

Adriane Mouro

**FERMENTAÇÃO DE XILOSE E CELOBIOSE POR
LEVEDURAS ISOLADAS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina, visando a obtenção do grau
de Mestre em Biotecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Boris U.
Stambuk

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

M981f Mouro, Adriane

Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira [dissertação] / Adriane Mouro ; orientador, Boris U. Stambuk. - Florianópolis, SC, 2012.
73 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Levedos. 3. Açúcar - Transporte. 4. Alcool. I. Stambuk, Boris Juan Carlos Ugarte. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 577.23


**"Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da
biodiversidade brasileira"**

POR

ADRIANE MOURO

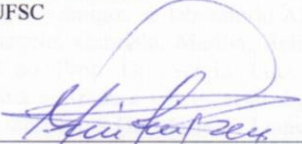
**Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientadores e
membros da Comissão Examinadora.**

Orientador:

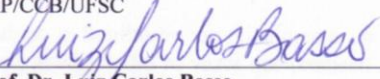


Prof. Dr. Bóris J. U. Stambuk
BQA/CCB/UFSC

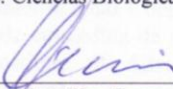
Comissão Examinadora:




Prof. Dr. Márcio José Rossi
MIP/CCB/UFSC



Prof. Dr. Luiz Carlos Basso
Depto. Ciências Biológicas/USP



Prof. Dr. Angélica Francesca Maris
BEG/CCB/UFSC



Prof. Dr. Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/UFSC
Florianópolis, Março de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof Dr.Boris, pela sua orientação, apoio, dedicação e pelos seus conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho, e sobretudo, pela oportunidade concedida a mim de fazer parte do seu grupo de trabalho.

À secretária Joice, pelo apoio prestado e aos professores, pelos seus ensinamentos, do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Alice, Catarina, Davi, Débora, Augusto, Marcelo, Gabriela, Marília, Belisa, Vitor, Vinicius, Ana e em especial ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Alves Junior que contribuíram com a sua amizade e colaboração dentro do laboratório. Agradeço muitíssimo também, à Dr^a Maria de Lourdes Magalhães, pela sua colaboração nos experimentos e ensinamentos.

Aos meus amigos e familiares, principalmente ao meu esposo Sérgio que me apoiou e ajudou todas as vezes que precisei.

À JICA (Japan International Cooperation Agency), pelo suporte financeiro e oportunidade concedida de realizar parte do meu mestrado no AIST (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology – Hiroshima, Japão)

Ao REUNI (CAPES), CNPq e FAPESC, pelo apoio financeiro, durante estes dois anos de mestrado.

RESUMO

A produção de álcool combustível tem adquirido importância nos últimos anos devido ao futuro esgotamento das reservas de combustíveis fósseis, ao impacto ambiental pela emissão de poluentes que estes combustíveis apresentam, além da necessidade de uma fonte de energia renovável. Uma atrativa fonte de matéria prima para a obtenção de etanol é a biomassa lignocelulósica, composta de lignina, celulose e hemicelulose. No caso do Brasil o bagaço da cana de açúcar constitui uma interessante fonte de celulose e hemicelulose, polímeros que podem ser utilizados nos processos fermentativos para a produção de álcool combustível. Embora a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* fermente eficientemente hexoses, essa levedura é incapaz de fermentar com eficiência pentoses como a xilose (presente nos hidrolisados de hemicelulose) ou o dissacarídeo celobiose (presente nos hidrolisados de celulose). Desta forma, no presente trabalho analisamos a fermentação de xilose e celobiose por várias leveduras de madeira em decomposição isoladas da biodiversidade Brasileira. Nossos resultados mostraram vários padrões de fermentação de xilose e glicose pelas leveduras, sendo que linhagens do clado *Spathaspora*, particularmente *S. passalidarum*, fermentam eficientemente a xilose. A análise das enzimas envolvidas na fermentação de xilose (xilose redutase, xilitol desidrogenase e xiluloquinase) revelou que *S. passalidarum* não só possui alta atividade destas enzimas, mas sua xilose redutase apresentou atividade não só com NADPH, mas também com o cofator NADH. A análise de outra espécie fermentadora de xilose, *S. arborariae*, revelou a presença de um sistema de cotransporte H^+ -xilose de baixa afinidade e alta capacidade. Uma nova espécie de levedura, *Candida queroiziae*, mostrou-se também boa fermentadora de celobiose graças a um sistema de cotransporte H^+ -celobiose de alta afinidade, e uma enzima β -glicosidase intracelular. As leveduras fermentadoras de xilose e celobiose caracterizadas no presente trabalho poderão ser uma interessante fonte de novas enzimas e/ou transportadores (e seus respectivos genes), com características mais apropriadas para a metabolização destes açúcares, que poderão ser expressos nas leveduras industriais visando a otimização da produção de bioetanol.

Palavras-chave: xilose, celobiose, leveduras, transporte de açúcares, bioetanol

ABSTRACT

The production of fuel alcohol has become important in recent years due to the future depletion of fossil fuels stocks, the environmental impact of pollutant emissions that these fuels have, besides the necessity for a renewable energy source. An attractive source of raw material for ethanol production is the lignocellulosic biomass, composed of lignin, cellulose and hemicellulose. In the case of Brazil the sugarcane bagasse is an interesting source of cellulose and hemicellulose, polymers that can be used in the fermentative process for fuel alcohol production. Although the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* efficiently ferments hexoses, this yeast is unable to efficiently ferment pentoses such as xylose (present in hemicellulose hydrolysates) or the disaccharide cellobiose (present in cellulose hydrolysates). Thus, in this work we analyzed the fermentation of xylose and cellobiose by several yeasts of rotten wood isolated from the Brazilian biodiversity. Our results showed several patterns of xylose and glucose fermentation by the yeasts, and strains from the *Spathaspora* clade, particularly *S. passalidarum*, ferment xylose efficiently. Analysis of the enzymes involved in xylose fermentation (xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylulokinase) revealed that *S. passalidarum* had not only high activity of these enzymes, but its xylose reductase has significant activity not only with NADPH, but also with the NADH cofactor. Analysis of another xylose fermenting yeast, *S. arborariae*, revealed the presence of a H⁺-xylose cotransport system with low affinity and high capacity. A new species of yeast, *Candida queiroziae*, also showed to be good cellobiose fermenting thanks to a high affinity H⁺-cellobiose cotransport system, and an intracellular β-glucosidase enzyme. The xylose and cellobiose fermenting yeasts characterized in this work may constitute an interesting source of enzymes and/or transporters (and their corresponding genes), with more appropriate characteristics for the metabolism of these sugars, that may be expressed in industrial yeasts aimed at optimizing bioethanol production.

Keywords: xylose, cellobiose, yeasts, sugar transport, bioethanol..

