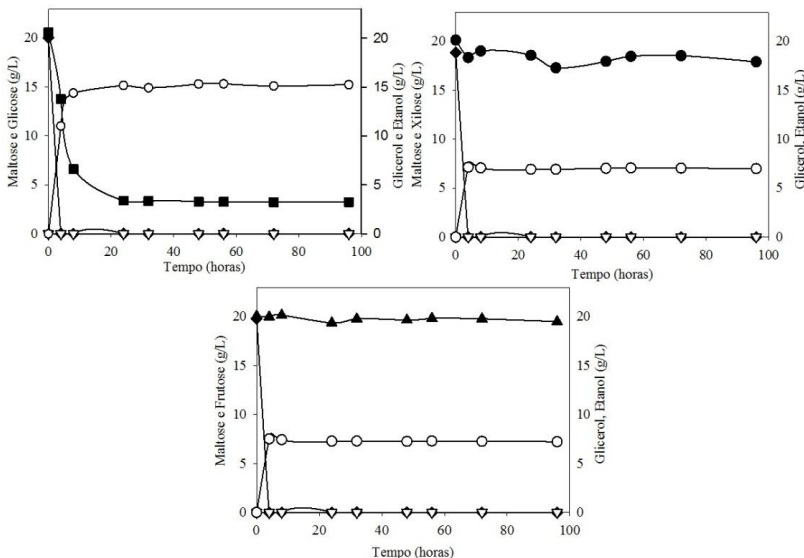
**Figura 16:** Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* BBY-*SaGET1* e BBY-*SaHXT4* em meio sintético *dropout* (sem uracila) com maltose como fonte de carbono. São mostrados os consumo de maltose por BBY-*SaGET1* (diamantes pretos) e BBY-*SaHXT4* (diamantes brancos), produção de etanol por BBY-*SaGET1* (quadrados pretos) e BBY-*SaHXT4* (quadrados brancos), produção de glicerol por BBY-*SaGET1* (triângulos pretos) e BBY-*SaHXT4* (triângulos brancos) e valores de absorbância 600 nm de BBY-*SaGET1* (hexágonos pretos) e BBY-*SaHXT4* (hexágonos brancos).





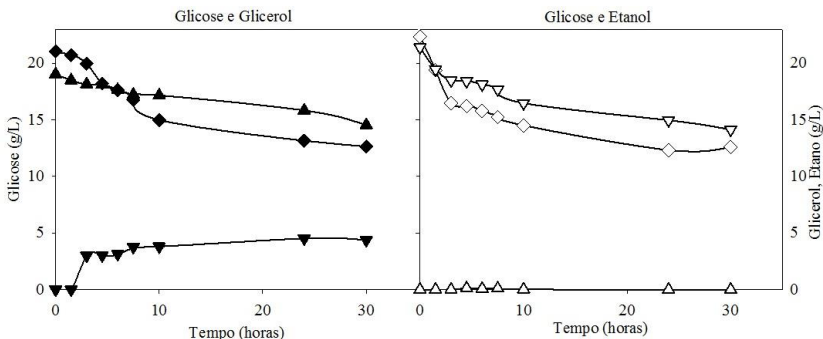
**Figura 17: Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* BBY-SaGET1 e BBY-SaHXT4 em meio sintético *dropout* (sem uracila) com xilose, glicose ou frutose como fontes de carbono.** Os consumos de açúcares (triângulos para cima pretos para consumo de xilose, triângulos para cima vermelhos para consumo de glicose e triângulos para cima verdes para consumo de glicose) e os valores de absorbância 600 nm (triângulos para baixo pretos para absorbância em xilose, triângulos para baixo vermelhos para absorbância 600 nm em glicose e triângulos para baixo verdes para absorbância em glicose) pela linhagem BBY-SaGET1 são mostrados no gráfico à esquerda. Os consumos de açúcares (círculos pretos para consumo de xilose, círculos vermelhos para consumo de glicose e círculos verdes para consumo de glicose) e os valores de absorbância 600 nm (quadrados pretos para absorbância em xilose, quadrados vermelhos para absorbância em glicose e quadrados verdes para absorbância em glicose) pela linhagem BBY-SaHXT4 são mostrados no gráfico à direita.

A seguir foram realizadas co-fermentações com as linhagens BBY-SaGET1 e BBY-SaHXT4 em meios contendo como fonte de carbono maltose e glicose; maltose e xilose, ou maltose e frutose. Nessas condições, BBY-SaGET1 consumiu glicose apenas quando maltose também estava presente (Figura 18), não tendo consumido xilose ou frutose, enquanto BBY-SaHXT4 não consumiu nenhum monossacarídeo mesmo na presença de maltose. Além disso, essas linhagens não captaram galactose ou manose quando co-fermentados com maltose (dados não mostrados).



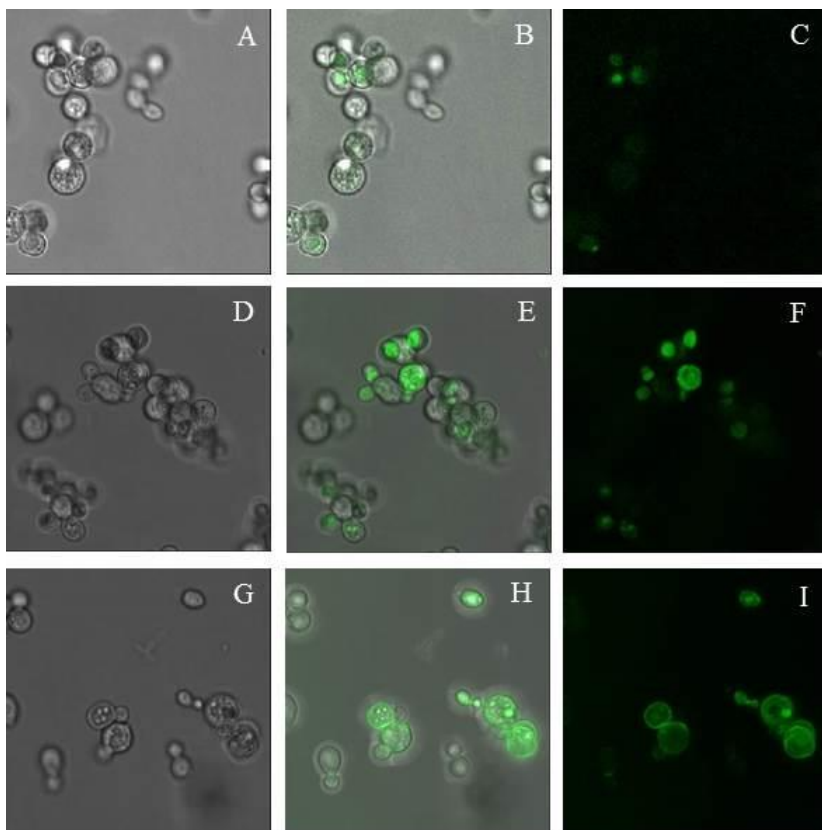
**Figura 18: Co-fermentações da linhagem recombinante *S. cerevisiae* BBY-SaGET1 em meio sintético *dropout* (sem uracila) com maltose e glicose; maltose e xilose e maltose e frutose como fontes de carbono. São mostrados os consumos de maltose (losangos pretos), glicose (quadrados pretos), xilose (círculos pretos) e frutose (triângulos para cima pretos), a produção de etanol (círculos brancos) e de glicerol (triângulo para baixo branco).**

É possível que o transportador SaGet1 de *S. arborariae* seja exclusivo para glicose e que seja também um transportador ativo, com co-transporte de dois prótons para cada molécula de glicose. Dessa forma, quando expresso unicamente na célula, devido ao seu alto requerimento de energia, não é possível observar captação do açúcar. Para haver transporte de glicose, seria necessário, portanto, outra fonte de carbono (captada, por exemplo, por um transportador Mal ou Agt1), que permitisse o crescimento e manutenção celular, possibilitando que o transportador SaGet1 realizasse a captação de açúcar sem necessidade de geração de energia. Para investigar essa hipótese, foram realizadas co-fermentações com glicose e outra fonte de carbono, como etanol e glicerol (Figura 19). Nessas condições, a linhagem foi capaz de consumir, além de etanol ou glicerol, também a glicose. A linhagem BBY-SaGET1 consumiu 24% de glicerol e 34% de etanol em cada fermentação, em 30 horas, além de 42% da glicose presente, no mesmo período de tempo. Na co-fermentação de glicerol e glicose, foi possível detectar a produção de etanol, atingindo 4,5 g/L em 30 horas.

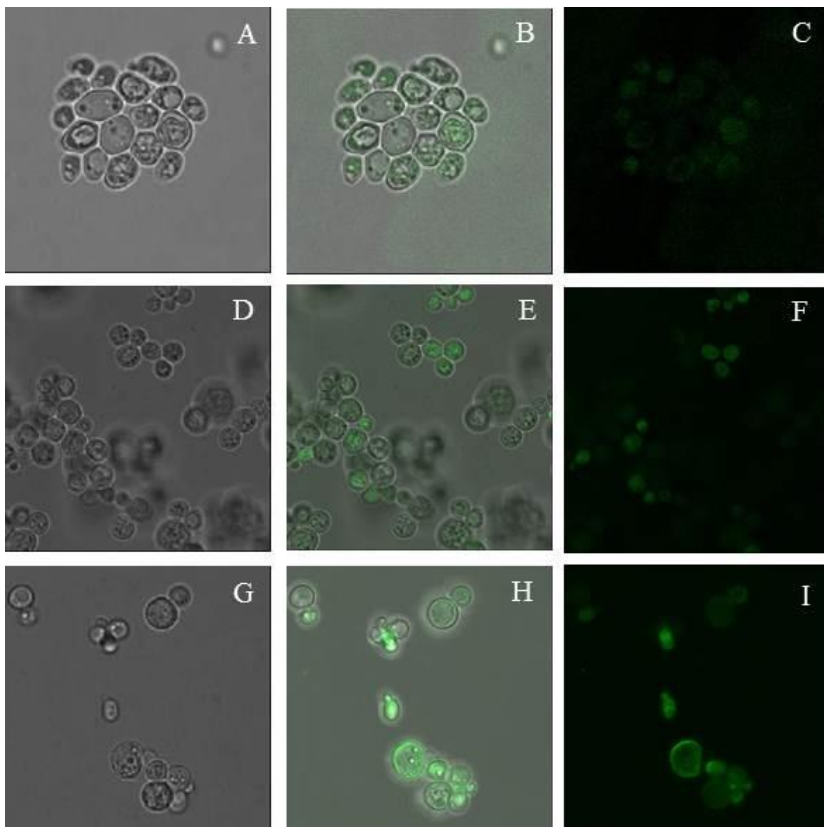


**Figura 19: Co-fermentações da linhagem recombinante *S. cerevisiae* BBY-SaGET1 em meio sintético *dropout* (sem uracila) com glicose mais glicose e etanol mais glicose como fontes de carbono.** São mostrados os consumos de glicose (losangos), consumos e produções de glicerol (triângulo para cima) e consumos e produções de etanol (triângulo para baixo).

A seguir, foi realizada a fusão do gene *GFP* à extremidade C-terminal dos genes dos transportadores de *S. arborariae* clonados no vetor pPGK para visualizar a localização dos transportadores nas células. Foram amplificados por PCR fragmentos de 2,4 kb, com o gene *GFP* e o gene *Kan<sup>r</sup>* flanqueados por regiões homólogas às regiões C-terminais dos genes *SaGET1* ou *SaHXT4* e ao terminador *PGK1* localizado após os genes nos plasmídeos pPGK-SaGET1 e pPGK-SaHXT4 (vide Material e Métodos). As inserções corretas, nesses plasmídeos, após transformação das leveduras com o módulo GFP-KanMX6, foram verificadas utilizando-se os oligonucleotídeos V-GET1-F ou V-HXT4-F e V-KAN-R. Analisando as células de levedura transformadas com os plasmídeos integrados ao GFP, através de microscopia de fluorescência (Figuras 20 e 21), é possível perceber que quando as células – tanto BBY-SaGET1 e BBY-SaHXT4 – foram crescidas em maltose e posteriormente transferidas para meio contendo glicose e maltose (tempo), nem todas as células estavam expressando os transportadores fusionados à GFP e os transportadores expressos estavam localizados no interior nas células, não na membrana celular. No tempo 10 horas, as células BBY-SaGET1 apresentam os transportadores na membrana (painel E, Figura 20) e essa localização é mantida até o tempo 24 horas em algumas células (painel H, Figura 20). Em relação à BBY-SaHXT4, os transportadores continuam no interior das células durante toda a fermentação, com exceção de uma célula no tempo 24 horas, mostrada no painel I, na Figura 21.



**Figura 20: Localização celular do transportador SaGet1 fusionado com GFP em células *S. cerevisiae* BBY-SaGET1.** Fotomicrografias das células *S. cerevisiae* BBY-SaGET1, crescidas em meio sintético *dropout* sem uracila com maltose e a partir do tempo zero, transferidas para meio sintético *dropout* sem uracila com glicose e maltose. Os painéis A, B e C são fotomicrografias no tempo 0; D, E e F, tempo 10 horas e G, H e I, tempo 24 horas. Os painéis A, D e G são micrografias em contraste de fase; B, E e H são micrografias com contraste de fase e fluorescência e C, F e I são micrografias de fluorescência.