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fermentação de xilose por leveduras.....	17
Figura 2 – Reação acoplada para determinação da xiluloquinase.....	31
Figura 3 – Mudanças de pH provocadas pelo co-transporte de H ⁺ -açúcar em leveduras.....	33
Figura 4 – Cinética de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol por leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira.....	36
Figura 5 – Rendimento fermentativo em xilose e glicose das leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira.....	37
Figura 6 – Atividade da enzima xilose redutase nas leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira.....	38
Figura 7 – Atividade da enzima xilitol desidrogenase nas leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira.....	39
Figura 8 – Atividade da enzima xiluloquinase nas leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira.....	40
Figura 9 – Determinação do pH ótimo das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase na levedura <i>S. passalidarum</i> HMD16.1.....	42
Figura 10 – Determinação do pH ótimo das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase na levedura <i>S. arborariae</i> HM19.1a.....	43
Figura 11 – Análise cinética das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase na levedura <i>S. passalidarum</i> HMD16.1.....	44
Figura 12 – Análise cinética das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase na levedura <i>S. arborariae</i> HM19.1a.....	45
Figura 13 – Cinética de cotransporte H ⁺ -açúcar pela levedura <i>S. arborariae</i> HM19.1a crescida em glicose.....	48
Figura 14 – Cinética de co-transporte H ⁺ -açúcar pela levedura <i>S. arborariae</i> HM19.1a crescida em xilose.....	49
Figura 15 – Cinética de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol por <i>C. queiroziae</i>	50
Figura 16 – Fermentação em batelada de glicose ou celobiose por <i>C. queiroziae</i>	51
Figura 17 – Atividade β-glicosidase na levedura <i>C. queiroziae</i> CLM5.1.....	52
Figura 18 – Determinação do pH ótimo da enzima β-glicosidase na levedura <i>C. queiroziae</i> CLM5.1.....	53
Figura 19 – Análise cinética da atividade β-glicosidase em <i>C. queiroziae</i> CLM5.1.....	54
Figura 20 – Cinética de transporte de pNPβG e pNPβC pela levedura <i>C. queiroziae</i> CLM5.1.....	55
Figura 21 – Cinética de co-transporte H ⁺ -açúcar pela levedura <i>C. queiroziae</i> CLM5.1 crescida em celobiose.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagem de leveduras analisadas.....	25
--	----

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 O ÁLCOOL COMBUSTÍVEL E A BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	13
1.2 LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE E CELOBIOSE	15
1.3 TRANSPORTE E METABOLIZAÇÃO DE XILOSE	16
1.4 TRANSPORTE E METABOLIZAÇÃO DE CELOBIOSE	22
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 LEVEDURAS ANALISADAS.....	25
3.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	27
3.3 FERMENTAÇÃO EM BATELADA COM ALTAS DENSIDADES CELULARES.....	27
3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LEVEDURAS..	27
3.5 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES	28
3.6 DETERMINAÇÃO DE ETANOL.....	28
3.7 DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS	29
3.7.1 Determinação da xilose redutase	30
3.7.2 Determinação da xilitol desidrogenase	30
3.7.3 Determinação da xiluloquinase	31
3.7.4 Determinação da β-glicosidase	31
3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSPORTE	32
3.8.1 Determinação do co-transporte H⁺-açúcar	32
3.8.2 Determinação colorimétrica da atividade de transporte utilizando substratos sintéticos	34
4 RESULTADOS	35
4.1 FERMENTAÇÃO DE XILOSE POR LEVEDURAS	35
4.2 FERMENTAÇÃO DE CELOBIOSE POR LEVEDURAS	50
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
APÊNDICE	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ÁLCOOL COMBUSTÍVEL E A BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O futuro esgotamento das reservas de combustíveis fósseis não renováveis no mundo, o aumento do preço do petróleo e seu impacto negativo no meio ambiente, tem estimulado a necessidade de desenvolver uma alternativa de combustível renovável para a sociedade. A produção de álcool combustível no Brasil e no mundo tem se tornado de fundamental importância no cenário socioeconômico e ambiental, e muitos avanços tecnológicos nesse setor tem surgido com a finalidade de se obter um combustível ambientalmente correto e competitivo com a gasolina (Goldemberg, 2007; 2008; Carioca, 2010).

O Brasil produz anualmente 5×10^9 galões de etanol a partir da cana de açúcar crescida em ~5 milhões de hectares, e processada por 365 unidades produtoras de açúcar e/ou etanol, sendo previsto que 86 novas destilarias serão construídas até 2015. O suco da cana de açúcar pode ser diretamente fermentado para a produção de etanol, ou ser usado na produção de açúcar, dependendo de qual produto apresenta preço mais favorável. Como consequência, milhares de toneladas de bagaço são produzidos anualmente no Brasil, e embora parte deste bagaço seja utilizado na geração de energia e eletricidade para a própria usina, grande parte dele acaba não sendo utilizado (Stambuk et al., 2008). De fato, a cada ano mais de 40 milhões de toneladas de material vegetal não comestível, incluindo palhas de milho e trigo, restos de madeira, etc. são produzidos e geralmente descartados no ambiente. A transformação desses resíduos agrícolas que não serão utilizados para a produção de etanol de segunda geração, tem se mostrado bastante atrativa (Sanderson, 2011). Ao considerar o balanço de massa da cana de açúcar, estima-se que a lignocelulose poderia gerar 50% de etanol a mais em relação a produção atualmente obtida de álcool combustível (Stambuk et al., 2008).

A biomassa lignocelulósica é o maior componente estrutural de plantas lenhosas e não lenhosas, e representa a maior fonte de matéria orgânica renovável. As propriedades químicas dos componentes dessa biomassa fazem dela um substrato de grande valor biotecnológico, e enormes quantidades de resíduos de lignocelulose são gerados através de práticas florestais e de agricultura, indústrias de papéis, madeira e muitas outras agro-indústrias (Howard et al. 2003). A lignocelulose consiste de três principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose, o maior constituinte das plantas e a mais abundante

molécula do planeta, é um polímero linear de glicose, conectadas por ligações β -1,4-glicosídicas. A hemicelulose, o segundo maior componente da biomassa lignocelulósica, é um polímero heterogêneo de pentoses (incluindo xilose e arabinose) e hexoses (principalmente manoses e pouca glicose e galactose). A composição da hemicelulose é muito variável na natureza e depende da planta analisada. A lignina, o terceiro maior polímero heterogêneo da lignocelulose, contém três álcoois aromáticos e atua como uma barreira física por ligar-se tanto a hemicelulose quanto a celulose (Anderson & Akin, 2008; Dashtban et al., 2009)

A biomassa presente no bagaço da cana, herbáceos e madeira em geral consiste de 40-55% de celulose, 25-50% de hemicelulose e 19-40% de lignina. Enquanto a celulose e hemicelulose podem ser usadas em larga escala para a obtenção de biocombustíveis, a lignina pode ser usada em outros processos biotecnológicos, ou até ser queimada para a produção de calor e eletricidade. A hidrólise da biomassa lignocelulósica geralmente envolve um pré-tratamento (mecânico, térmico e/ou químico), onde a estrutura da biomassa é afrouxada de forma a liberar as longas cadeias de polissacarídeos, e a hidrólise subsequente destes polissacarídeos por métodos químicos ou enzimáticos, sendo estes últimos os preferidos por não produzirem compostos tóxicos que inibem a fermentação, evitam corrosão de equipamentos, além de não exigirem uma posterior etapa de neutralização (Galbe & Zacchi, 2007; Kumar et al., 2008; Dashtban et al., 2009; Stambuk et al. 2008).

Ao considerar a hidrólise enzimática, a celulose é degradada pela ação sinérgica de três enzimas do complexo celulase: as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glicosidases. As endoglucanases iniciam um ataque randômico em múltiplos locais internos de regiões amorfas da fibra celulósica, produzindo celodextrinas e portanto abrindo locais para o subsequente ataque pelas celobiohidrolases. Estas enzimas, também chamadas de exoglucanases, são o maior componente do sistema de celulasas fúngicas e podem também eventualmente hidrolisar estruturas cristalinas. As celobiohidrolases removem mono (glicose) e dímeros (celobiose) do final da cadeia de celulose e celodextrinas. Geralmente, as endoglucanases e celobiohidrolases trabalham sinérgicamente na hidrólise da celulose, mas são fortemente inibidas pelos produtos de degradação, glicose e celobiose (Howard et al., 2003; Bezerra & Dias, 2005). As β -glicosidases, por sua vez, quebram a celobiose gerando glicose, porém também são inibidas pelo seu produto (Bansal et al., 2009). Enquanto as duas primeiras enzimas são encontradas em fungos

celulolíticos, a β -glicosidase também pode ser encontrada em leveduras.

Diferentes enzimas são necessárias para hidrolisar as hemiceluloses, devido a sua heterogeneidade. A xilana é o componente mais abundante da hemicelulose, contribuindo para mais de 70% da sua estrutura. Xilanases são capazes de hidrolisar ligações β -1,4 das xilanas e produzir oligômeros menores, os quais poderão ser hidrolizados a xilose pelas β -xylosidases (Dashtban et al., 2009) A levedura *Scheffersomyces stipitis* (antigamente denominada *Pichia stipitis*) possui atividade β -xilanases, além de outras enzimas que atuam em xilanas, e foram identificadas através de sequenciamento do seu genoma (revisto por Jeffries et al., 2009)

1.2 LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE E CELOBIOSE

Para produzir etanol a partir da matéria lignocelulósica economicamente, é essencial ter um biocatalisador capaz de fermentar hexoses e pentoses sob as condições adversas do ambiente industrial. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada com sucesso na produção industrial de etanol a partir da cana de açúcar e melão no Brasil, é capaz de fermentar hexoses rápida e eficientemente, exibe alta tolerância ao etanol, e tolerância a inibidores e ao baixo pH encontrado nos tanques de fermentação. Entretanto, *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar celobiose e pentoses como a xilose, que estão presentes em grandes quantidades em hidrolisados da biomassa lignocelulósica (Stambuk et al., 2008).

A habilidade de leveduras em fermentar xilose tem sido descrita desde os anos 80. Em 1983, du Preez e colaboradores descreveram *Candida shehatae* como uma levedura fermentadora de xilose. Os organismos mais estudados tem sido *Pachysolen tannophilus*, *C. shehatae* e *Scheffersomyces stipitis*. A *C. shehatae* mostra considerável similaridade fenotípica com a *S. stipitis* (Jeffries et al., 1994). Numerosas comparações têm sido feitas entre as leveduras fermentadoras de xilose, e a *C. shehatae* é uma das mais bem caracterizada, sendo capaz de metabolizar xilose quase tão bem quanto glicose, produzindo relativamente pouco xilitol, e parece ter alta tolerância ao etanol (Jeffries and Alexander, 1990). Foram descritas duas espécies novas de leveduras fermentadoras de xilose: *Spathaspora passalidarum*, uma levedura isolada do intestino de besouros presentes em madeira (Nguyen, et al. 2006) e *Spathaspora arborariae*, uma levedura isolada a partir de madeira em decomposição em duas diferentes localidades do Brasil (Cadete et al., 2009). Recentemente foi demonstrado que a levedura fermentadora de xilose *S. arborariae*

também é tolerante a inibidores decorrentes do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, como o furfural e hidroximetilfurfural (da Cunha-Pereira et al., 2011).

Em relação as leveduras fermentadoras de celobiose *Candida wickerhamii* foi a primeira levedura estudada capaz de fermentar celobiose e celodextrinas solúveis até etanol. Dados de outra levedura capaz de fermentar celodextrinas, *Candida molichiana*, tem sido também relatados. Por outro lado *Candida guilliermondii* metaboliza aerobicamente, mas não fermenta, celodextrinas solúveis. Em todas essas três leveduras, a habilidade em metabolizar celodextrinas parece estar correlacionada com a biossíntese de uma β -glicosidade periplasmática ou secretada pelas células (Freer et al., 1993). Suh e Blackwell (2004) mostraram que novas cepas de leveduras do clado *Pichia guilliermondii* encontradas no trato digestivo de besouros, foram também capazes de fermentar celobiose. E *S. stiptis*, apesar de ser considerada uma levedura fermentadora de xilose, possui também a capacidade de fermentar celobiose (revisto por Jeffries et al., 2009; Hahn-Hägerdal et al., 1994).

Além das espécies de levedura do grupo da *Candida*, recentemente leveduras dos gêneros *Hansenula* e *Clavispora* foram identificadas como fermentadoras de celobiose (Ryabova et al., 2003; Liu et al. 2012). Foi mostrado que a levedura *Clavispora* sp. possui atividade β -glicosidase, além de exibir tolerância a inibidores decorrentes do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, como furfural e hidroximetilfurfural (Liu et al. 2012). Novas espécies de leveduras Brasileiras isoladas de madeira em decomposição e fermentadoras de xilose e/ou celobiose vêm sendo identificadas. Inclusive, Wohlbach et al. (2011) mostraram que leveduras isoladas deste ambiente apresentam expressão de genes envolvidos na degradação da biomassa celulósica, quando induzidos por xilose.

1.3 TRANSPORTE E METABOLIZAÇÃO DE XILOSE

As leveduras fermentadoras de xilose permitiram estudar e caracterizar as enzimas e genes necessários à metabolização deste açúcar. Em leveduras, fungos filamentosos e outros eucariontes, a metabolização da xilose procede através de dois passos de redução e oxidação (Figura 1), os quais são mediados pela xilose redutase (XR) e xylitol desidrogenase (XDH), transformando a xilose em xilitol e posteriormente em xilulose. Assim a xilose entra para a via da pentose fosfato (PPP) através da xilulose, que pela xiluloquinase (XK) é fosforilada a xilulose-5P. A PPP é considerada como tendo duas fases.

A fase oxidativa converte a hexose, glicose-6P, para a pentose ribulose-5P, mais CO_2 e NADPH. A fase não oxidativa converte ribulose-5P em ribose-5P, xilulose-5P, sedoheptulose 7P e eritrose 4P, que finalmente através da frutose-6P e gliceraldeído-3P, retornam os carbonos para a glicólise, permitindo a posterior fermentação do açúcar.

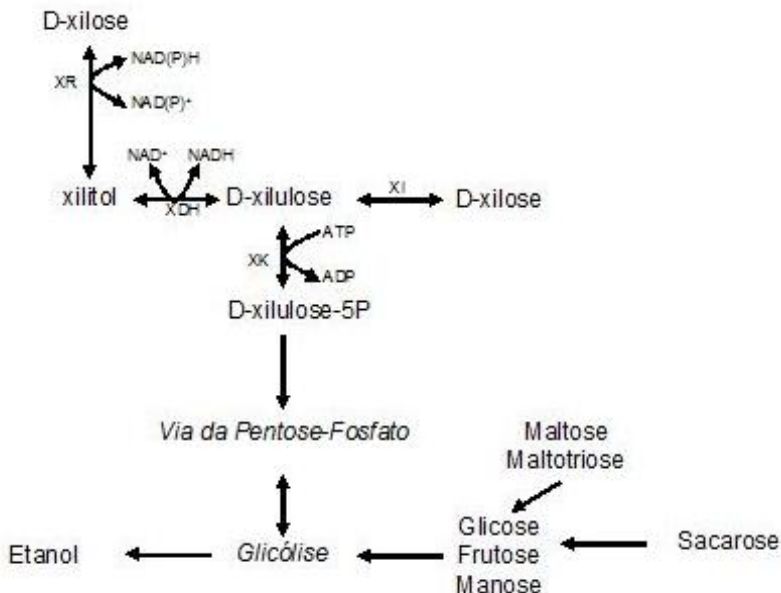


Figura 1 – Fermentação de xilose por leveduras. O esquema mostra as duas possíveis vias pelas quais a xilose pode ser convertida a xilulose, e assim poder ser fermentada pelas células.

A enzima xilose redutase de algumas leveduras exibe uma estrita dependência pelo cofator NADPH, liberando NADP^+ , enquanto outras podem ter atividade tanto com NADPH como de NADH, liberando tanto NADP^+ como NAD^+ , respectivamente (Jeffries & Alexander, 1990; revisto por Lee, 1998). Em seguida, a enzima xilitol desidrogenase, utiliza como cofator estritamente NAD^+ , liberando NADH. Esta estrita especificidade da enzima xilitol desidrogenase, é um fator limitante na fermentação da xilose, pois causa um desbalanço de cofatores, resultando em um acúmulo de xilitol (Rizzi, et al, 1988).