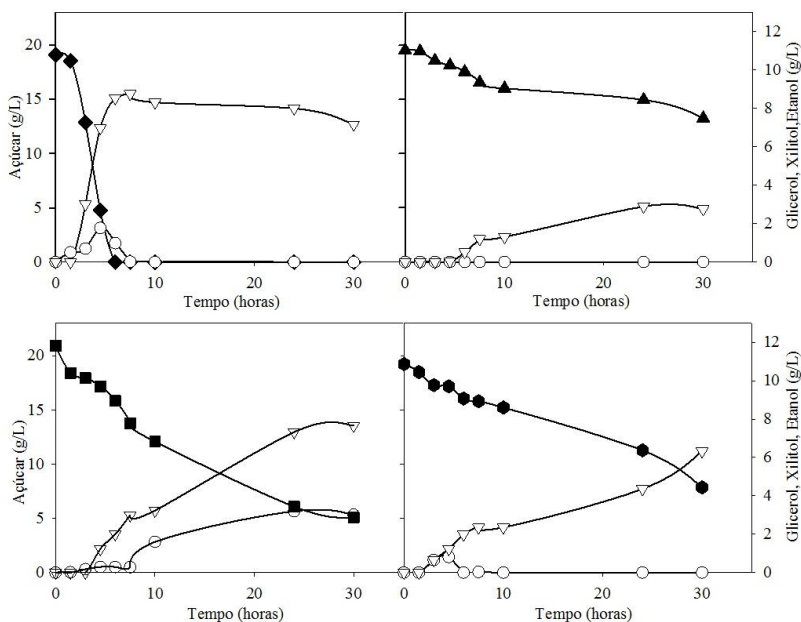


**Figura 21: Localização celular do transportador SaHxt4 fusionado com GFP em células *S. cerevisiae* BBY-SaHXT4.** Fotomicrografias das células *S. cerevisiae* BBY-SaHXT4, crescidas em meio sintético *dropout* sem uracila com maltose e a partir do tempo zero, transferidas para meio sintético *dropout* sem uracila com glicose e maltose. Os painéis A, B e C são fotomicrografias no tempo 0; D, E e F, tempo 10 horas e G, H e I, tempo 24 horas. Os painéis A, D e G são micrografias em contraste de fase; B, E e H são micrografias com contraste de fase e fluorescência e C, F e I são micrografias de fluorescência.

Além do genoma das leveduras *S. stipitis* e *S. arborariae*, o genoma de *S. passalidarum* também está completamente sequenciado. O gene *SUT1* de *S. passalidarum* (GeneID 18873510) foi selecionado para amplificação e clonagem por sua homologia –acima de 60% - com transportadores de xilose conhecidos como *SsSUT1* (GeneID 4851252) e *SUT3* (GeneID 4839762) de *S. stipitis* (WEIERSTALL; HOLLEBERG; BOLES, 1999; JEFFRIES *et al.*, 2007) e *CiGXF1* (CAI77652.1) de *C.*

*intermedia* (LEANDRO; GONÇALVES; SPENCER-MARTINS, 2006). O plasmídeo contendo o gene clonado no vetor pPGK (vide Material e Métodos) foi denominado pPGK-SpSUT1. A inserção correta do gene no vetor pPGK-SpSUT1 foi confirmada amplificando-se o gene por PCR, utilizando os oligonucleotídeos pPGK\_SUT1\_F e tPGK-seq-R, e também pela análise de fragmentos do gene obtidos pela hidrólise com enzimas de restrição que possuem sítio de clivagem localizados na sequência de *SpSUT1*. Esse plasmídeo foi transformado em linhagem *E. coli* DH5 $\alpha$ , extraído novamente e utilizado para transformar a linhagem DLG-K1. A linhagem resultante foi nomeada BBY-SpSUT1.

Foram realizadas fermentações em batelada com a linhagem BBY-SpSUT1 com maltose, glicose, xilose ou frutose como fontes de carbono (Figura 22). A maltose foi consumida totalmente em quatro horas de fermentação, com produção de 7 g/L de etanol. Nas fermentações de glicose e frutose, restaram no meio 5 e 8 g/L dos açúcares, respectivamente. As produções de etanol a partir desses açúcares foram semelhantes (cerca de 7 g/L). Na fermentação com apenas xilose, *SpSUT1* foi capaz de captar essa pentose, mas de maneira mais lenta, e apenas 32% da xilose foi consumida (Tabela 11). Apesar disso, foi detectada a presença de 2 g/L de etanol e nenhuma produção de xilitol.



**Figura 22:** Fermentações da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* BBY-SpSUT1 em meio sintético *dropout* (sem uracila) com maltose, glicose, xilose ou frutose como fontes de carbono. São mostrados os consumos de maltose (losangos pretos), xilose (triângulos para cima pretos), glicose (quadrados pretos), frutose (hexágonos pretos) e produções de etanol (triângulos para baixo brancos) e glicerol (círculos brancos) foram determinados como descritos em Material e Métodos.

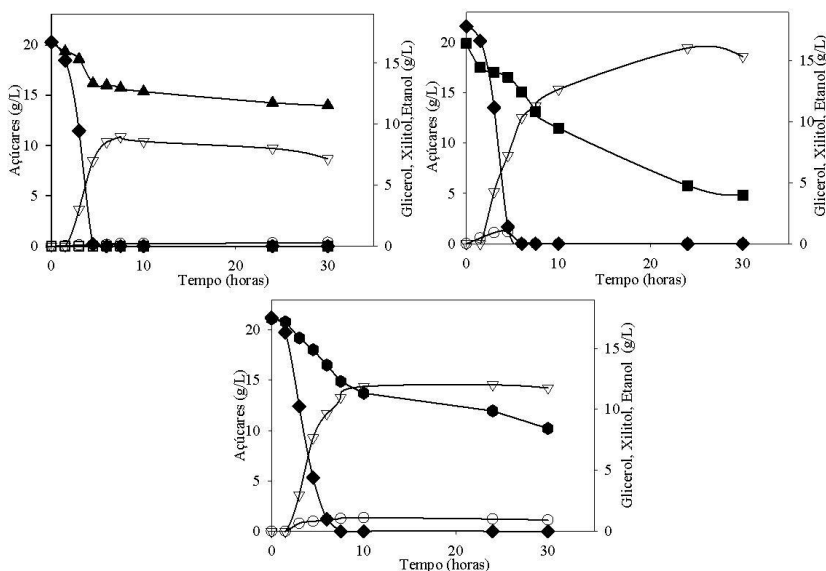
**Tabela 11.** Consumo de açúcares e produção de etanol em fermentações com maltose, glicose, frutose ou xilose pela linhagem recombinante de *S. cerevisiae* BBY-SpSUT1.

Açúcar <sup>a</sup>	Consumo de açúcar (%)	$V_s$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$V_E$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	$Y_{E/S}$ (g g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
<b>Maltose</b>	100	4,60	2,33	0,46
<b>Glicose</b>	76	1,26	0,67	0,48
<b>Frutose</b>	41	0,46	0,44	0,46
<b>Xilose</b>	32	0,34	0,39	0,28

NOTAS: <sup>a</sup> Os crescimentos foram realizados em meio sintético completo, contendo os açúcares indicados durante 30 horas (Figuras 22). <sup>b</sup> Consumo volumétrico máximo de açúcar. <sup>c</sup> Produção volumétrica máxima de etanol. <sup>d</sup> Rendimento baseado na quantidade (gramas) de etanol produzido pela quantidade (gramas) de açúcar consumido.

Foram também realizadas co-fermentações com maltose mais glicose; maltose mais xilose e maltose mais frutose (Figura 23). Nessas co-fermentações, a maltose foi consumida rapidamente, em cerca de quatro horas. Quando glicose e frutose estavam presentes, 76% e 52% dessas hexoses foram consumidas, respectivamente, ao final da co-fermentação, e houve produção de 15 e 12 g/L de etanol em cada co-fermentação (Tabela 11), além de não ser detectada a produção de glicerol. Já na co-fermentação com xilose, o consumo total dessa pentose foi de apenas 30% (Tabela 12), com produção de etanol de 7 g/L, originado principalmente do consumo da maltose.

Também foi realizado alinhamento múltiplo (utilizando ClustalW Omega) das sequências de aminoácidos dos transportadores de *S. arborariae* Get1 e Hxt4, além de Sut1 de *S. passalidarum*, novamente com o transportador de difusão facilitada (Gxf1) da levedura *Candida intermedia* (Figura 24).



**Figura 23: Co-fermentações da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* BBY-SpSUT1 em meio sintético *dropout* (sem uracila) com maltose e glicose; maltose e xilose e maltose e frutose como fontes de carbono. São mostrados os consumos de maltose (losangos pretos), xilose (triângulos para cima pretos), glicose (quadrados pretos), frutose (hexágonos pretos) e produções de etanol (triângulos para baixo brancos) e de glicerol (círculos brancos).**



**Tabela 12.** Consumo de açúcares e produção de etanol em co-fermentações com maltose mais glicose, maltose mais frutose e maltose mais xilose pela linhagem recombinante de *S. cerevisiae* BBY-SpSUT1.

Açúcar <sup>a</sup>	Consumo de açúcar (%)	$V_3$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$V_E$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	$Y_{E/S}$ (g g <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
<b>Maltose</b>	100	6,152		
<b>Glicose</b>	76	1,147	2,412	0,450
<b>Maltose</b>	100	4,797		
<b>Frutose</b>	52	1,051	2,551	0,400
<b>Maltose</b>	100	6,074		
<b>Xilose</b>	31	1,058	1,061	0,360

NOTAS:<sup>a</sup> Os crescimentos foram realizados em meio sintético completo, contendo os açúcares indicados durante 30 horas (Figuras 17). <sup>b</sup> Consumo volumétrico máximo de açúcar. <sup>c</sup> Produção volumétrica máxima de etanol. <sup>d</sup> Rendimento baseado na quantidade (gramas) de etanol produzido pela quantidade (gramas) de açúcar consumido.

Os transportadores de *S. arborariae* (Get1 e Hxt4) tem similaridade de 41,0% e 41,3% com CiGxf1, respectivamente, e o transportador de *S. passalidarum*, Sut1, tem similaridade muito alta com CiGxf1, de 78,9%. Na Figura 24, são destacados alguns motivos que geralmente estão presentes em transportadores de açúcares, como o motivo PESPR, localizado logo após o segmento transmembrana (TM) 6 e os resíduos de glutamina (Q), presentes no TM7. Os resíduos de glutamina estão localizados na posição 314 (Gxf1), 360 (SaGet1), 338 (SaHxt4). Um motivo presente em transportadores de xilose -G/F-XXX-G- (YOUNG *et al.*, 2014) aparece apenas em SpSut1 e em CiGxf1. Os resíduos de treonina (TM5) e asparagina (TM8), importantes para a afinidade do transportador ao seu substrato segundo os resultados de Farwick *et al* (2014) e Nijland *et al* (2014), estão presentes em CiGxf1 nas posições 192 e 349 para treonina e asparagina, respectivamente. No transportador Sut1 de *S. passalidarum*, esses resíduos estão conservados nas posições 194 para treonina e 351 para asparagina, e em SaGet1, treonina está na posição 227, e asparagina na 398. Já o transportador SaHxt4 possui conservado apenas o resíduo de asparagina, na posição 344, e não foi possível identificar nenhum resíduo de treonina numa região semelhante àquela encontrada em CiGxf1.



## DISCUSSÃO

Para que o etanol de segunda geração torne-se uma opção real aos consumidores, é necessário que o processo fermentativo de pentoses não aumente o tempo total de fermentação e que não resulte em açúcar residual. Para isso, uma das etapas é obter um micro-organismo capaz de utilizar xilose com a mesma velocidade (ou próximo dela) que utiliza glicose e sacarose. No contexto de engenharia das vias metabólicas, o transporte de moléculas é pouco explorado e as ferramentas para modificações são pouco desenvolvidas. A maioria das estratégias para engenharia metabólica considera que as rotas celulares limitam as velocidades de produção máximas e assim, focam na substituição de enzimas com baixa atividade por versões sobre-expressas ou melhoradas (YOUNG *et al.*, 2012). Porém, modificações no transporte são necessárias para aumentar as velocidades de crescimento com xilose (PARACHIN *et al.*, 2011), principalmente quando as vias metabólicas não estão limitando a utilização desse açúcar. O foco deste trabalho foi desenvolver linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes com capacidade de transportar e fermentar xilose através da seleção de novos transportadores de açúcares a partir de leveduras reconhecidamente fermentadoras de xilose.

Algumas pesquisas já foram publicadas com o objetivo de investigar como é realizado o transporte de glicose e xilose por transportadores endógenos de *S. cerevisiae*. Além do transporte, é importante elucidar em quais condições os genes dos transportadores são induzidos. *HXT1*, *HXT2* e *HXT3* são induzidos em altas concentrações de glicose (SEDLAK e HO, 2004), porém, trabalhos posteriores relataram que a expressão de *HXT2* é fortemente reprimida por glicose (SALOHEIMO *et al.*, 2007; MATSUSHIKA; GOSHIMA; HOSHINO, 2014) e o mesmo ocorre nas expressões dos genes *HXT4*, *HXT5*, *HXT7* e *AGT1* (SEDLAK e HO, 2004; SALOHEIMO *et al.*, 2007). *HXT5* e *HXT7* têm expressões mais altas na presença de xilose ((SEDLAK e HO, 2004; SALOHEIMO *et al.*, 2007) e recentemente foi sugerido que *Hxt5*, um transportador considerado de moderada afinidade, seja induzido sob condições de limitação de energia ou carbono, uma vez que a xilose é reconhecida pelos micro-organismos como um açúcar não-fermentável (MATSUSHIKA; GOSHIMA, HOSHINO, 2014). A expressão gênica de *S. cerevisiae* em resposta à presença de xilose é bastante parecida à sua resposta na ausência de qualquer açúcar, contudo, os genes para transportadores de açúcares *HXT4*, *HXT6* e *HXT7* têm uma indução única na presença de xilose,

diferente da indução que ocorre em outros açúcares, sugerindo que as células podem ser capazes de diferenciar a presença de xilose da ausência de qualquer açúcar, mesmo as células não sejam capazes de utilizar xilose (HARCUS *et al.*, 2013).