Sob condições anaeróbicas, as diferentes coenzimas utilizadas pela xilose redutase e xilitol desidrogenase causam um desbalanço de cofatores ainda maior, que resulta em um acúmulo considerável de

xilitol como bioproduto, pois enquanto NADP^+ pode ser reduzido via frutose-6-fosfato, o NADH não pode ser oxidado na ausência de oxigênio, reduzindo a produção de etanol e aumentando a produção de xilitol. Para contornar este problema, acaba sendo necessário um ambiente em condições limitadas de oxigênio, inviabilizando seu uso em fermentações industriais de grande porte. Ou então, se aceptores de elétrons (como a acetoína) forem adicionados, a produção de xilitol pode ser diminuída. O uso da enzima xilose redutase, que tenha atividade com ambos os cofatores (NADPH ou NADH), também pode aliviar o desbalanço de cofatores e permitir a produção de etanol em condições anaeróbicas (Jeffries, 2006; Hahn-Hägerdal et al. 1994).

A enzima xilose redutase codificada pelo gene *XYLI* da levedura *Candida parapsilosis* é a primeira xilose redutase relatada com preferência pelo NADH (Lee et al., 2003), que carrega uma arginina no lugar da lisina no motivo Ile-Pro-Lys-Ser, que é conservada entre as xiloses redutases dependentes de NADPH (Lee, 1998). Bengtsson et al. (2009) mostrou que por técnica de mutagênese sítio dirigida, a substituição da lisina pela arginina no mutante K270R da xilose redutase da *S. stiptis*, mimetizando a xilose redutase da levedura *C. parapsilosis*, proporcionou uma maior utilização do cofator NADH , comparada com a enzima normal de *S. stiptis*, acarretando em mais NAD^+ disponível para a reação da xilitol desidrogenase, e com isso maior consumo de xilose e maior produção de etanol, além de menor produção de glicerol.

Recentemente, Hou (2012) mostrou que a levedura *S. passalidarum* foi capaz de converter xilose a etanol, em condições anaeróbicas, com muito mais eficiência que a *S. stiptis* (acima de 90% da produção máxima teórica), e com menor produção de xilitol. Esta levedura também foi capaz, em condições aeróbicas, de consumir simultaneamente xilose e glicose, além de exibir uma xilose redutase com afinidade maior para NADH . Os resultados sugerem que leveduras *Spathaspora*, especialmente a *S. passalidarum*, podem ser promissoras candidatas a fermentação industrial de hidrolisados lignocelulósicos.

Da mesma forma que xilose redutases dependentes de NADH , o uso de xilitol desidrogenases mutantes (obtidas por mutagênese sítio dirigida) dependentes de NADP^+ também melhora a fermentação de xilose por leveduras, produzindo menos xilitol (Watanabe et al., 2007; Matsushika et al., 2008a; 2008b; 2009a).

A enzima xiluloquinase que converte a xilulose à xilulose-5-fosfato, exibe uma massa molecular de aproximadamente 120-130 kDa, com duas subunidades idênticas, possui alta especificidade para xilulose, com temperatura ótima de 30°C e pH ótimo por volta do pH

7,2-7,8 (Flanagan & Waites, 1992). Esses dados, obtidos com a xiluloquinase da levedura *S. stiptis*, mostram pouca variação em relação a outros gêneros/espécies, o que confere um perfil bioquímico muito semelhante às outras leveduras fermentadoras de xilose.

Em uma segunda via metabólica (vide Figura 1), a xilose pode ser isomerizada diretamente a xilulose, reação catalisada pela enzima xilose isomerase (XI). Esta via, que não produz xilitol, é funcional na maioria dos procariotos (ex. *Escherichia coli*, *Streptomyces* sp), em alguns fungos (ex. *Piromyces*), e nas plantas (*Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana*), mas até o presente não foi descrita em leveduras (Madhavan et al., 2009). Embora seja uma via promissora, a atividade da xilose isomerase e a produtividade de etanol são muito baixas em leveduras que receberam esse gene (Brat et al., 2009, Tanino et al., 2010). Apesar de que algumas destas xiloses isomerases já foram expressas sem sucesso em *S. cerevisiae*, a sua expressão não deixa de ser uma alternativa interessante, o que evitaria qualquer desbalanço de cofatores e/ou necessidade de oxigênio (Madhavan et al., 2009). Uma alternativa seria encontrar uma xilose isomerase produzida por uma levedura, o que não tem sido descrito até a presente data.

As leveduras fermentadoras de xilose, entretanto, não demonstram o mesmo desempenho fermentativo do que a levedura *S. cerevisiae* em condições industriais, pois a utilização em larga escala dessas leveduras é dificultada pela sua baixa tolerância ao etanol, ao baixo pH e aos inibidores de hidrolisados, exigindo condições microaerófilas (revisto por Stambuk et al. 2008). Enquanto *S. cerevisiae* naturalmente é capaz de fermentar xilulose, e possui genes para a utilização de xilose, estes são expressos em baixos níveis, não suportando o crescimento em xilose (Hahn-Hagerdal et al. 2007).

Através de engenharia genética, a via de utilização de xilose inserindo genes que codificam a xilose redutase (*XYL1*) e xilitol desidrogenase (*XYL2*) de *S. stiptis*, e aumentando a expressão da xiluloquinase endógena codificada pelo gene *XKS1*, além do incremento na expressão de enzimas da via da pentose fosfato (Kotter et al., 1993; Metzger & Hollenberg, 1994; Walfridsson et al., 1995), permitiu desenvolver leveduras de *S. cerevisiae* capazes de fermentar esta pentose (Matsushika et al., 2009a; Xiong, 2011; Eliasson et al., 2000; Toivari et al., 2001).

Como qualquer outro açúcar, a captação de pentoses pelas células exige proteínas transportadoras de membrana, e este é considerado um fator limitante para a fermentação das pentoses de maneira geral. Nas leveduras utilizadoras de xilose o transporte de xilose ocorre por um

mecanismo de difusão facilitada, no qual o gradiente do açúcar é a única força direcionadora, ou através de um sistema de transporte ativo, usualmente por co-transporte (simporte) H^+ -açúcar. O sistema de transporte de difusão facilitada é usualmente um transporte de baixa afinidade, enquanto que o componente de alta afinidade são os simportes de prótons que usam a força próton motriz para transportar ativamente o açúcar para dentro das células. Estes diferentes sistemas de transporte são fortemente regulados pela concentração de substrato extracelular. Enquanto a maioria dos sistemas de transportes são compartilhados com o análogo glicose, alguns transportadores parecem ser específicos para xilose (Kilian et al., 1993; Hahn-Hägerdal et al., 2007; Leandro et al., 2009; revisto por Stambuk et al., 2008).

A xilose é também transportada por transportadores de hexoses de alta e intermediária afinidade em *S. cerevisiae*. Entretanto, a afinidade de transportadores de hexose para xilose é de uma a duas ordens de grandeza menor do que a afinidade por glicose, sendo que a competição com a glicose restringe fortemente a assimilação de xilose (Saloheimo et al., 2007, Kotter et al., 1993; Hahn-Hägerdal et al., 2007). O sistema de transporte de difusão facilitada é baseado em um grande número de permeases, possivelmente 18 na levedura *S. cerevisiae*, denominada transportadores *HXT*. Todas as proteínas *HXTs* estudadas são transportadores de difusão facilitada para glicose e frutose (Gonçalves et al., 2000). Hamacher et al. (2002) mostrou que desses 18 transportadores de hexoses, os transportadores *HXT4*, *HXT5*, *HXT7* e *GAL2* estão mais estreitamente relacionados com o transporte da xilose, ou seja, são capazes de transportar a xilose em quantidades mais significativas.

S. stipitis e *C. shehatae* possuem os dois sistemas de transportes (simporte de prótons e difusão facilitada), sendo que a *S. stipitis* é capaz de transportar xilose melhor que *C. shehatae*, mas o transporte de glicose mostra ser melhor que xilose para ambas as leveduras (revisto por Hahn-Hägerdal et al. 1994). A levedura *S. stipitis* apresenta em seu genoma possíveis genes candidatos a transportadores de xilose, porém estes ainda não foram completamente caracterizados (revisto por Jojima et al., 2010). Weierstall et al. (1999) caracterizou três transportadores de difusão facilitada para glicose, codificados pelos genes *SUT1*, *SUT2* e *SUT3*, da levedura *S. stipitis*, que exibiram cinéticas de baixa afinidade para xilose, quando expressos em *S. cerevisiae*, sendo que a permease, codificada pelo *SUT1*, promoveu a captação de xilose em condições de baixa afinidade, visto que no mutante sem esse gene, o componente de baixa afinidade estava ausente.

Em 2003, Gárdonyi et al. mostraram que em *Candida intermédia* tanto xilose como glicose são transportados por co-transporte de prótons com alta afinidade, assim como por difusão facilitada com baixa afinidade, no caso da xilose. A caracterização bioquímica do transporte de glicose e xilose na levedura *C. intermédia* mostrou um mecanismo de difusão facilitada constitutivo (K_m de 50 mM), e um simporte H^+ -glicose/xilose de alta afinidade (K_m de 0,2 mM). Stambuk et al. (2003) mostrou que para esses co-transportadores a atividade de transporte pode ter basicamente a mesma afinidade para ambos os açúcares (glicose e xilose), uma vez que a xilose consegue competir relativamente bem com a glicose na levedura *Candida succiphila*, ressaltando entretanto, que mais estudos são exigidos para determinar a afinidade e/ou K_i para cada açúcar.

Anos mais tarde foi visto que em *C. intermédia*, através de clonagem e expressão de transportadores em *S. cerevisiae*, o transporte era realizado por um transportador por difusão facilitada de xilose/glicose de baixa afinidade, codificado pelo gene *GXF1*, e um transportador ativo de xilose/glicose de alta afinidade, funcionando através do co-transporte de prótons, codificado pelo gene *GXS1* (Leandro et al. 2006). Entretanto, enquanto o transportador *GXF1* mostrou ser completamente funcional em *S. cerevisiae*, o simporte *GXS1* exibiu baixa atividade de transporte nesta levedura (Leandro et al., 2008). Observa-se também que esta permease *GXS1* produzida em *S. cerevisiae* (Leandro et al., 2008) exibiu muito maior afinidade para xilose do que transportadores presentes em *S. cerevisiae* e *S. stiptis*, porém com uma afinidade pouco maior para glicose, em relação a xilose (revisto por Jojima et al., 2010). Cabe salientar que apesar dos simportes terem uma maior afinidade, sua expressão nem sempre é alcançada na levedura *S. cerevisiae*. De fato, a maioria dos transportadores que mostram ser benéficos para a fermentação da xilose, quando expressos em leveduras, são os transportadores por difusão facilitada (Du et al., 2010)

Motivados pelos estudos de simporte da levedura *C. intermédia*, Du et al. (2010) procuraram novos transportadores de xilose na levedura *S. stiptis*, utilizando a sequência de DNA (gene *GXS1*) do novo simporte glicose/xilose caracterizado por Gárdonyi et al (2003), e encontraram um novo transportador (Xyp29) específico para xilose. Apesar de ter sido caracterizado como um transportador de difusão facilitada de baixa afinidade, o transportador Xyp29, quando expresso em *S. cerevisiae*, mostrou maior afinidade para xilose (K_m de 56 mM), em relação a outros transportadores como *GXF1* (K_m de 88 mM) ou *SUT1* (K_m de 145

mM).

Com base nos dados de que a levedura *S. passalidarum* exhibe consumo simultâneo de glicose e xilose sob condições aeróbicas, enquanto que sob condições anaeróbicas ocorre consumo sequencial de glicose e xilose, foi sugerido que esta levedura possivelmente apresente dois diferentes sistemas de transporte, o simporte de prótons em aerobiose e a difusão facilitada em anaerobiose (Hou, 2012). O mesmo padrão foi observado na levedura *K. marxianus*, visto que esta levedura somente apresentou transporte ativo de alta afinidade em condições aeróbicas, enquanto que em condições microaeróbicas a xilose é captada por um sistema de transporte de difusão facilitada com baixa afinidade (Stambuk et al., 2003).

De fato, estudos usando ^{14}C -xilose mostraram que o transporte é considerado como fator limitante para o metabolismo de xilose em condições aeróbicas ou semi-aeróbicas, para *S. stiptis* e *C. shehatae*, enquanto que sob condições anaeróbicas o fator limitante mostrou ser os passos enzimáticos iniciais que causam o desbalanço de cofatores do metabolismo da xilose (revisto por Hahn-Hägerdal et al. 1994)

1.4 TRANSPORTE E METABOLIZAÇÃO DE CELOBIOSE

Para que ocorra metabolização de celobiose é necessário a enzima β -glicosidase. Estas enzimas tem sido isoladas de muitas espécies fúngicas, incluindo leveduras fermentadoras de celobiose. As β -glicosidasas hidrolisam celobioses e celodextrinas até a glicose, e são competitivamente inibidas pelo seu produtos. Podem ser classificadas em três diferentes tipos: intracelular, associada a parede celular e extracelular, e não surpreendentemente o seu pH ótimo é baseado na sua localização celular (Dashtban. et al., 2009)

Freer e colaboradores (1993) relataram que a β -glicosidase extracelular é uma glicoproteína de massa molecular de 130-143 kDa, pH ótimo de 4,5, ponto isoelétrico de 3.2 e capaz de utilizar celodextrinas como substrato, removendo unidades de glicose das pontas não redutoras dos substratos. Já a β -glicosidase intracelular é uma enzima não glicosilada com massa molecular de 130 kDa, um pH ótimo de 6.0-6.3 e que utiliza eficientemente celobiose como substratos, exibindo pouca reatividade para celotriosos e nenhuma para celodextrinas maiores que 3 unidades. Por fim, a β -glicosidase associada à parede celular é uma glicoproteína de 198 kDa, pH ótimo de 4,5, ponto isoelétrico de 3.89 e capacidade de utilizar celodextrinas como substrato. Em outras leveduras Rosi et al (1994) relataram que o pH ótimo de atividade da β -glicosidase extracelular e de parede celular é o

pH 5, e para a atividade da β -glicosidase intracelular mostrou ser o pH 6. Resultados parecidos foram relatados para outras β -glicosidases extracelulares e de parede celular (Vasserot et al., 1989) e para β -glicosidases intracelulares (Leclerc et al., 1984). A baixa atividade da β -glicosidase observada em algumas espécies pode ser devido a inibição enzimática pela glicose (Rosi et al., 1994), embora as β -glicosidases produzidas pelas leveduras *C. molischiana* e *C. wicheramii* são menos sensíveis a glicose (Gunata et al. 1990). A regulação da biossíntese da β -glicosidase mostra ser dependente das condições de crescimento, concentração de glicose no meio, estado metabólico das células e fase de crescimento.

Poucos são os estudos referentes ao transporte da celobiose por leveduras, sendo encontrado somente um trabalho (Freer & Greene, 1990) que mostra um transportador específico para a celobiose, além de transportadores para a glicose (produto da hidrólise extracelular da celobiose). Tanto os sistemas de transporte de celobiose quanto os de glicose nestas leveduras são sensíveis ao protonophoro FCCP, sugerindo que eles podem ser sistemas de transporte ativo através do simporte com prótons (Freer & Greene, 1990).