O consumo de xilose pelos transportadores de *S. cerevisiae* são diferentes entre os trabalhos analisados e é possível que as discrepâncias devam-se aos diferentes estágios fisiológicos células utilizados nos trabalhos (SEDLAK e HO, 2004). O transportador Hxt1, que possui baixa afinidade por glicose e xilose apresentou o consumo máximo de açúcares e maior produção de etanol durante co-fermentações com xilose e glicose. Mas esse transportador foi incapaz de captar xilose quando essa pentose era a única fonte de carbono disponível no meio. Porém, no trabalho de Tanino e colaboradores (2012), em que as sobre-expressões dos transportadores foram feitas em linhagem *S. cerevisiae* não deletada de seus transportadores e com expressão da enzima xilose isomerase, a captação de xilose (e produção de etanol) foi maior pelo transportador Hxt1, que os transportadores de *Candida intermedia* Gxf1 e Gxs1. É proposto que a sobre-expressão do transportador Hxt1 seja mais adequado para hidrolisados em que há misturas de xilose e glicose (GONÇALVES *et al.*, 2014).

O transportador Hxt2, expresso na linhagem DLG-K1T2 deste trabalho, é uma permease de média afinidade. Apesar de ter captado xilose na mesma quantidade que glicose (mesmo em co-fermentação), a fermentação foi incompleta, com alta produção de glicerol e xilitol. O transportador Hxt5 também é um carreador de açúcares de média afinidade, porém realizou pouco transporte de glicose e nenhum transporte significativo de xilose foi observado. O transportador Hxt7 é caracterizado como de alta afinidade pelos açúcares, e observou-se fermentação eficiente de xilose, mas durante co-fermentação teve preferência por glicose (GONÇALVES *et al.*, 2014). Esta permease transportou xilose com a maior capacidade de transporte entre os transportadores Hxt1, Hxt2 e Hxt4, mas sua preferência foi maior para glicose (SALOHEIMO *et al.* 2007; GONÇALVES *et al.*, 2014). A capacidade de transporte de xilose por Hxt7 também foi observada no trabalho de Sedlak e Ho (2004), em que os autores ordenaram o consumo de xilose pelas linhagens *S. cerevisiae* hxt-null da seguinte maneira: Hxt7 >Hxt5 >Gal2 > linhagem parental *S. cerevisiae* >Hxt1 >Hxt4. Porém, em Tanino *et al.* (2012), Hxt7 foi a permease que menos transportou xilose, em relação a Hxt1, Gxs1 e Gxf1. A sobre-expressão do transportador Hxt7 seria a melhor opção para mostros ricos em xilose, o que acontece quando o hidrolisado é obtido de processos de

pré-tratamento ácidos, com exposição a vapor ou hidrotermais. Além disso, abordagens para modificar Hxt de *S. cerevisiae* (e outros transportadores) para aumentar suas afinidades por pentose, ou para evitar suas degradações induzidas pelos açúcares presentes no meio, são estratégias promissoras que podem aumentar a produção de etanol de segunda geração por leveduras fermentadoras de xilose.

As espécies do clado CTG - espécies que utilizam o códon CTG para o aminoácido serina, ao invés de leucina, como a grande maioria dos organismos (MAGUIRE *et al.*, 2013) são promissoras em diversas áreas da biotecnologia e diferentemente de *S. cerevisiae* selvagem, podem utilizar xilose como única fonte de carbono e manter seu equilíbrio redox. Três espécies desse clado tiveram alguns genes expressos em *S. cerevisiae* neste trabalho: *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora passalidarum* e *S. arborariae*. Essas três espécies são capazes de fermentar uma ampla variedade de açúcares contidos nos hidrolisados lignocelulósicos (CADETE *et al.*, 2009; 2012; 2013; ; WOHLBACH *et al.*, 2011; BALAGURUNATHAN *et al.*, 2012; HANLEY; HENSON, 2013; JOHNSON, 2013; PAPON, COURDAVAULT, CLASTRE, 2014), com produção de altos níveis de etanol a partir de xilose (TOIVOLA *et al.*, 1984; DU PREEZ *et al.*, 1986, 1989; NIGAM, 2001; HOU, 2012; LONG *et al.*, 2012). Entretanto, para a indústria, têm algumas desvantagens como baixa tolerância ao etanol e incapacidade de crescimento em condições anaeróbias (DU PREEZ *et al.*, 1989; SHI e JEFFRIES, 1998; BALAGURUNATHAN *et al.*, 2012, SLININGER *et al.*, 2014).

Alguns transportadores de xilose há muito tempo já foram descritos em *S. stipitis* (KILIAN e VAN UDEN, 1988; DOES e BISSON, 1989), mas ainda não foi possível clonar transportadores de *S. stipitis* exclusivos para xilose em *S. cerevisiae* (YOUNG *et al.*, 2010). É sugerido que *S. passalidarum* utilize proteínas transportadoras de difusão facilitada de baixa afinidade e baixa capacidade quando crescida sob limitação de oxigênio e utilize um sistema de alta afinidade e alta capacidade durante o crescimento aeróbio (HOU, 2012). Essas características tornam *S. passalidarum* útil para o processo de sacarificação e fermentação simultâneas. É interessante também o estudo de suas enzimas e seus mecanismos regulatórios que permitem a utilização simultânea de açúcares celulósicos e hemicelulósicos (LONG *et al.*, 2012).

É difícil comparar os rendimentos de etanol, produtividade, consumo de substratos e produção de co-produtos de vários estudos devido às variações nos parâmetros experimentais, incluindo a

concentração inicial de substrato, os tempos de incubação e a densidade celular utilizados para as fermentações (JUN e JIAYI, 2012). No trabalho de Moon e colaboradores (2013) foi utilizado meio complexo, uma vez que as linhagens recombinantes eram industriais e não possuíam marcadores auxotróficos. As fermentações e crescimentos com as linhagens DLG-K1T1, DLG-K1T2, DLG-K1T5, DLG-K1T7, BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2 foram realizados em meios sintéticos *dropout* sem uracila, mas foram utilizadas diferentes densidades celulares e quantidades iniciais de açúcares.

As linhagens *S. cerevisiae* BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2 consumiram 100% dos açúcares presentes nos cultivos (com exceção de xilose) e a linhagem BBY-SpSUT1, durante fermentação, consumiu 76% da glicose presente, consumo superior apenas da linhagem DLG-K1T2 (expressando o gene *ScHXT2*) que consumiu 56% da glicose (GONÇALVES *et al.*, 2014). No trabalho de Young *et al.* (2012), houve consumo total da glicose, e os autores observaram que as linhagens expressando *CiGXS1* e *SsXUT3* mutantes consumiram mais glicose quando as células foram inoculadas na fase estacionária do que na fase exponencial.

O consumo de xilose das linhagens BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2 foi entre 76% e 90%, em 30 horas de fermentação, enquanto que o consumo pela linhagem BBY-SpSUT1 foi 32%. No trabalho de Young *et al.* (2012), houve consumo de 50% da xilose presente por um dos três mutantes de *SsXUT3*, mas em 100 horas de fermentação. Em Moon *et al.* (2013), as linhagens *S. cerevisiae* expressando transportadores de *S. stipitis* obtiveram um consumo maior de xilose, em média 85%, sendo que a linhagem com maior consumo foi a que expressava o transportador SsRgt2, seguido de SsXut7 e SsXut6. O gene *SsRGT2* era considerado, até a publicação do trabalho de Moon *et al.* (2013), codificante à uma proteína de membrana sinalizadora de glicose, e não um transportador. Corroborando com o trabalho de Moon e colegas (2013), no trabalho de Young *et al.* (2014), a linhagem expressando *SsRGT2* apresentou o crescimento mais rápido em xilose, quando comparado a todos os outros transportadores estudados.

Ao analisar os dados de crescimentos e fermentações das linhagens BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1, BBY-SsQUP2 e BBY-SpSUT1, é possível observar que os transportadores expressos nessas linhagens tiveram preferência por glicose ou frutose, e não necessariamente pela xilose. Quando as hexoses estavam presentes, as células foram capazes de produzir mais etanol, e a xilose só era consumida quando a glicose já estava sendo depletada do meio, sendo

que SsQup2 e SsHxt2.6 transportaram menos xilose em condições de co-fermentação do que quando a pentose era a única fonte de carbono. Essa situação é conhecida na literatura, em que linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* preferem captar glicose à xilose (WEBB e LEE, 1990; SANCHEZ *et al.*, 2002; YABLOCHKOVA *et al.*, 2003). Isso pode ser devido à maior afinidade dos transportadores por glicose (KÖTTER e CIRIACY, 1993). A preferência por glicose e consequente fase diaúxica, foi observada também por Young *et al.*, (2012) e Moon *et al.* (2013), e em trabalho anterior, verificou-se que os transportadores eram capazes de transportar, no máximo, uma molécula de xilose para cada duas de glicose (YOUNG *et al.*, 2011). Isso pode ser resultado de seleção natural, considerando que essa hexose é mais abundante na natureza, ou seja, possuir transportadores com preferência por esse açúcar pode conferir vantagem aos micro-organismos.

Os rendimentos de etanol quando apenas xilose estava presente como fonte de carbono foram menores nas linhagens expressando transportadores de *S. stipitis* (BBY-SsXUT1 teve rendimento de 0,23 g/g e BBY-SsHXT2.6, 0,14 g/g) e *S. passalidarum* (BBY-SsSUT1, 0,28 g/g) que os rendimentos das linhagens expressando o transportador endógeno *HXT7* de *S. cerevisiae* (GONÇALVES *et al.*, 2014). Porém, quando xilose e glicose estavam presentes, os rendimentos de etanol foram diferentes, sendo que a linhagem expressando *SsHXT2.6* obteve 0,43 g/g e *SsXUT1* teve rendimento de 0,51 g/g. Esses rendimentos foram maiores que os obtidos pelas linhagens de Moon e colaboradores (2013): *SsRGT2*, *SsSUT4* e *SsXUT7* obtiveram rendimento de 0,35 g/g.

O filograma (Figura 14) criado a partir do alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos dos transportadores de *S. stipitis* utilizados neste trabalho (Hxt2.6, Xut1 e Qup2) e outros 15 transportadores conhecidos (todos anteriormente expressos em *S. cerevisiae*), mostra que as proteínas estão organizadas em grupos. Desses 18 transportadores, há sítios específicos para a enzima de restrição *BamHI* nas sequências dos genes *SsXUT5*, *SsXUT6*, *SsSUT1*, *SsSUT2* e *SsSTL1*, ou seja, essas sequências seriam clivadas durante o tratamento com essa enzima na construção da biblioteca genômica. A maioria dos transportadores de *S. stipitis*, como da família Sut, não é muito similar com os transportadores Hxt de *S. cerevisiae* (WEIERSTALL; HOLLENBERG; BOLES, 1999; MOON *et al.*, 2013), e os membros de SsSut estão agrupados juntos. Em um filograma construído em trabalho anterior, com transportadores de *S. stipitis* e transportadores de outros micro-organismos, SsSut1 estava agrupado com SsSut2, SsSut3 e SsSut4, mas SsSut1 estava mais distante das

outras três permeases, ou seja, os outros transportadores são mais similares entre eles do que com SsSut1 (MOON *et al.*, 2013). No filograma deste trabalho, SsSut1 também está distante dos outros membros, mas SsSut3 está separado posteriormente, ou seja, SsSut2 e SsSut4 são mais similares entre si do que entre SsSut1 e SsSut3. Já foi relatado anteriormente que o gene *SsSUT1* é induzido por glicose e é o principal transportador de baixa afinidade de glicose da levedura *S. stipitis* (WEIERSTALL; HOLLENBERG; BOLES, 1999). Além disso, é sabido que SsSut4 é bastante similar à Gxf1, um facilitador de glicose e xilose da levedura *Candida intermedia* (MOON *et al.*, 2013).

Os genes *SsRGT2*, *SsQUP2* e *SsAUT1* estão mais isolados que outros genes e *SsRGT2* é muito relacionado com o gene do transportador ativo de *C. intermedia* *GXS1* (MOON *e tal.*, 2013). Até onde se pôde verificar, esta é a primeira vez que *SsQUP2* é funcionalmente expresso em *S. cerevisiae*. Este gene está localizado no cromossomo 7 de *S. stipitis*, e foi anotado através de similaridade com outros transportadores conhecidos. O gene *SsAUT1*, que está nomeado no banco de dados NCBI como um transportador putativo de arabinose, foi usado como sequência-isca para identificar novos transportadores de açúcares de *S. stipitis* e *N. crassa*, porém ainda não havia sido caracterizado (DU; LI; ZHAO, 2010). Neste trabalho citado, *SsAUT1* foi expresso em linhagem *S. cerevisiae* deletada dos genes *hxt1-hxt17* e *gal2*, mas os autores não observaram crescimento em glicose e nem acúmulo intracelular significativo (DU; LI; ZHAO, 2010).

SsXut1 e SsXut3 são muito próximos entre si, mas eles não compartilham nenhum ancestral comum com os outros transportadores (nem mesmo com outros membros de SsXut). O gene *XUTI* (localizado no cromossomo 6 do genoma de *S. stipitis*) codifica para um eficiente transportador de xilose, mas não específico para xilose (JEFFRIES *et al.*, 2007; YOUNG *et al.*, 2011). Recentemente, novos genes da levedura *Debaryomyces* foram identificados, como *XYLHP* e os autores concluíram que SsXut3 é semelhante à transportadores ativos de *D. fabryi* e *D. hansenii* (FERREIRA *et al.*, 2013). SsXut3 também possui similaridade com o transportador de alta afinidade de *Aspergillus nidulans* e considera-se que SsXut3 seja uma permease de alta-afinidade (FERREIRA *et al.*, 2013). Do mesmo modo, tanto SsXut1 quanto SsXut3 foram descritos como permeases de xilose em trabalhos anteriores, apesar de não terem sido analisadas nesses trabalhos quanto à forma de captação dos açúcares (YOUNG *et al.*, 2011; revisto por FERREIRA *et al.*, 2013). No filograma criado por Young *et al.* (2011) e Moon *et al.* (2013), os transportadores SsXut1, SsXut3, SsXut5 e



DhXylHP estavam agrupados juntos. As proteínas SsXut4 e SsXut7 são muito próximas, e por isso, altamente semelhantes (YOUNG *et al.*, 2011; MOON *et al.*, 2013, este trabalho), além de serem semelhantes ao transportador de XylHP de *D. hansenii*.