Recentemente, transportadores de celobiose (*cdt-1* e *cdt-2*) do fungo celulolítico *Neurospora crassa* foram expressos em *S. cerevisiae*, juntamente com uma β -glicosidase intracelular (*gh1-1*), os quais transportaram celobiose (e outras celodextrinas) com alta afinidade (Galazka et al. 2010). Este sistema se mostrou particularmente útil, pois dispensaria a necessidade da completa hidrólise da celulose a glicose, pelas β -glicosidases extracelulares. Embora estes transportadores tenham sido expressos a partir de um fungo celulolítico, leveduras que possuem a habilidade de crescer em celobiose também apresentaram ortólogos aos transportadores *cdt-1* e *cdt-2* (Galazka et al. 2010)

A co-expressão do transportador de celobiose *cdt-1* e da β -glicosidase intracelular *gh1-1*, em uma *S.cerevisiae* que expressa enzimas do metabolismo da xilose, permite uma fermentação simultânea e eficiente de misturas de xilose e celobiose (Li et al., 2010; Há et al., 2011). A celobiose sendo transportada e hidrolisada dentro da célula minimiza drasticamente a repressão da utilização da xilose imposto pela glicose, permitindo a simultânea sacarificação e co-fermentação, pois a lignocelulose poderia receber um pré-tratamento, resultando em xilose e celulose, e então celulasas fúngicas hidrolizariam a celulose, o que por sua vez permitiria a conversão de celobiose e xilose em etanol com alta eficiência (Li et al., 2010; Há et al., 2011).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O Brasil, produtor pioneiro de etanol a partir da cana de açúcar, produz anualmente 75 milhões de toneladas de bagaço de cana de açúcar, sendo parte deste bagaço utilizado na geração de calor e energia elétrica. No entanto, a biomassa celulósica que compõe o bagaço da cana de açúcar e outros detritos agrícolas oferece açúcares que poderão ser convertidos a etanol, o que poderia promover um aumento de mais de 50% na produção de etanol, se considerarmos uma conversão de etanol a partir dos açúcares fermentáveis, presentes nessa biomassa, com eficiência de 90% (revisto por Stambuk et. al, 2008)

A produção de bioetanol a partir de resíduos da agricultura e florestas exige um organismo fermentador que converta eficientemente todos os tipos de açúcares obtidos da matéria prima para etanol. A levedura *S. cerevisiae*, que fermenta eficientemente a sacarose, é incapaz de produzir etanol a partir de outros açúcares abundantes na biomassa, como xilose e celobiose. A identificação e caracterização de novas leveduras, incluindo suas enzimas e/ou transportadores (e respectivos genes) para a metabolização da xilose e celobiose, com características cinéticas mais apropriadas, permitiria sua expressão em leveduras industriais visando otimizar a produção de bioetanol.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a fermentação de xilose e celobiose por leveduras da biodiversidade brasileira isoladas de madeira em decomposição. Com este propósito propomos:

1. Determinar os parâmetros cinéticos do crescimento em xilose e celobiose de diversas cepas de leveduras isoladas de vários ecossistemas (mata atlântica, cerrado, etc.) brasileiros.
2. Determinar o consumo de açúcares e a produção de etanol pelas leveduras.
3. Determinar a(s) atividade(s) enzimática(s) envolvidas, incluindo a xilose redutase, xilitol desidrogenase, xiluloquinase e β -glicosidase, durante o crescimento das leveduras em xilose ou celobiose.
4. Determinar as cinéticas e tipo de transporte (difusão facilitada ou transporte ativo) de xilose e celobiose por leveduras após o crescimento em diferentes fontes de carbono.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LEVEDURAS ANALISADAS

Foram analisadas diversas linhagens de leveduras fermentadoras de xilose e celobiose isoladas de madeira em decomposição em vários ecossistemas Brasileiros, incluindo isolados das espécies *Candida shehatae*, *C. materiae* (Barbosa et al., 2009), *C. queiroziae* (Santos et al., 2011), *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces stipitis* (antigamente denominada *Pichia stipitis*), *Spathaspora passalidarum* (Nguyen et al., 2006), *Spathaspora arborariae* (Cadete et al., 2009), e novas espécies do clado *Spathaspora*, todas cedidas gentilmente pelo Dr. Carlos A. Rosa do Departamento de Microbiologia da UFMG.(tabela 1)

Tabela 1. Linhagens de leveduras analisadas

Espécie e cepa		Amostra	Local
<i>Candida shehatae</i>	HM.60.1a	Madeira em decomposição	RJ
	XM 14.4	Madeira em decomposição	Caraça - MG ^a
	HM 51.3	Madeira em decomposição	RJ
	HM 52.2	Madeira em decomposição	RJ
	HM 43.4	Madeira em decomposição	RJ
	HM 43.2	Inseto	RJ
	HM 60.1b	Madeira em decomposição	RJ
	XM 5.2	Madeira em decomposição	Caraça - MG
<i>S. stiptis</i>	HB 26a	Bagaço de cana	Piracicaba - SP
	HM 45.1	Madeira em decomposição	RJ
	HM 44.1	Madeira em decomposição	RJ
	IMH 43.2	Madeira em decomposição	RJ
	XMD 15.2	Madeira em decomposição	MG

<i>Spathaspora passalidarum</i>	HMD 1.1	Madeira em decomposição	São João da Balisa - AM ^b
	HMD 1.3	Madeira em decomposição	São João da Balisa - AM
	HMD 10.2	Madeira em decomposição	São João da Balisa - AM
	HMD 14.2	Madeira em decomposição	São João da Balisa - AM
	HMD.16.1	Madeira em decomposição	São João da Balisa - AM
<i>Candida materiae</i>	CAR15.1b	Madeira em decomposição	Caraça - MG
<i>Spathaspora arborariae</i>	HM.19.1a	Madeira em decomposição	Serra do Cipó - MG ^c
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	HB 63.b	Bagaço de cana	Piracicaba - SP
<i>Spathaspora brasilienses</i>	HMD 19.3	Madeira em decomposição	São João da Balisa - AM
<i>Spathaspora suhii</i>	XMD 16.2	Madeira em decomposição	São João da Balisa - AM
<i>Spathaspora roraimanensis</i>	XMD 23.2	Madeira em decomposição	Mucajai - AM ^d
<i>Candida xylofermentans</i>	HMD 25.1	Madeira em decomposição	Mucajai - AM
<i>Candida queiroziae</i>	IXM 6.1	Besouro	Caraça - MG
	CLM 43.1	Madeira em decomposição	Woodstock - RJ ^e
	CLM 5.1	Madeira em decomposição	Caraça - MG
<i>Candida tropicalis</i>	HB 61d	Bagaço de cana	Piracicaba - SP

^aSantuário do Caraça –MG, ^bReserva Florestal Amazônica São João da Balisa

^cParque Nacional da Serra do Cipó –MG, ^dReserva Florestal Amazônica

Mucajai, ^eReserva Particular do Patrimônio Natural Woodstock – RJ.

3.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio de cultura rotineiramente utilizado (meio rico YP) foi composto de 2% de peptona bacteriológica, 1% de extrato de levedura e concentrações variáveis de fonte de carbono de interesse (glicose, celobiose e/ou xilose), ajustando para o pH 5 com HCl. As culturas foram incubadas em frascos erlenmeyers, contendo 1/5 do seu volume de meio, em agitadores orbitais a 28° C e 160 rpm. Rotineiramente era realizado um pré-cultivo em tubos com 3 ml de meio YP acrescido de 2% da fonte de carbono de interesse (glicose, xilose, celobiose) nas condições descritas anteriormente por 48 horas. Uma alíquota deste pré-cultivo foi inoculada em meios contendo xilose, celobiose ou glicose, e os parâmetros de crescimento foram determinados através de coletas de amostras em tempos determinados e medidas em espectrofotômetro (Beckman DU-7) a 570 nm para verificar o aumento da massa celular. A seguir, as células foram removidas por centrifugação (3.000 g por 1 min) e o sobrenadante utilizado para a determinação dos açúcares e produtos de fermentação.