*SsXUT6* está mais relacionado à *SsSTL1* do que à *SsXUT2*. Além disso, o gene *SsXUT6* é bem próximo do facilitador de xilose AN25 de *N. crassa* (DU; LI; ZHAO, 2010; MOON *et al.*, 2013). O transportador SsXut6 foi identificado pela primeira vez por Du, Li e Zhao, (2010) como um transportador específico para xilose, mas em trabalhos posteriores, resultados controversos foram apresentados. Young e colaboradores (2011) não observaram nenhum crescimento quando a linhagem recombinante de *S. cerevisiae* expressava SsXut6 como o único transportador. Moon e colegas (2013) publicaram que SsXut6 é um transportador eficiente, porém não específico, de xilose (este transportador era capaz de transportar também glicose). As linhagens expressando *SsSTL1* e *SsAUT1* tiveram crescimento mais rápido em galactose do que nos outros açúcares testados (glicose, xilose, frutose e manose). Isso pode ser indicativo da habilidade dessas permeases em captar arabinose, pois ScGal2 (transportador de galactose) é uma das poucas permeases capazes de transportar arabinose. Essa correlação deve-se provavelmente à estequiometria semelhante entre esses dois açúcares, arabinose e galactose (YOUNG *et al.*, 2014).

Já *SsXUT5* está mais próximo à *SsHXT2.4* e *SsHXT2.6* do que outros *SsXUT* (Figura 14), e este trabalho é a primeira vez que o gene *SsHXT2.6* é clonado e expresso em *S. cerevisiae*. Recentemente, Ha e colaboradores (2013) identificaram os genes *SsHXT2.1*, *SsHXT2.3*, *SsHXT2.4*, *SsHXT2.5* e *SsHXT2.6* como possíveis transportadores de celodextrina, tendo sido selecionados através da ferramenta BLAST e transportadores de celodextrina *CDT1* e *CDT2* de *Neurospora crassa* usados como sequências-iscas. O gene *SsHXT2.4* foi escolhido para amplificação, clonagem e expressão em linhagem *S. cerevisiae* por possuir maior similaridade com esses transportadores, 31% para *CDT1* e 36% para *CDT2* (HA *et al.*, 2013). A utilização direta de celobiose pelas linhagens recombinantes é uma nova estratégia para a utilização eficiente dos açúcares presentes nos hidrolisados lignocelulósico, pois a presença desse açúcar não causa repressão catabólica como glicose faz e as células são capazes de fermentar misturas de celobiose mais xilose ou celobiose mais galactose (LIAN *et al.*, 2014).

Os genes *SsHXT2.4* e *SsHXT2.6* apresentam uma similaridade de 62% (HA *et al.*, 2013) e *SsHXT2.6* tem similaridade de 42% com

*CDT1* e *CDT2*, por isso é interessante o fato do transportador *HXT2.6* permitir o transporte de monossacarídeos na linhagem *S. cerevisiae hxt-null DLG-K1*, uma vez que *HXT2.6* está incluído em um grupo de transportadores de açúcares de *S. stipitis (HXT2.1-HXT2.6)* que se supõe sejam permeases de celobiose (JEFFRIES; VAN VLEET, 2009; HA *et al.*, 2013). Esses genes estão localizados próximos à genes que codificam endo-glucanases,  $\alpha$ -glicosidases ou outros transportadores de açúcares. Enquanto o recém caracterizado gene de transportador de celobiose *HXT2.4* (HÁ *et al.*, 2013) está em um *cluster* gênico com a endo-glicanase (*ECG2*) e  $\alpha$ -glicosidase (*BGL5*) no cromossomo 1 de *S. stipitis*, o gene da permease *HXT2.6* está próximo à  $\alpha$ -glicosidase (*BGL1*) e o transportador de monossacarídeos *SUT1*, no cromossomo 4. O gene *HXT2.6* é induzido (assim como *BGL1* também é) após crescimento aeróbio em celobiose como única fonte de carbono (JEFFRIES; VAN VLEET, 2009). Dessa forma, os resultados do presente trabalho indicam que apesar de *HXT2.6* ser induzido em celobiose, sua função é o transporte de monossacarídeos resultantes da clivagem de celobiose (e possivelmente outros oligossacarídeos) pela  $\alpha$ -glicosidase *BGL1*.

É interessante ressaltar que, além dos genes *HXT2.4* e *HXT2.1*, os genes de *S. stipitis HXT2.1, HXT2.2, HXT2.3* e *HXT2.5* também estão organizados no genoma de *S. stipitis* em *clusters* gênicos. *Clusters* gênicos são agrupamentos de genes fisicamente próximos no genoma cujas proteínas codificadas compartilham características fisiológicas e metabólicas que conferem vantagens adaptativas. Como mencionado anteriormente, Jeffries e Van Vleet (2009), ao analisarem a genômica, o transcriptoma e os *clusters* gênicos de *S. stipitis*, identificaram que o gene *SsHXT2.4* está localizado próximo a genes que codificam enzimas hidrolíticas de celulose como endo-1,-4, - $\beta$ -glicanase (GeneID 4850979) e  $\beta$ -glicosidase, cujo GeneID é 4850980. O gene *SsHXT2.5* está localizado no genoma perto de um gene que codifica à  $\beta$ -glicosidase (GeneID 4840204) e do transportador *SsSUT3* (GeneID 4839762). Além disso, *SsHXT2.6* está localizado em agrupamentos gênicos com um gene para tioredoxina (GeneID 4838429),  $\beta$ -glicosidase (GeneID 4838763) e um gene para uma enzima hidroxilase (GeneID 4838755) e também do gene *SsSUT2* (GeneID 4838413). Os genes *SsHXT2.3* e *SsHXT2.1* também estão próximos de  $\beta$ -glicosidase (GeneID 4837167) e endoglicanase (GeneID 4851776), respectivamente (JEFFRIES e VAN VLEET, 2009). Os perfis regulatórios de *clusters* gênicos exibem padrões que são característicos dos genes com os quais estão associados e também de suas divergências evolutivas. Por exemplo, em pelo menos

uma ocasião, um *cluster* com três genes (sendo um de  $\beta$ -glicosidase e dois de transportadores de açúcares) em *S. stipitis* se duplicou (*SUT2/BGL1/HXT2.6* e *HXT2.5/BGL3/SUT3*). Neste caso, os perfis de transcrição dos dois clusters são praticamente idênticos, sendo que os genes são fortemente induzidos na presença de celobiose. Ainda mais, as comparações filogenéticas das proteínas Hxt, Sut e Bgl mostram que esses pares de proteínas praticamente não divergiram uma da outra (JEFFRIES e VAN VLEET, 2009).

Nos alinhamentos múltiplos realizados neste trabalho, foi utilizado como referência a sequência de aminoácidos da proteína de transporte passivo de glicose e xilose da levedura *C. intermedia*: Gxf1. Leandro, Gonçalves e Spencer-Martins (2006) foram os primeiros a expressar em *S. cerevisiae* os genes de transportadores de *C. intermedia* *GXF1* e *GXS1*, obtidos de biblioteca genômica de cDNA dessa levedura. Os genes desses transportadores tem similaridade de cerca de 65% com os genes *SUT1-SUT3* de *S. stipitis*. Sabe-se que a expressão do gene *CiGXF1* é induzido por xilose e glicose e que tanto *CiGxf1* quanto *CiGxs1* tem afinidade maior por glicose que por xilose (LEANDRO; GONÇALVES; SPENCER-MARTINS, 2006). A expressão de *CiGxf1* em *S. cerevisiae* triplicou o transporte de xilose em relação à linhagem controle, durante crescimento aeróbio, quando a quantidade de xilose no meio é baixa, de cerca de 4 g/L (RUNQUIST *et al.*, 2009; 2010).

Nos alinhamentos foram identificados motivos de resíduos de aminoácidos que são característicos de transportadores. Motivos de resíduos de aminoácidos altamente conservados ocorrem em todos os membros da família de transportadores de açúcares, de bactérias a fungos e de plantas a animais (KRUCKEBERG, 1996). Por exemplo, sabe-se que o aminoácido A331 é um aminoácido chave na afinidade de substrato na permease *ScHXT2* e está localizado no poro do substrato (KASAHARA; KASAHARA, 2003). Somando-se a isso, o aspartato D340 em *ScHXT7* está localizado em posição acessível à água, no sítio de reconhecimento do substrato ou perto dele (KASAHARA; KASAHARA, 2010).

Recentemente, dois grupos de pesquisadores, trabalhando com proteínas diferentes, obtiveram mutações semelhantes em aminoácidos correspondentes (FARWICK *et al.*, 2014; NIJLAND *et al.*, 2014). Isso evidencia que os transportadores têm suas estruturas conservadas dentro da mesma espécie e também entre as espécies. Nos dois trabalhos foram utilizadas linhagens *S. cerevisiae* incapazes de crescer em glicose devido às deleções nos genes que codificam hexocinases. Farwick e colaboradores (2014) obtiveram mutantes nos transportadores de *S.*

*cerevisiae* Gal2, Hxt5 e Hxt7 e Nijaland *et al* (2014) obtiveram um mutante que é uma quimera entre a primeira metade do gene de *ScHXT3* com a segunda metade de *ScHXT6*, sendo nomeado pelos autores *ScHXT36*. Os dois genes estão organizados em *tandem* no genoma de *S. cerevisiae* e há alta homologia entre eles (NIJLAND *et al.*, 2014). A principal mutação encontrada nos aminoácidos foi a mesma nos dois trabalhos: N376F (Gal2) e N367I (Hxt36). Esses dois mutantes eram completamente não inibidos por glicose, sem capacidade de transporte de hexoses e com a maior afinidade por xilose, além de velocidade moderada de transporte para a pentose. O mutante N367I possui afinidade por xilose 2,5 vezes maior que N367, no entanto a  $V_{max}$  é 3 vezes menor que N367, o que pode explicar o baixo crescimento em xilose. Outro mutante obtido pelos autores foi N367A, que também é capaz de captar glicose, com  $K_m$  bem alto, mas cresce melhor em xilose (NIJLAND *et al.*, 2014). A relevância desses aminoácidos está relacionada com sua localização na proteína. Tais resíduos se localizam próximos ao poro de ligação do substrato. Foram obtidas outras mutações no resíduo de asparagina corresponde ao N376 de ScGal2 em ScHxt7 (N370) e ScHxt5 (N391). Os mutantes apresentaram pouca ou nenhuma inibição por glicose na captação de xilose (FARWICK *et al.*, 2014). Mutações no resíduo de treonina, do segmento transmembrana 5 (T219 em Gal2, T213 em Hxt7 e T234 em Hxt5) também diminuíram a inibição de glicose (FARWICK *et al.*, 2014). O resíduo de treonina já havia sido descrito como um aminoácido chave para a determinação de afinidade por glicose (KASAHARA; SHIMOGAWARA; KASAHARA, 2011).

É interessante notar o quanto mutações nos aminoácidos tem efeitos diferentes no transporte dos açúcares. Enquanto em um mutante de SsXut3, com apenas uma alteração (E538K) houve aumento no crescimento em todas as fontes de carbono (menos glicose); em outro mutante (CiGxs1) com cinco alterações (F40V, L74S, H274Q, F465S e F500S), apenas o crescimento em xilose foi melhorado. A mutação Phe40 de CiGxs1 (YOUNG *et al.*, 2012) impactou a captação de glicose e também a cinética de captação de xilose: o  $K_m$  foi elevado (a exclusão de glicose foi obtida às custas de diminuição de afinidade por xilose) mas a  $V_{max}$  dobrou. Esses resultados demonstram que há ainda muito a ser compreendido quanto às relações entre sequência, estrutura e função dos transportadores (YOUNG *et al.*, 2012).

A maioria dos motivos de aminoácidos descritos em transportadores de açúcares é de aminoácidos carregados ou polares que formam uma rede intrincada de ligações de hidrogênio. Essas ligações

mediam interações entre os segmentos transmembrana (TM) e os domínios intracelulares (SUN *et al.*, 2012). As mutações nos resíduos de asparagina (N376 em ScGal2 e N370 em ScHxt7) e treonina (T219 em ScGal2 e T213 em ScHxt7) realizadas por Farwick (2014) e Nijland (2014) localizam-se nos segmentos transmembrana 5 (treonina) e 8 (asparagina). Esses resíduos também estão conservados no transportador de xilose da bactéria *E. coli* XylE (SUN *et al.*, 2012). As cadeias laterais desses aminoácidos estão localizadas do lado extracelular do poro de ligação do substrato, assim essas alterações podem impedir estericamente que a glicose entre no poro e alivie a inibição por competição, mas não alteram a capacidade de transporte das proteínas (FARWICK *et al.*, 2014).

Um transportador de xilose que não seja inibido por glicose é um pré-requisito vital para a fermentação simultânea de glicose e xilose. Mas essa característica parece ser rara na natureza (FARWICK *et al.*, 2014). Os trabalhos de Farwick *et al.* (2014) e Nijland *et al.* (2014) sugerem que a maneira mais eficaz de se obter um transportador ideal é através de mutações nas sequências de aminoácidos de transportadores já conhecidos. Sabendo da importância dos aminoácidos asparagina e treonina para a afinidade de glicose, foram identificados que, das proteínas utilizadas neste trabalho, SsXut1 e SsHxt2.6 possuem resíduos de treonina correspondentes aos resíduos de ScGal2, ScHxt5 e ScHxt7 no segmento transmembrana 5 (T181 em SsXut1 e T177 em SsHxt2.6). Essas permeases possuem também resíduos de asparagina no TM8 correspondentes aos transportadores citados (N351 em SsXut1 e N341 em SsHxt2.6). O transportador SsQup2, entretanto, não possui nenhum dos dois aminoácidos em possíveis correspondentes àquelas dos transportadores de *S. cerevisiae* (ScGal2, ScHxt5 e ScHxt7). Com essas informações, é possível inferir que as capacidades de transporte de xilose e diminuição da inibição de captação dessa pentose por glicose podem ser melhoradas através de mutagênese sítio-dirigida dos transportadores SsXut1 e SsHxt2.6. Em relação aos transportadores de *S. arborariae*, SaGet1 possui o resíduo de treonina e asparagina, mas o transportador putativo SaHxt4 possui apenas o resíduo de asparagina. Porém, em SaHxt4, asparagina está localizada anteriormente ao segmento transmembrana 8 – ao invés de dentro do segmento, como nos outros transportadores. No transportador SpSut1 de *S. passalidarum*, os dois importantes resíduos estão presentes nos respectivos TMs. Também é preciso salientar que, devido à alta similaridade com CiGxf1 (79,9%), os TMs dessas duas proteínas são muito parecidos. Além desses resíduos, é importante destacar que SsXut1, SsHxt2.6, SsQup2, SaGet1,

SaHxt4 e SpSut1 apresentam outros motivos altamente conservados nos transportadores de açúcares como o resíduo de glutamina no TM 7 e o motivo PESPR. Este motivo localiza-se logo após o TM 6 e está presente em transportadores de glicose de humanos (Glut1-Glut4) e no transportador de xilose de *E. coli*, XYLE (SUN *et al.*, 2012).

Somando-se a esses resíduos conservados em diferentes transportadores, outro importante motivo foi identificado recentemente. A partir do trabalho de Young *et al.*, (2012) em que o transportador CiGxs1 apresentou uma mutação no aminoácido Phe40, os autores verificaram que esse aminoácido era parte de um motivo presente em todos os transportadores de xilose (com transporte maior por xilose que glicose). A sequência e importância desse motivo no transporte de açúcares foi elucidado em recente trabalho de Young *et al.* (2014). Esse motivo, que estava presente em 29 sequências de 46 transportadores estudados, está localizado no segmento transmembrana 1 dessas proteínas. Sua sequência degenerada G-G/F-XXX-G demonstra controle sobre a eficiência e seletividade para o transporte de xilose (YOUNG *et al.*, 2014). Utilizando um programa de bioinformática HMMTOP (TUSNÁDY; SIMON, 2001), foi constatado que SsXut1 (expresso na linhagem BBY-SsXUT1) tem esse importante motivo, o que pode explicar, em parte, sua maior eficiência em relação à SsHxt2.6, que não possui esse motivo. SsQup2 possui o motivo, mas com uma variação da sequência, pois no início do motivo, ao invés de glicina, apresenta um resíduo de alanina. Não é possível confirmar qual a mudança resultante na conformação da proteína. Entretanto, tanto glicina quanto alanina são aminoácidos não-polares, de cadeias laterais pequenas. Entre os transportadores do gênero *Spathaspora*, apenas SsSut1 (*S. passalidarum*) apresenta tal motivo no TM1. A ausência dessas sequências de aminoácidos nos transportadores de *S. arborariae* pode explicar, em parte, a incapacidade desses em transportar xilose.

A presença do motivo é regra para transportadores que transportam mais xilose que glicose, mas o motivo não está presente apenas nos transportadores de xilose, uma vez que também ocorre, menos frequentemente, em transportadores que captam mais glicose que xilose, captam apenas glicose ou mesmo não são funcionais quando expressos em *S. cerevisiae* (YOUNG *et al.*, 2014). Contudo, esse motivo parece exibir controle na seletividade de substrato e eficiência de captação de transportadores MFS. Alterando esse motivo, é possível diminuir o transporte de glicose mantendo o transporte de xilose. A troca por aminoácidos hidrofóbicos, não polares e de tamanhos médios ou grandes demonstram atenuar a afinidade por glicose e não por xilose

(YOUNG *et al.*, 2014). Porém, a combinação mais eficiente no motivo para o transporte de xilose não existe naturalmente em nenhum transportador. Como sugerido para as modificações nos resíduos de asparagina (N376 em Gal2) e treonina (T219 em Gal2), a afinidade diminuída por glicose é causada por exclusão estérica (não cabem 6 carbonos na nova conformação da proteína), pois as longas cadeias de aminoácidos impedem a ligação de glicose no poro, mas permite que moléculas menores como xilose, se liguem e sejam translocadas (YOUNG *et al.*, 2014).

A expressão dos dois transportadores putativos de *S. arborariae* expressos em *S. cerevisiae* neste trabalho (SaGet1 e SaHxt4) não restabeleceram o crescimento das linhagens BBY-SaGET1 e BBY-SaHXT4 em fontes de carbono além de maltose, e SaGet1 era capaz de captar glicose apenas quando maltose também estava presente (Figuras 18 e 19). O motivo da incapacidade desses transportadores não captarem xilose ou frutose e de SaGet1 apenas captar glicose ainda deve ser elucidado. A falta de crescimento quando um transportador heterólogo é expresso pode ser devido à incompatibilidade com o micro-organismo hospedeiro (YOUNG *et al.*, 2011) ou causado por alguma falha na transcrição e tradução do mRNA. É possível que SaGet1 tenha um mecanismo de captação similar ao transportador SpFsy1 da levedura *Saccharomyces pastorianus*, que é específico para frutose (GONÇALVES *et al.*, 2000). Esse carreador ativo não aceita glicose como substrato e co-transporta dois prótons para cada molécula de frutose (ANJOS *et al.*, 2002; 2013). A estequiometria de dois H<sup>+</sup> por açúcar tem uma importante consequência no modo de fermentação do açúcar: em uma linhagem expressando apenas o transportador ativo do gene *SpFSY1*, a frutose só pode ser fermentada sob condições completamente aeróbias e nem fermentação ou crescimento são observados em condições anaeróbias (ROCA *et al.*, 2004). O custo energético do transporte simultâneo de H<sup>+</sup> é igual ao ganho energético máximo (2 ATPs) durante a fermentação de frutose. Dessa forma, nenhuma energia está disponível para a manutenção celular ou crescimento, ou seja, o modo de operação desses transportadores é desfavorável energeticamente. Análises quanto aos aminoácidos carregados nas hélices que formam a cavidade de permuta nos transportadores mostram que SpFsy1 tem três ácidos glutâmicos e um ácido aspártico. Apesar de SaGet1 ter apenas um aminoácido carregado no TM 4, a proteína possui um ácido aspártico e um ácido glutâmico na  $\alpha$ -hélice 5. A Figura 25 mostra um alinhamento feito entre essas pequenas sequências, comparando os TMs 4 e 5 do SaGet1 (*S.*

*arborariae*) e SpFsy1 (*S. pastorianus*). Os aminoácidos carregados presentes nos TMs 4 e 5 de SaGet1 é um indício de que o transportador realize co-transporte de dois prótons para cada molécula de glicose carregada.

		TM4	
Get1	190	GRVLSGVGVGILSTIVPSYQCEI	212
Fsy1	196	GRFLIGVGVGLEGGGIGVYIAES	218
		TM5	
Get1	219	GKLVCGEFTNGIIGYSLSVWVDYF	242
Fsy1	225	GSLVSLYQFNIALGELFGYIVGVIFFDV	252

**Figura 25: Alinhamento dos segmentos transmembrana 4 e 5 dos transportadores Fsy1 (*Saccharomyces pastorianus*) e Get1 (*Spathaspora arborariae*).** Em cinza estão destacados os segmentos transmembrana de cada transportador. Sublinhado e em negrito são mostrados os aminoácidos carregados que provavelmente estão envolvidos com o transporte ativo dos açúcares. Para o alinhamento, foi utilizado Clustal Omega (EBML-EBI).

Para verificar se as proteínas estão nas membranas das células, as sequências dos genes *SaGET1* e *SaHXT4* clonados no plasmídeo pPGK foram fusionadas com a sequência de *GFP*. Essa estratégia é uma ferramenta útil para monitorar os fenômenos bioquímicos e celulares. As quimeras obtidas com *GFP* e proteínas de interesse possuem as mesmas características que apresentam sem a fusão ao gene (KRAMPE; BOLES, 2002; SUYLEKOM *et al.*, 2007). Além disso, o sinal fluorescente emitido da proteína fusionada é útil para monitorar a localização subcelular das proteínas e sua dinâmica em células vivas (KRUCKEBERG *et al.*, 1999), durante crescimentos e fermentações.

Considera-se que a degradação de diferentes transportadores de açúcares ocorra de maneira semelhante: as proteínas são endocitadas e internalizadas para posterior degradação em vacúolos (KRAMPE; BOLES, 2002; SUYLEKOM *et al.*, 2007). Em 2007, Suylekom *et al.* fusionaram *SchXT5* com *GFP* e observaram que, durante o crescimento, conforme as células cresciam e se duplicavam, aumentava a quantidade de células não marcadas com *GFP*, porque as proteínas não eram incorporadas às células-filhas, o que acontecia durante a fase estacionária (SUYLEKOM *et al.*, 2007) e aumentava também a quantidade de proteínas que não estavam na membrana plasmática, mas



sim no interior das células. Isso sugere um processo ativo de degradação das proteínas. Além disso, quando mais glicose era adicionada ao meio, a proteína ScHxt5-GFP foi diluída do meio. No trabalho de Kruckeberg *et al.* (1999), a expressão da proteína ScHxt2 marcada com GFP também foi interrompida em altas concentrações de glicose. E no trabalho de Krampe e Boles (2002), foi demonstrado que a proteína Hxt7 é internalizada por endocitose em condições de restrição de nitrogênio, mas com uma fonte de carbono disponível.

Neste trabalho, nem todas as células estavam marcadas com a proteína de fluorescência e a ausência de marcação aumentava com o decorrer da fermentação. Em algumas células SaGET1-GFP, as proteínas estavam presentes na membrana a partir do ponto 10 horas e algumas se mantiveram na membrana em 24 horas. Portanto, as proteínas SaGet1 e SaHxt4 expressas não foram exportadas para a membrana de maneira apropriada e isso pode ser devido à instabilidade na conformação da proteína. Essa instabilidade pode também ocorrer apenas na membrana, obrigando as células a endocitar as proteínas. Em 2010, Du, Li e Zhao observaram que nas células expressando o gene de *An25* de *N. crassa* fusionadas com *GFP*, as proteínas localizavam-se na membrana plasmática. Todavia, nas células expressando o gene de *S. stipitis* *XUT6* também fusionadas com *GFP*, as proteínas permaneciam no citoplasma. Os autores argumentaram que a ineficiente exportação do transportador pode ser devido à elevada expressão dessa proteína. Ou ainda, o acúmulo das proteínas no citoplasma pode indicar que a expressão das permeases não estava otimizada ou não era estável. A sobre-expressão de proteínas de membrana também pode afetar a integridade da membrana celular (DU, LI, ZHAO 2010). Isso não parece ser o caso no presente trabalho, uma vez que maltose está sendo consumida pela célula.

Além disso, o efeito da sobre-expressão de transportadores de açúcares pode depender do *background* genético da linhagem, das alterações genéticas realizadas e das condições de cultivo (DU, LI, ZHAO 2010; RUNQUIST *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2013). Em 2011, Young e colaboradores realizaram uma pesquisa com 26 transportadores de diferentes micro-organismos. Os autores observaram captação de glicose em apenas 10 desses transportadores, sendo que apenas sete eram capazes de transportar xilose: Gxs1 e Gxf1, de *C. intermedia*; Hxt7 e Gal2 de *S. cerevisiae*; XylHP de *Debaryomyces hansenii*; Xut1e Xut3 de *S. stipitis*. Neste trabalho, a expressão de Xut4, Xut5, Xut6 e Xut7 de *S. stipitis*, em uma linhagem de *S. cerevisiae* *hxt*-null, complementada com a via das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase em

plasmídeos, não restabeleceu o crescimento de *S. cerevisiae* em glicose (ou xilose); entretanto, no trabalho de Moon e colaboradores (2013) os mesmos genes de *S. stipitis* – expressos em linhagem *S. cerevisiae* com *background* genético industrial e com o gene da xilose isomerase integrada ao genoma – restabeleceram a capacidade de crescimento de glicose (e também xilose) da levedura. É sugerido que uma das razões de transportadores heterólogos não mostrarem atividade é terem sido expressos em linhagem *S. cerevisiae* que já possuía alterações genéticas, como a linhagem utilizada no presente trabalho, em que a levedura *S. cerevisiae* foi deletada em sete transportadores de açúcares, além de expressar duas enzimas de *S. stipitis* (xilose redutase e xilitol desidrogenase) e sobre-expressar sua enzima xilulocinase endógena. Essas manipulações podem estar interferindo com possíveis interações gênicas (MOON *et al.*, 2013; ZUO *et al.*, 2013).

A identificação e posterior clonagem de transportadores heterólogos em linhagens *S. cerevisiae* nem sempre resulta em proteínas funcionais, capazes de transportar açúcares para dentro das células na levedura hospedeira (HAMACHER *et al.*, 2002). Em recente análise do transcriptoma de *Neurospora crassa* (crescendo em glicose, xilose ou arabinose), foram identificados 14 transportadores putativos nesse micro-organismo (LI *et al.*, 2014), sendo que quatro desses transportadores já haviam sido estudados: Hgt1, An25, Cdt1 e Cdt2 ((XIE *et al.*, 2004; DU; LI; ZHAO, 2010; GALASKA *et al.*, 2010). Li *et al* (2014) focaram em cinco possíveis transportadores, que não haviam sido caracterizados anteriormente. Dois deles, NCU05853 e NCU5897, não captaram xilose ou arabinose mesmo sendo esses genes altamente induzidos por esses açúcares, a expressão de apenas um transportador possibilitou o crescimento em glicose da linhagem *S. cerevisiae* (NCU01633, nomeado Glt1) e outros dois foram nomeados conforme suas capacidades de transporte: *XATI*(NCU01132), que transporta tanto xilose quanto arabinose e *XYTI*(NCU05627), que transporta apenas xilose (LI *et al.*, 2014).