3.3 FERMENTAÇÃO EM BATELADA COM ALTAS DENSIDADES CELULARES

Inicialmente, as células foram crescidas a 28°C e 160 rpm em meios contendo a fonte de carbono desejada, e cultivadas sob as condições descritas anteriormente até atingir o final da fase exponencial de crescimento, com uma concentração de aproximadamente 1 g de células L⁻¹. Em seguida as células foram centrifugadas, lavadas com água destilada a 4 °C, e a concentração final de células ajustadas para ±10 g L⁻¹ de meio YP contendo 2% da fonte de carbono de interesse, como descrito por Dario (2007) e Gonçalves (2010). Em tempos determinados foram removidas alíquotas, centrifugadas, e os sobrenadantes utilizados para determinar os parâmetros cinéticos de consumo de açúcar e produção de etanol.

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LEVEDURAS

O peso das leveduras secas foi determinado utilizando-se uma alíquota de 3 ml de células crescidas em meio YP com a fonte de carbono de interesse, que foram filtradas em membranas de nitrocelulose/acetato de celulose, com poro de 0,45 µm e diâmetro de 2,5 cm, previamente pesadas. A seguir as células foram lavadas com 5 ml de água destilada e colocadas em placas de petri (5 cm diâmetro) para serem secas em forno de microondas, na potência de 900W por um minuto. Em seguida as placas de petri foram colocadas em estufa a 80°C

por 12 hs, e as membranas foram novamente pesadas. O peso das leveduras secas foi correlacionado à densidade óptica a 570 nm obtida do meio de cultura contendo as células de levedura.

3.5 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES

A xilose e celobiose foram quantificadas pelo método de açúcares redutores, como descrito por Miller (1959). Para essa análise 50 μL da amostra foi incubada com 150 μL do reagente DNS (0,04 M de ácido dinitrosalicílico, 0,5 M NaOH, 0,7 M de tartarato de sódio e potássio e 0,04 M de fenol) a 100°C, por 10 min, sendo em seguida adicionado 800 μL de água destilada, centrifugada (5.000 g por 3 min), e medida a sua absorbância a 540 nm num espectrofotômetro Beckman DU-7. As determinações das absorbâncias foram correlacionadas com a equação da reta, obtida através de uma curva padrão, construída a partir de concentrações entre 0,4 g L⁻¹ e 2,0 g L⁻¹ do respectivo açúcar analisado.

A glicose foi quantificada através de um kit enzimático comercial (Biotécnica) seguindo as instruções do fabricante. Uma amostra de 10 μL foi incubada com 1 mL do reagente enzimático (composto pelas enzimas glicose oxidase e peroxidase), por 10 min a 37° C. Em seguida, a absorbância da reação foi medida a 505 nm, permitindo a determinação da concentração de glicose através da correlação com a absorbância apresentada por uma solução padrão contendo 1 g glicose L⁻¹.

3.6 DETERMINAÇÃO DE ETANOL

O etanol foi quantificado enzimaticamente com álcool oxidase e peroxidase como descrito por Alves-Jr e colaboradores (2007). O etanol foi quantificado enzimaticamente com álcool oxidase (AOD, de *Pichia pastoris*, Sigma) e peroxidase (POD, de raiz forte, Toyobo) como descrito por Alves-Jr e colaboradores (2007). A determinação foi realizada em placas de Elisa (fundo plano) com 10 μL da amostra incubada com 200 μL do reagente enzimático contendo 0,5 U ml⁻¹ de álcool oxidase, 4,0 U ml⁻¹ de peroxidase, 14 mM de 4-aminoantipirina e 60 mM de fenol em tampão 0,1 M fosfato de sódio pH 7,5, por 1 hora a 37°C. Em seguida, a absorbância foi medida a 505 nm em um leitor de placas (Tecan Infinite M 2000) e a concentração de etanol foi determinada pela correlação das absorbâncias das amostras com a equação da reta obtida através de uma curva padrão construída com soluções de etanol contendo entre 1 e 10 g L⁻¹.

3.7 DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS

Após o crescimento das leveduras na fonte de carbono desejada, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água destilada a 4°C, e lisadas com o tampão YPER (Pierce Rockford, IL, USA) utilizando-se bolinhas de vidro (0,5 mm de diâmetro) e agitação vigorosa por 40 segundos (FastPrep – MP Biomedicals). A seguir as células e debris celulares foram removidos por centrifugação (12.000 g, 5 min, a 4°C), e o sobrenadante utilizado nas determinações enzimáticas. A concentração de proteínas nos extratos celulares foi determinada com o Kit BCA (Thermo Scientific), utilizando albumina sérica bovina como padrão. Para a análise, 200 µL da amostra (diluída 200x) foi incubada com 200 µL do reagente, por 1 hora a 60°C em banho-maria. A seguir a amostra foi lida a 562 nm em espectrofotômetro Biowave II (WPA, Cambridge, UK). A concentração de proteína foi determinada pela correlação das absorbâncias das amostras com a equação da reta obtida através de uma curva padrão construída com soluções padrão de albumina entre 0 e 200 µg ml⁻¹.

Alternativamente, as atividades enzimáticas foram determinadas em células permeabilizadas com uma mistura de tolueno, etanol e triton X-100, como descrito por Stambuk (1999). As células foram crescidas em meio YP com 20 g L⁻¹ da fonte de carbono de interesse, ao atingirem a concentração de ±1 g L⁻¹ as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água destilada a 4°C, e ressuspensas em água de modo a atingirem a uma concentração de 20 g L⁻¹. Uma alíquota de 100 µL de células foi centrifugada (5.000 g por 3 min) e lavada com 500 µL do tampão A (100 mM Mops-NaOH pH 6,8), em seguida ressuspensa em 200 µL de tampão B (100 mM MOPS pH 6,8, contendo 20% glicerol, 0,5mM EDTA, 0,5M DTT), e finalmente adicionado à solução 12 µL de tolueno, etanol e 10% triton X-100 (1:4:1; V:V:V) e vigorosamente agitadas por 1 min. Após a permeabilização, as células foram lavadas duas vezes com tampão B e ressuspensas em 1 ml de tampão A.

As enzimas xilose redutase, xilitol desidrogenase e xiluloquinase foram também determinadas com a levedura *S. cerevisiae* KY073 (*MATa hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt7::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6 gal2Δ::DR ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC2 GAL MEL*) como controle negativo, ou então com esta mesma linhagem transformada com o plasmídeo integrativo pAUR-XXRDHXX (Matsushika et al., 2009c), que sobre-expressa os genes das enzimas xilose redutase (*XYL1*) e xilitol desidrogenase (*XYL2*) de *S. stipitis*, junto com a xiluloquinase (*XKS1*) de *S. cerevisiae*, dando origem à linhagem DLGK1. Para efeitos comparativos, também foi analisada a

levedura *Candida succiphila* NRRL Y-11998(Stambuk et al., 2003). Todos os ensaios foram feitos em duplicata, com coeficiente de variação menor que 5%.