Pode-se especular também que os resultados da captação exclusiva de glicose e a instabilidade do transportador na membrana plasmática devem-se, em parte, pela presença de dois códons CTG (nos segmentos transmembrana2 e 12) na sequência de SaGet1. Tais mudanças de aminoácidos e considerando que essas alterações ocorrem em  $\alpha$ -hélices – especialmente no segmento transmembrana 2, que faz parte do poro de translocação do substrato – poderiam interferir na funcionalidade do transportador de captar os açúcares eficientemente.

Outra questão quanto à expressão heteróloga são as barreiras metabólicas ao expressar essas proteínas em meios com limitação de nutrientes, pois podem requerer alta manutenção energética durante a utilização de xilose (FENG e ZHAO, 2013). De acordo com Feng e Zhao (2013), as barreiras metabólicas ao expressar enzimas heterólogas em meio com limitação de nutriente aumentam em 30-38% o fluxo no ciclo do ácido cítrico nas linhagens recombinantes. Dessa maneira, mais ATP deve ser produzido na fosforilação oxidativa para satisfazer os altos requerimentos para manutenção energética. Resultados semelhantes foram apresentados em linhagem recombinante de *Pichia pastoris*, mostrando correlação ao ciclo do ácido cítrico aumentado com a diminuição do rendimento de biomassa, porque mais carbonos são perdidos como CO<sub>2</sub> ao invés de serem usados para síntese (JORDAN *et al.*, 2012). Em linhagens *hxt*-null, quando são expressos transportadores ativos, o ganho de ATP é muito baixo para suportar crescimento em xilose como única fonte de carbono (HECTOR *et al.*, 2008). *Backgrounds* genéticos diferentes e configurações experimentais diferentes impedem uma comparação direta entre os trabalhos. Apesar dos resultados refletirem a capacidade de captação dos transportadores expressos, podem também ser reflexo das propriedades das linhagens hospedeiras (RUNQUIST *et al.*, 2009).

Apesar de não ser possível confirmar a natureza dos transportadores utilizados no presente trabalho, os dados sugerem que essas permeases são eficientes no consumo de hexoses como glicose e frutose. Embora haja consumo de xilose quando esta está presente e também haver a produção de etanol a partir dessa pentose, esses transportadores ainda não são o que se considera ideal para uma ótima fermentação industrial contendo hexoses e pentoses. O potencial industrial em expressar transportadores heterólogos em *S. cerevisiae* é altamente dependente da concentração de glicose e xilose durante o processo (RUNQUIST *et al.*, 2010). O conhecimento adquirido em relação aos transportadores de açúcares de leveduras, nos diversos trabalhos já realizados, está concentrado principalmente em permeases de glicose. Há informação acumulada quanto aos transportadores capazes de captar xilose e suas formas de regulação. Mas informações quanto à caracterização fisiológica e bioquímica ainda são escassas e controversas (HAMACHER *et al.*, 2002; JANSEN *et al.*, 2002).

## CONCLUSÕES

Com o objetivo de contribuir com a otimização da fermentação de xilose por leveduras *S. cerevisiae*, no presente trabalho foram analisadas as capacidades de transporte de permeases endógenas de *S. cerevisiae*; de transportadores *S. stipitis* obtidos a partir de biblioteca genômica, e de três transportadores oriundos das leveduras *S. arborariae* e *S. passalidarum*. Considerando os resultados apresentados neste trabalho, é possível concluir que:

- O transportador Hxt1 exibiu as mais elevadas velocidades de consumo de glicose, porém a linhagem consumiu xilose apenas em co-fermentação com glicose. A linhagem expressando o gene *HXT5* não fermentou xilose, mesmo em co-fermentação, enquanto a permease codificada pelo gene *HXT2* permitiu o consumo de xilose com velocidade semelhante àquela observada com glicose; entretanto exibiu baixo rendimento em etanol. A linhagem com expressão de *HXT7* fermentou eficientemente glicose ou xilose, no entanto, em ensaios de co-fermentação a xilose só pôde ser consumida após a glicose ter sido extinta do meio;

- Três genes foram expressos em *S. cerevisiae* a partir da biblioteca genômica de *S. stipitis*: *XUT1*, *HXT2.6* e *QUP2* que, juntamente com o gene *SUT1* (amplificado do genoma de *S. passalidarum*) mostraram-se funcionais para o transporte de xilose, embora não fossem exclusivos para essa pentose, transportando também glicose e frutose. As células tiveram preferência por outros açúcares (glicose ou maltose) e transportaram xilose quando a outra fonte de carbono já havia sido consumida;

- No filograma construído com transportadores conhecidos de *S. stipitis* e previamente expressos em *S. cerevisiae*, Qup2 está isolado das outras proteínas; Xut1 é muito próximo de Xut3, mas não compartilham nenhum representante comum com os outros transportadores (nem mesmo com outros membros de Xut) e Hxt2.6 é altamente relacionado com as outras permeases Hxt, como Hxt2.4;

- Alguns resíduos e motivos são altamente conservados entre os transportadores de açúcares das espécies estudadas, como o motivo PESPR, localizado entre os segmentos transmembrana (TM) 6 e 7, e o motivo GG/FXXXG (TM1); além dos resíduos treonina (localizado no TM5) e asparagina (TM8);

- O transportador putativo de *S. arborariae* SaGet1, expresso em *S. cerevisiae*, foi capaz de captar glicose apenas quando maltose também estava presente e SaHxt4 não transportou nenhuma das fontes

de carbono testadas além de maltose. Quando fusionados com GFP, verificou-se que os transportadores SaGet1 e SaHxt4 estavam localizados na membrana celular após 24 horas de fermentação em maltose e glicose. SaGet1 apresenta aminoácidos carregados nas  $\alpha$ -hélices que formam a cavidade de ligação ao substrato de maneira homóloga à Fsy1, transportador ativo específico para frutose de *Saccharomyces pastorianus*.

Os dados sugerem que essas permeases são eficientes no transporte de hexoses como glicose e frutose. Embora as linhagens expressando os transportadores tenham consumido xilose com produção de etanol, essas proteínas não são o que se considera ideal para uma ótima fermentação industrial contendo hexoses e pentoses.

## REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids Res.**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ALVES, S. L. JR.; HERBERTS, R. A.; HOLLATZ, C.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Maltose and maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 65, p. 99-104, 2007.
- ALVES, S. L. JR.; HERBERTS, R. A.; HOLLATZ, C.; TRICHEZ, D.; MILETTI, L. C.; DE ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: a determinant role for the *AGT1* permease. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 1494-1501, 2008.
- AMORIM, 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.
- ANJOS, J.; GEROS, H.; CASSIO, F.; SPENCER-MARTINS I. Reconstitution of the *FSY1* encoded fructose/H<sup>+</sup> symporter from a lager brewing strain in hybrid plasma membrane vesicles. In: 20<sup>th</sup> **Small Meeting in Yeast Transport and Energetics (SMYTE)**, Baltimore, Book of Abstracts, p. 28, 2002.
- ANJOS, J.; RODRIGUES DE SOUZA, H.; ROCA, C.; CÁSSIO, F.; LUTTIK, M.; PRONK, J. T.; SALEMA-OOM, M.; GONÇALVES, P. *FSY1*, the sole hexose-proton transporter characterized in *Saccharomyces* yeasts, exhibits a variable fructose:H<sup>+</sup> stoichiometry. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1828, p. 201-207, 2013.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D. SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1995.
- BAJAY, S. V.; NOGUEIRA, L. A. H.; SOUSA, F. J. R. Ethanol in the Brazilian energy matrix. **Ethanol and bioelectricity: sugarcane in the future energy matrix**. Unica. São Paulo: Unica, p. 260-308, 2011.
- BALAGURUNATHAN, B.; JONNALAGADDA, S.; TAN, L.; SRINIVASAN, R. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model for *Scheffersomyces stipitis*. **Microb. Cell Fact.**, v. 11, p.27, 2012.
- BALDWIN S. A. Membrane transport, a practical approach. **Oxford University Press**, Oxford, 2000.

BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 8, p. 26–33, 2004.

BENGTSSON, O.; HAHN-HÄGERDAL, 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.

BISSON L. F., FRAENKEL D. G. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 80, p. 1730-1734, 1983a.

BISSON L. F., FRAENKEL D. G. The transport of 6-deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 155, p. 995-1000, 1983b.

BORATYN, G. ; CAMACHO, C.; COOPER, P. S.; COULOURIS, G.; FONG, A.; MA, N.; MADDEN, T. L.; MATTEN, W. T.; MCGINNIS, S. D.; MEREZHUK, Y.; RAYTSELIS, Y. SAYERS, E. W.; TAO, T.; YE, J.; ZARETSKAYA, BLAST: a more efficient report with usability improvements. **Nucl. Acids Res.**, v. 41, Web Server Issue, W29-W33, 2013.

BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 8, p. 2304-2311, 2009.

BRUINENBERG, P. M.; DE BOT, P, H.M.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 287–292, 1983.

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

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, n. 8, e43135, p. 1-11, 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 sushii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. Nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel (D)-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Anton. Leeuw.**, v. 103, n. 2, p. 421-431, 2013.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 421, 2009.

CANELLA, D.; JØRGENSEN, H.; Do New cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production. **Biotechnol. Bioengineer.**, v. 111, p. 59-68, 2014.

CAO, L.; TANG, X.; ZHANG, X.; ZHANG, J.; TIAN, X.; WANG, J.; XIONG, M.; XIAO, W. Two-stage transcriptional reprogramming in *Saccharomyces cerevisiae* for optimizing ethanol production from xylose. **Metab. Eng.** v. 24, p. 150-159, 2014.

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.

CARLSON, M. Glucose repression in yeast. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 202-207, 1999.

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

CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. 992 p.

CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L. R.; SEHNEM, N. T.; 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.

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

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.

DOES, A. L.; BISSON L. F. Characterization of xylose uptake in the yeasts *Pichia heedie* and *Pichia stipitis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 1, p. 159-164, 1989.



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

DU PREEZ, J.C.; VAN DRIESSEL, B.; PRIOR, B.A. Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved oxygen levels. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, n. 1, p. 53-58, 1989.

DU PREEZ J. C., KOCK S. H., KILIAN S. G., LITTHAUER D. The relationship between transport kinetics and glucose uptake by *Saccharomyces cerevisiae* in aerobic chemostat cultures. **Anton. Leeuw.**, v. 77, p. 379-388, 2000.

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, n. 11, p.2150-2156, 2010.

DUJON, B. et al., Genome Evolution in yeasts. **Nature**, v. 430, p. 35-44, 2004.

DUNN, K. L.; RAO, C. Expression of a xylose-specific transporter improves ethanol production by metabolically engineered *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 98, p. 6897-6905, 2014.

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

FARWICK, A.; BRUDER, S.; SCHADEWEG, V.; OREB, M.; BOLES, E. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v 111, n. 14, p. 5159-5164, 2014.

FENG, X.; ZHAO, H. Investigating xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* via <sup>13</sup>C metabolic flux analysis. **Microb. Cell Fact.**, v. 12, p. 114-126, 2013.

FERNANDES, D. L. A.; PEREIRA, S. R.; SERAFIM, L. S.; EVTUGUIN, D. V.; XAVIER, A. M. R. B. Second generation bioethanol from lignocellulosics: processing of hardwood sulphite spent liquor. **Bioethanol**, cap. 6, 2012.

FERREIRA, D.; NOBRE, A.; SILVA, M. L.; FARIA-OLIVEIRA, F.; TULHA, J.; FERREIRA, C.; LUCAS, C. *XYLH* encodes a xylose/H<sup>+</sup> symporter from the highly related yeast species *Debaryomyces fabryi* and *Debaryomyces hansenii*. **FEMS YEAST Res.**, v. 13, p. 585-596, 2013.

FERREIRA-LEITÃO, V.; PERRONE, C. C.; RODRIGUES, J. FRANKE, A. P. M.; MACRELLI, S.; ZACCHI, G. An approach to the utilization of CO<sub>2</sub> as

impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. **Biotechnol. Biofuels.**, v. 3, p.1-8, 2010.

FORSBURG, S. L. The art and design of genetic screens: yeast. **Nat. Rev. Genet.**, v. 2, p. 659-668, 2001.

GALAZKA, J. M.; TIAN, C.; BEESON, W. T.; MARTINEZ, B.; GLASS, N. L.; CATE, J. H. Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. **Science**, v. 330, p. 84-86, 2010.

GAMBLE, J. A.; Pathogen Sequencing Unit; Wellcome Trust Sanger Institute, Wellome Trust Genome Campus. Cambridge, Reino Unido. **Direct Submission NCBI**, 2009.

GARDONYI, M.; HAHN- HÄGERDAL, B. The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 32, p. 252–259, 2003.

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

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

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T. Bioenergy: How much? **Environ. Res. Lett.** v. 8, p. 1-4, 2013.

GOLDEMBERG, A.; SCHAEFFER, R.; LUCCHESI, R. Oil and natural gas prospects in South America: Can the petroleum industry pave the way for renewable in Brazil? **Energy Policy**, v.64, p58-70, 2014.

GONÇALVES, D. L.; MATSUSHIKA, A.; SALES, B. B.; GOSHIMA, T.; BON, E. P. S.; STAMBUK, B. U. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 63, p. 13–20, 2014.

GONÇALVES, P.; DE SOUZA, H. R.; SPENCER-MARTINS, I. *FSY1*, a novel gene encoding a specific fructose/H<sup>+</sup> symporter in the type strain of *Saccharomyces carlsbergensis*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 5628-5630, 2000.

GOUJON, M.; MCWILLIAM, H.; LI, W.; VALENTIN, F.; SQUIZZATO, S.; PAERN, J.; LOPEZ, R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, p. 695-699, 2010.

GUO, C.; JIANG, N. Physiological and enzymatic comparison between *Pichia stipitis* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on xylose fermentation. **World J. Microb. Biot.** v. 29, p. 541-547, 2013.

- HA, S. J.; KIM, S. R.; CHOI, J. H.; PARK, M. S.; JIN, Y. S. Xylitol does not inhibit xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing *XYLA* as severely as it inhibits xylose isomerase reaction in vitro. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 92, p. 77-84, 2011.
- HA, S., KIM, H.; LIN, Y.; JANG, M. GALAZKA, J. M.; KIM, T.; CATE, J. H. D.; JIN, Y. Single amino acid substitutions in Hxt.4 from *Scheffersomyces stipitis* lead to improved cellobiose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microb.**, v. 79, n. 5, p. 1500-1507, 2013.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOGG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 16, p. 933-943, 1994.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; WAHLBOM, C. F.; GÁRDONYI, M.; VAN ZYL, W. H.; OTERO, R. R. C.; JONSSON, L. J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 73, p. 53-84, 2001.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; PAMMENT, N. Microbial pentose metabolism. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 113-116, p. 1207-1209, 2004.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Adv. Biochem. Eng/Biotechnol.**, v. 108, p. 147-177, 2007.
- HAMACHER, T.; BECKER, J.; GARDONYI, M.; HAHN- HÄGERDAL, B.; BOLES, E. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transportes and their influence on xylose utilization. **Microbiology** v. 148, p. 2783-2788, 2002.
- HANLY, T. J.; HENSON, M. A. Dynamic metabolic modeling of a microaerobic yeast co-culture: predicting and optimizing etanol production from glucose/xylose mixtures. **Biotechnol. Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2013.
- HARCUS, D.; DIGNARD, D.; LEPINE, G.; ASKEW, C.; RAYMOND, M.; WHITEWAY, M.; WU, C. Comparative Xylose Metabolism among the Ascomycetes *C. albicans*, *S. stipitis* and *S. cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, e80733, p. 1 - 10, 2013.
- HASUNUMA, T.; ISMAIL, K. S. K.; NAMBU, Y.; KONDO, A. Co-expression of *TALI* and *ADHI* in recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulose hydrolysates in the presence of furfural. **J. Bioscienc. Bioengineerin.** v. 117, n. 2, p.165-169, 2014.

HATANAKA, H.; OMURA, F.; KODAMA, Y.; ASHIKARI, T. Gly-46 and His-50 of yeast maltose transporter Mal21p are essential for its resistance against glucose-induced degradation. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 15448-15457, 2009.

HECTOR, R. E.; QURESHI, N.; HUGHES, S.R.; COTTA, M. A. Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 80, p. 675–684, 2008.

HECTOR, R.; DIEN, B.; COTTA, M.; MERTENS, J. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. **Biotechnol. Biofuels**, v. 6, n. 84, p. 1-12, 2013.

HENDERSON, P. J. F. The 12-transmembrane-helix transporters. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 5, n. 4, p. 708-721, 1993.

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

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

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

HOFMANN, K.; STOFFEL, W. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. **Biol. Chem. H-S.**, v. 374, p. 166, 1993.

HORÁK J. Yeast nutrient transporters. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1331, p. 41-79, 1997.

HORÁK, J. Regulations of sugar transporters: insights from yeasts. **Curr. Genet.**, v. 59, p.1-31, 2013.

HOU, J.; SHEN, Y.; LI, X. P.; BAO, X. M. Effect of the reversal of coenzyme specificity by expression of mutated *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 45, n. 2, p.184–189, 2007.

HOU, J.; SUO, F.; CHENGQIANG, W.; LI, X.; SHEN, Y.; BAO, X. Fine-tuning of NADH oxidase decreases byproduct accumulation in respiration deficient xylose metabolic *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Biotechnol.**, v. 14, n.13, 2014.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 94, p. 205-214, 2012.

HUSON, D. H.; RICHTER, D. C.; RAUSCH, C.; DEZULIAN, T.; FRANZ, M.; RUPP, R. Dendroscope: Na interactive viewer for large phylogenetic trees. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 460, 2007.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, **WORLD ENERGY OUTLOOK**, Edição 2012, 2012, 690 p.

JANSEN, M.; DE WINDE, J e PRONK, J. Hxt-carrier-mediated glucose efflux upon exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to excess maltose. **App. Environm. Microbiol.** v. 68, p. 4259-4265, 2002.

JEFFRIES, T. W.; SHI, N. Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 65, p. 117-161, 1999.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Curr. Opin. Biotech.**, v. 17, n. 3, p. 320-326, 2006.

JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y.S.U.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnol.**, v. 25, p.319-326, 2007.

JEFFRIES; T. W.; VAN VLEET, J. R. H. *Pichia stipites* genomics, transcriptomics, and gene clusters. **FEMS Yeast Res.** v. 9, p. 793-807, 2009.

JEPSSON, M.; JOHANSSON, B.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 1604-1609, 2002.

JEPSSON, 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.

JEPSSON, M.; BENGTTSSON, O.; FRANKE, K.; LEE, H.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher Km for NADPH increases ethanol production from

xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 93, p.665-673, 2006.

JIN, Y S.; NI, H.; LAPLAZA, J. M.; JEFFRIES, T. M. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xyulokinase activity. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 495-503, 2003.

JIN, Y.; ALPER, H.; YANG, Y.; STEPHANOPOULOS, G. Improvement of xylose uptake and ethanol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through an inverse metabolic engineering approach. **App. Env. Microb.**, v. 71, p. 8249-8256, 2005.

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.

JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts – the ascomycetes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 97, p. 7563-7577, 2013

JOHNSON, M.; ZARETSKAYA, I.; RAYTSELIS, Y.; MEREZHUK, Y.; MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L., NCBI BLAST: a better web interface. **Nucl. Acids Res.**, v. 36, Web Server Issue, W5-W9, 2008.

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.

JORDAN, D.; BOWMAN, M. J.; BRAKER, J.D.; DIEN, B. S.; HECTOR, R. E. LEE, C. C. MERTENS, J. A. WAGSCHAL, K. Plant cell walls to ethanol. **Biochem. J.** v. 442, p. 241-252, 2012.

JUN, H.; JIAYI, C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for increased bioconversion of lignocellulose to ethanol. **Indian J. Microbiol.** v. 52, n. 3, p. 442-448, 2012.

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

KANG, Y.; KANE, J.; KUJAN, J.; STADEL, J. M. TIPPER, D. J. Effects of expression of mammalian GeL and hybrid mammalian-yeast Ga proteins on the yeast pheromone response signal transduction pathway. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, n. 6, p. 2582-2590, 1990.

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.

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.; SANCHEZ, R. G.; 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, n. 5, 2007b.

KASAHARA T., KASAHARA M. Expression of the rat Glut1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J.**, v. 315, p. 177-182, 1996.

KASAHARA T., KASAHARA M. Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut1 glucose transporter. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1324, p. 111-119, 1997.

KASAHARA T., KASAHARA M. Interaction between the critical aromatic amino acid residues Tyr<sup>352</sup> and Phe<sup>504</sup> in the yeast *Gal2* transporter. **FEBS Lett.**, v. 471, p. 103-107, 2000b.

KASAHARA T., KASAHARA M. Three aromatic amino acid residues critical for galactose transport in yeast *Gal2* transporter. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 4422-4428, 2000a.

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

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

KASAHARA, T.; KASAHARA, M. Identification of a key residue determining substrate affinity in the yeast glucose transporter *HXT7* a two-dimensional comprehensive study. **JBC Papers in Press**, v. 285, n. 34, p. 26263-26268, 2010.

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.

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. Tech.**, v.43, p. 115-119, 2008.

KATAHIRA, S.; MIZUIKE, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and cellooligosaccharide-assimilating yeast strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 72, p. 1136-1143, 2006.

KHATTAB, S. M. R.; SAIMURA, M.; KODAKI, T. Boost in bioethanol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* with mutated strictly NADPH-dependent xylose reductase and NADP<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase. **J. Biotechnol.**, v. 165, p.153-156, 2013.

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

KIM S. R, HA S. J, WEI N, OH E. J, JIN Y. S. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. **Trends Biotechnol.** v. 30, n. 5, p.274-82, 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, 2013.

KODAMA, Y.; FUKUI, N.; ASHIKARI, T.; SHIBANO, Y.; MORIOKA-FUJIMOTO, K.; HIRAKI, Y.; NAKATANI, K. Improvement of maltose fermentation efficiency: constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeasts. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 53, p. 24-29, 1995.

KOPPRAM, R.; TOMAS-PEJO, E.; XIROS, C.; OLSSON, L. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspective. **Trends Biotechnol.**, v. 32, n. 1, p. 46-53, 2014.

KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, n. 5, p. 776-783, 1993.

KOTYK, A. How to name various transport mechanisms and their vehicles. **Biochem. Edu.**, v. 25, p. 86-87, 1997.

KRAHULEC, S.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B. Engineering of a matched pair of xylose reductase and xylitol dehydrogenase for xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. J.**, v. 4, p.684-694, 2009.

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.



KRAMPE, S.; BOLES, E. Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. **FEBS Lett.**, v. 513, p.193-196, 2002.

KRUCKEBERG, A. L. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Microbiol.**, v. 166, p. 283-293, 1996.

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.

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

KUYPER, M.; HARHANGI, H. R.; STAVE, A. K.; WINKLER, A. A.; JETTEN, M. S.; DE LAAT, W. T.; DEN RIDDER, J. J.; DEN, O. P.; CAMP, H. J.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, n. 1, p. 69-78, 2003.

KUYPER, M.; HARTOG, M. M.; TOIRKENS, M. J.; ALMERING, M. J.; 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. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 2, p. 221-228, 1986.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 104, p. 229-242, 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.

LARA, C. A.; SANTOS, R. O.; CADETE, R. M.; FERREIRA, C.; MARQUES, S.; GÍRIO, F.; OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; FONSECA, C. Identification and characterization of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. **Anton. Leew.**, v. 105, p. 1107-1119, 2014.

LATIMER, L. N.; LEE, M. E.; MEDINA-CLEGHORN, D.; KOHNZ, R. A.; NOMURA, D. K.; DUEBER, J. E. Employing a combinatorial expression approach to characterize xylose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabol. Engineerin.** v. 25, p. 20-29, 2014.

LAW, C. J.; MALONEY, P. C.; WANG, D. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 67, p.289-305, 2009.

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<sup>+</sup>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.

LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS Yeast Res.**, v.9, n. 4, p. 511-525, 2009.

LEE, S. M.; JELLISON, T.; ALPER, H. S. Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 16, p. 5708-5716, 2012.

LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSONM P.; TAHERZADEH, M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products **Bioresour. Technol.**, v. 165, p. 3-8, 2014.

LI, S.; DU, J.; SUN, J.; GALAZKA, J. M.; GLASS, N. L.; CATE, J. H.; YANG, X.; ZHAO, H. Overcoming glucose repression in mixed sugar fermentation by co-expressing a cellobiose transporter and a beta-glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biosyst.**, v. 6, n. 11, p. 2129-32, 2010.

LI, J.; LIN, L.; LI, H.; TIAN, C.; MA, Y. Transcriptional comparison of the filamentous fungus *Neurospora crassa* growing on three major monosaccharides D-glucose, D-xylose and L-arabinose. **Biotechnol. Biofuels**, v. 7, n. 31, p. 1-15, 2014.

LIAN, J.; LIL, Y.; HAMED, RAD, M. H.; ZHAO, H. Directed evolution of a cellodextrin transporter for improved biofuel production under anaerobic conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioengineer.**, v. 9999, p. 1-11, 2014.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 69, n. 6, p. 627-642, 2006.

LOBO, F. P.; GONÇALVES, D. L.; ALVES-JR, S. L.; GERBER, A. L.; 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.

LONG, T. M.;SU, Y.; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Cofermentation of glucose, xylose and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 78, n. 16, p. 5492-5500, 2012.

LONGTINE, M. S.; MCKENZIE, A.; DEMARINI, D. J.; SHAH, N. G.; WACH, A.; BRACHAT, A.; PHILIPPEN, P.; PRINGLE, J. R. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 953-961, 1998.

LUESCH, H. L.; WU, T. Y. H.; REN, P.;GRAY, N. S.; SCHULTZ, P.G.; SUPEK, F. A genome-wide overexpression screen in yeast for small-molecule target identification. **Chem. Biol.**, v.12, p. 55-63, 2005.

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.

MACRELLI, S.; GALBE, M.; WALLBERG, O. Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. **Biotechnol. Biofuels**, v. 7, p. 1-26, 2014.

MADEJ, G.; DANG, S.; YAN, N.; KABACK, H. R. Evolutionary mix-and-match with MFS transporters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.110, n. 15, p. 5870-5874, 2013.

MADHAVAN, A.; TAMALAMPUDI, S.; USHIDA, K.; KANAI, D.; KATAHIRA, S.; SRIVASTAVA, A.; FUKUDA, H.; BISARIA, V. S.; KONDO, A. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 82, n. 6, p. 1067-1078, 2009.

MAGUIRE, S. L.; ÓHÉIGEARTAIGH, 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.**, n. 30, n. 6, p. 1281–1291, 2013.

MAPA, 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/agroenergia/orientacoes-tecnicas>

MARTIN-GALIANO, A. J.; FRISHMAN, D. Defining the fold space of membrane proteins: the cAMPs Database. **Proteins**, v. 64, p. 906-922, 2006.

MATSUHIKA, 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, 2008.

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, 2008.

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. Techn.**, v. 48, p. 466-471, 2011.

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. Tech.**, v. 51, p. 16-25, 2012.

MATSUSHIKA, A.; GOSHIMA, T.; HOSHINO, T. Transcription analysis of recombinant industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals the molecular basis for fermentation of glucose and xylose. **Microb. Cell Fact.**, v. 13, n. 16, p.1-18, 2014.

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

MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; COQLEY, A. P.; LOPEZ, R. Analysis tool web services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, p.597-600, 2013.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. **Prog. Energ. Combust.**, v. 38, p. 522-550, 2012.

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

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

MOLLER, S.; CRONING, M. D. R.; APWEILER, R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. **Bioinformatics**, v. 17, p.7, p. 646-653, 2001.

MOON, J.; LIU, Z. L.; MA, M.; SLININGER, P. J. New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xilose transporters improve xylose utilization and ethanol production. **Biocatal. Agricult. Biotechnol.**, v. 2, p.247-254, 2013.

MORAIS, C. G.; CADETE, R. M.; UETANABARO, A. P. T.; ROSA, L. H.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal Genet. Biol.**, v. 60, p. 19-28, 2013.

MOUTTA, R. O.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BON, E. P. S. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse and straw mixtures pretreated with diluted acid. **Biocatal. Biotransfor.**, v. 32, p. 93-100, 2014.

NAIK, S.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v. 14, p. 578-597, 2010.

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.

NIGAM, J. N.; IRELAND, R. S.; MARGARITIS, A.; LACHANCE, M. A. Isolation and screening of yeasts that ferment D-xylose directly to ethanol. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 50, p.1486-1489, 1985.

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

NIJLAND, J. G.; SHIN, H. Y.; DE JONG, R. M.; DE WAAL, P. P.; KLASSEN, P.; DRIESSEN, A. J. Engineering of na endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2014.

NISHIZAWA, K.; SHIMODA, E.; KASAHARA, M. Substrate recognition domain of the *Gal2* galactose transporter in yeast *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by chimeric galactose-glucose transporters. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 2423-2426, 1995.

NOGUEIRA, L. A. H.; MOREIRA, J. R.; SCHUCHARDT, U.; GOLDEMBERG, J. The rationality of biofuels. **Energ. Police**, v. 61, p. 595-598, 2013.

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

PAPON, N.; COURDAVAUT, V.; CLASTRE, M. Biotechnological potential of the fungal CTG clade species in the synthetic biology era. **Trends Biotechnol.**, v.32, n. 4, 2014.

PARACHIN, N. S.; BERGDAHL, B.; VAN NIEL, E. W. J.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Kinetic modeling reveals current limitations in the production of ethanol from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metab. Eng.**, v. 13, p. 508-517, 2011.

PARACHIN, N. S.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Isolation of xylose isomerases by sequence- and function-based screening from a soil metagenomic library. **Biotechnol. Biofuels**, v. 4, n. 9, p. 1-10, 2011.

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

PETRACEK, M. E.; LONGTINE, M. S. PCR-based engineering of yeast genome. **Methods Enzymol.**, v. 350, p. 445-469, 2002.

PIGNAL, M. C. Une nouvelle espece de levure isolee de larves d'insectes: *Pichia stipitis*. **Bull. Mens. Soc. Limn. Lyon**, v.36, p.163-168, 1967.

POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066. **Yeast**, v. 5, p. 159-165, 1989a.

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.

RAMOS, J.; SZKUTINICKA, K.; CIRILLO, V. P. Relationship between low- and high-affinity glucose transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 5375-5377, 1988.

RAO, R. S.; JYOTH, I C. P.; PRAKASHAM, R. S.; SARMA, P. N.; RAO, L. V. Xylitol production from corn fiber and sugarcane hydrolysates by *Candida tropicalis*. **Bioresource Technol.**, v. 97, p. 1974–1978, 2006.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, **GOING GLOOBAL 2015 ETHANOL INDUSTRY OUTLOOK**, Edição 2015, 2015, 36 p.

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

REIJENGA, K. A.; SNOEP, J. L.; DIDERICH, J. A.; VAN VERSEVELD, H.; WESTERHOFF, H. V.; TEUSINK, B. Control of glycolytic dynamics by hexose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biophys J.**, v.80, p. 626-634, 2001.

RICHARD, P.; TOIVARI, M. H.; PENTTILÄ, M. Evidence that the gene YLR070c of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a xylylitol dehydrogenase. **FEBS Lett.**, v. 457, n 1, p. 135-138, 1999.

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

ROCA, C.; RODRIGUES DE SOUSA, H.; GONÇALVES, P.; SPENCER-MARTINS I. Regulation of fructose symport activity in chemostat cultures of *Saccharomyces bayanus* and *S. pastorianus*. In: **Eleventh International Congress on Yeasts (ICY2004)**, Rio de Janeiro, Book of Abstracts, p. 85, 2004b.

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

ROSSELL, S.; VAN DER WEIJDEN, C. C.; KRUCKEBERG, A. L.; BAKKER, B. M.; WESTERHOFF, H. V. Loss of fermentative capacity in baker's yeast can partly be explained by reduced glucose uptake capacity. **Mol. Biol. Rep.**, v. 29, p. 255-257, 2002.

RUNQUIST, D.; FONSECA, C.; RADSTROM, P.; SPENCER-MARTINS, I.; HAHN- HÄGERDAL, B. Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 82, p. 123-130, 2009.

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

RYABOVA, O.B.; CHMIL, O.M.; SIBIRNY, A. A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermo tolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **FEMS Yeast Research**, v.4, p. 157-164, 2003.

SAIER, M. H. Jr. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**,v. 64, p. 354-411, 2000.

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, n. 5, p. 1041-1052, 2007.

SALUSJÄRVI, .; KAUNISTO, S.; HOLMSTRÖM, S.; VEHKOMÄKI, M. L.; KOIVURANTA, K.; PITKÄNEN, J. P.; RUOHONEN, L. Overexpression of NADH-dependent fumarate reductase improves d-xylose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p.1383-1392, 2013.

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

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

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.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renew. Energ.**, v. 37, p. 19-23, 2011.

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.

SHAMANNA, D. K.; SANDERSON, K. Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. **J. Bacteriol.** v. 139, p. 64-70, 1979.

SHI, N. Q.; JEFFRIES, T. W. Anaerobic growth and improved fermentation of *Pichia stipitis* bearing a *URA1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, p. 339-345, 1998.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D. G.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol. Syst. Biol.**, v. 7, n. 539, p. 1-6, 2011.

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.

SILVA, A. S.; TEIXEIRA, R. S. S.; OLIVEIRA, R.; SANTANA, V.; BARROS, R. R. O.; ANTONIETA, M.; BON, E. P. Sugarcane and woody biomass pretreatments for ethanol production. In: Dr. Anuj K. Chandel; Prof. Dr. Silvio Silverio da Silva. (Org.). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. 1ed.: In Tech. p. 47-88, 2013.



- SILVA, R.; HARAGUCHI, S. H.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Quim. Nova.** v. 32, n. 3, p.661-671, 2009.
- SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; LOMON, J. M.; BOTHAST, R. J.; LADISCH, M. R.; OKOS, M. R. Evaluation of a Kinetic Model for Computer Simulation of Growth and Fermentation by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* Fed D-Xylose. **Biotechnol. Bioengin.**, v. 9999, 2014.
- 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
- SMIT, A.; CORDERO-OTERO, R. R.; PRETORIUS, I. S. Differences among *AGT1*-encoded  $\alpha$ -glucoside transporters and their ability to transport maltotriose in *Saccharomyces* yeasts. **Ann. Microbiol.**, v. 57, p. 77-84, 2007.
- SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; COSTA, B.; WOICEICHOWSK, A.L.; CARVALHO, J.C.; MEDEIROS, A.B.P.; FRANCISCO, A.M.; BONOMI, L.J. Brazilian biofuel program: an overview. **J. Sci. Ind. Res.**, v. 64, p. 897-904, 2005.
- SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M. S.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRAR, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.
- STAMBUK, B. U.; FRANDEN, M. A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 105, n. 108, p. 255-263, 2003.
- STAMBUK, B. U.; ALVES, S. L. JR.; HOLLATZ, C.; ZASTROW, C. R. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 43, p. 370-376, 2006.
- STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BOM, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **J. Sci. Ind. Res.**, v. 67, p. 918-926, 2008.
- SUBTIL, T.; BOLES, E. Improving L-arabinose utilization of pentose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells by heterologous expression of L-arabinose transporting sugar transporters. **Biotechnol. Biofuels**, v.4, n. 38, p. 1-10, 2011.

SUBTIL, T.; BOLES, E. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Biofuels.**, v.5, n. 14, 2012.

SUH, S.; MARSHALL, C. J.; MCHUGH, J. V.; BLACKWELL, M. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. **Mol. Ecol.**, v. 12, p. 3137-3145, 2003.

SUN, L.; ZENG, X.; YAN, C.; SUN, X.; GONG, X.; RAO, Y.; YAN, N. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters Glut1-4. **Nature**, v. 490, n. 7420, p. 361-366, 2012.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 83, p. 1-11, 2002.

TANINO, T.; HOTTA, A.; ITO, T.; ISHII, J.; YAMADA, R.; HASUNUMA, T.; OGINO, C.; OHMURA, N.; OHSHIMA, T.; KONDO, A. Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 88, p. 1215-1221, 2010.

TANINO, T.; ITO, T.; OGINO, C.; OHMURA, N.; OHSHIMA, T.; KONDO, A. Sugar consumption and ethanol fermentation by transporter-overexpressed xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* harboring a xylose isomerase pathway. **J. Biosci. Bioengine.**, v. 114, n. 2, p 209-211, 2012.

TANTIRUNGKIJ, M.; NAKASHIMA, N.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 75, n. 2, p. 83-88, 1993.

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

TEUSINK, B.; WALSH, M. C.; VAN DAM, K.; WESTERHOFF, H. V. The danger of metabolic pathways with turbo design. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, n. 5, p. 162-169, 1998.

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

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

TOMÁS-PEJÓ, E.; OLIVA, J. M.; BALLESTEROS, M.; OLSSON, L. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnol. Bioengin.**, v. 100, n. 6, p. 1122-1131, 2008.

TOQUERO, C; BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresour. Technol.**, v. 157, p. 68-76, 2014

TRÄFF, K. L.; JÖNSSON, L. J.; HAHN-HÄGERDAL, B. Putative xylose and arabinose reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 1233-1241, 2002.

TRUMBLY, R. J. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v. 6, n. 1, p.15-21, 1992.

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

UNICA, 2015. Disponível em <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4&acao=visualizar&idTabela=1610&safra=2013%2F2014&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR>

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

VARDY, E.; ARKIN, I. T.; GOTTSCHALK, K. E.; KABACK, H. R.; SCHULDINER, S. Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative modeling. **Protein Sci.** v. 13, p. 1832-1840, 2004.

VIDGREN, V.; HUUSKONEN, A.; VIRTANEN, H.; RUOHONEN, L.; LONDESBOROUGH, J. Improved fermentation performance of a lager yeast after its *AGT1* maltose and maltotriose transporter genes. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 75, p. 2333-2345, 2009.

VIIKARI, L.; VEHEMAANPERÄ, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: from science to industry. **Biomass Bioenerg.** v. 46, p. 13-24, 2012.

WALFRIDSSON, M.; ANDELUND, 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.; BULOW, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophiles* XYL A gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.12, p.4648-4651, 1996.

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

WEI, N.; XU, H.; KIM, S. R.; JIN, Y. S. Deletion of *FPS1*, encoding aquaglyceroporin Fps1p, improves xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, n. 10, p. 3193-3201, 2013.

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

WESTERGAARD, S. L.; OLIVEIRA, A. P.; BRO, C.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. A system biology approach to study glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 96, n. 1, p. 134-145, 2007.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIN, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnol.**, v. 17, p.482-487, 1999.

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.

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

WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, p. 1109-1117, 2003.

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

XIE, X.; WILKINSON, H. H.; CORREA, A.; LEWIS, Z. A.; BELL-PEDERSEN, D.; EBBOLE, D. J. Transcriptional response to glucose starvation and functional

analysis of a glucose transporter of *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Biol.** v.41, p. 1104-1119, 2004.

XIONG, M.; CHEN, G.; BARFORD, J. Alteration of xylose reductase coenzyme preference to improve ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* from high xylose concentrations. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 9206-9215, 2011.

YABLOCHKOVA, E. N.; BOLOTNIKOVA, O. I.; MIKHAILOVA, N. P.; GINAK, A. I. Specific features of fermentation of D-xylose and D-Glucose by xylose-assimilating yeasts. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 39, p. 302-306, 2003.

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.

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

YOUNG, E.; TONG, A.; BUJ, H.; SPOFFORD, C.; ALPER, H. S. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 111, n. 14, p. 131-136, 2014.

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

ZHA, J.; HU, M. L.; SHEN, M. H.; LI, B. Z.; WANG, J. Y.; YUAN, Y. J. Balance of *XYL1* and *XYL2* expression in different yeast chassis for improved xylose fermentation. **Front Microbiol.**, v. 3, n. 355, p. 1-10, 2012.

ZHA, J.; SHEN, M.; HU, M.; SONG, H.; YUAN, Y. Enhanced expression of genes involved in initial xylose metabolism and the oxidative pentose phosphate pathway in the improved xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 41, p. 27-39, 2014.

ZUO, Q.; ZHAO, X. Q.; XIONG, L.; LIU, H. J.; XU, Y. H.; HU, S. Y.; MA, Z. Y.; ZHU, Q. W.; BAI, F. W. Fine-tuning of xylose metabolism in genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* by scattered integration of xylose assimilation genes. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 440, p. 241-244, 2013.