3.7.1 Determinação da xilose redutase

A atividade da xilose redutase foi determinada através da quantificação da oxidação do NADPH ou NADH, medido a 340 nm em espectrofotômetro UV-2450 (Shimadzu, Kyoto, Japão), utilizando-se um coeficiente de extinção molar ($\Delta\epsilon$) para os cofatores a 340 nm de $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, conforme metodologia adaptado de Lee et al. (1986), Smiley & Paul (1982), e Verduyn et al. (1985). A atividade enzimática foi determinada a 30°C em tampão 45,5 mM fosfato de potássio pH 6,0, contendo 200 mM de xilose, e as reações iniciadas com a adição de 0,15 mM de NADH ou NADPH. Para avaliar o efeito do pH na atividade enzimática foram utilizados tampão 45,5 mM citrato de sódio (pHs de 4,5 a 6,0); e tampão 45,5 mM fosfato de potássio (pHs 6,0 a 8,0). A atividade enzimática foi também avaliada em diferentes concentrações (2,5 a 500 μM) de NADPH ou NADH, em tampão 45,5 mM fosfato de potássio pH 6, para determinar o K_m da enzima para estes substratos. Uma unidade internacional de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de um micromol de produto ($\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$) por minuto.

3.7.2 Determinação da xilitol desidrogenase

A atividade da xilitol desidrogenase foi determinada através da quantificação da redução do NADP^+ ou NAD^+ , conforme metodologia adaptada de Lee et al. (1986), Smiley & Paul (1982) e Rizzi et al. (1989). A atividade enzimática foi determinada a 35°C em tampão 50 mM Tris-HCl pH 9,0, contendo 50 mM MgCl_2 e 300 mM de xilitol, e as reações iniciadas com a adição de 1 mM de NAD^+ ou NADP^+ . Para avaliar o efeito do pH na atividade enzimática foram utilizados tampão 50 mM fosfato de potássio (pHs 6,5 e 7,0); tampão tris-HCl (pHs 7,0 a 8,5) e tampão glicina-NaOH (pHs 8,5 a 10,0). A atividade enzimática foi também avaliada em diferentes concentrações (10 a 2000 μM) de NAD^+ , em tampão 50 mM tris-HCl pH 9, para determinar o K_m da enzima para estes substratos. Uma unidade internacional de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de um micromol de produto (NADPH/NADH) por minuto.

3.7.3 Determinação da xiluloquinase

A atividade da xiluloquinase, em extratos celulares, foi determinada em uma reação acoplada, através da oxidação do NADH, adaptado de Shamanna & Sanderson (1979), conforme ilustrado na Figura 2.

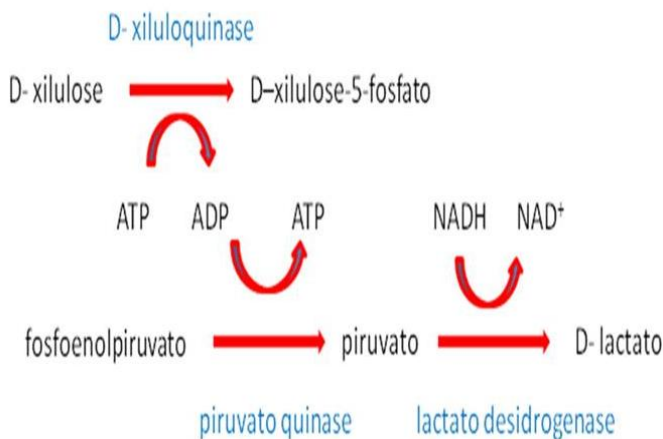


Figura 2 – Reação acoplada para determinação da xiluloquinase. A atividade da xiluloquinase foi determinada em uma reação acoplada, onde o ADP liberado é usado pela piruvato quinase para a síntese de piruvato, que em seguida é reduzido a lactato pela lactato desidrogenase, com produção estequiométrica de NAD^+ , quantificado em espectrofotômetro a 340 nm.

O ensaio foi realizado a 30°C em tampão 200 mM tris-HCl pH 7, contendo 2,3 mM MgCl_2 , 10 mM NaF, 2,5 mM de ATP, 0,25 mM fosfoenolpiruvato, 3,5 mM glutationa reduzida, 10 U ml^{-1} de piruvato quinase e 15 U ml^{-1} de lactato desidrogenase, e 4,25 mM de xilulose. A reação foi iniciada com 0,2 mM de NADH, e a oxidação do cofator determinado a 340 nm. Como controle negativo da reação, o ensaio também foi realizado sem a presença de ATP. Uma unidade internacional de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de um micromol de produto (NADH) por minuto.

3.7.4 Determinação da β -glicosidase

Para avaliar a atividade da β -glicosidase extracelular, foram utilizadas células íntegras inibidas com fluoreto (inibidor da via glicolítica), conforme protocolo descrito por Silveira et al. (1996) para a determinação da invertase extracelular. Alíquotas de 100 μL de uma

suspensão celular a 20 g L^{-1} foi inicialmente tratada com tampões 67 mM succinato-Tris pH 5,0 ou 67 mM Hepes-NaOH pH 7,0, contendo 50 mM NaF e incubadas a 30°C . Após 30 min de incubação, foi adicionado 67 mM de celobiose às células e incubadas a 30°C por 5 min. Em seguida, as reações foram paradas em água fervente a 100°C por 5 min, e centrifugadas a 5.000 g por 3 min. Alternativamente, a atividade da β -glicosidase foi avaliada utilizando células permeabilizadas. Alíquotas de 50 μL de células permeabilizadas foram incubadas a 30°C , por 5 min, em tampão 150 mM succinato-Tris pH 5, ou 50 mM Hepes-NaOH pH 7, contendo 100 mM de celobiose. Em seguida as amostras foram incubadas a 100°C por 5 min e centrifugadas a 5.000 g por 3 min. A hidrólise da celobiose foi determinada pela quantificação da glicose formada no sobrenadante da reação.

Quando a atividade da β -glicosidase foi determinada com o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -glicopiranosídeo (*p*NP β G) ou *p*-nitrofenil- β -celobiosídeo (*p*NP β C), as células permeabilizadas foram incubadas a 30°C por 1 min em tampão 50 mM MOPS-NaOH pH 7,5, contendo 1,9 mM de *p*NP β G ou *p*NP β C. Em seguida, as amostras foram incubadas a 100°C por 5 min e centrifugadas a 5.000 g por 3 min. Para a determinação da hidrólise do *p*NP β G ou *p*NP β C, foi medido o *p*-nitrofenol liberado, presente no sobrenadante, através da leitura a 400 nm ($\Delta\epsilon = 11,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em placas de Elisa no equipamento TECAN Infinite M2000. Para avaliar o efeito do pH na atividade enzimática com *p*NP β G, foram utilizados tampão 50 mM MES-NaOH (pHs 5,5 a 6,5), 50 mM MOPS-NaOH (pHs 6,5 a 8,0) ou 50 mM Hepes-NaOH (pHs 8,0 e 8,5). A determinação da hidrólise de *p*NP β G foi realizada através da medição do *p*-nitrofenol liberado, utilizando os coeficientes de extinção molar correspondente ao pH e tampão utilizados. A atividade enzimática foi também avaliada em tampão 50 mM MOPS pH 7,5 com diferentes concentrações de *p*NP β G (0,025 a 8 mM), como também em diferentes concentrações de celobiose (1 a 100 mM), com o propósito de encontrar o K_m para estes substratos. A atividade da β -glicosidase foi expressa em nmoles de produto formado $\text{mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Como controle negativo, foram utilizadas células previamente fervidas por 5 min a 100°C .

3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRANSPORTE

3.8.1 Determinação do co-transporte H^+ -açúcar.

O transporte ativo, através da captação de prótons, foi determinado pela mudança de pH em suspensões de leveduras como previamente descrito (Stambuk *et al.*, 1998). As células, crescidas em

meio rico YP contendo 20 g L^{-1} da fonte de carbono de interesse, foram centrifugadas e lavadas duas vezes com água destilada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e ressuspensas em água de modo a atingirem uma concentração de 15 g L^{-1} . As mudanças de pH na suspensão celular foram registradas em um recipiente com temperatura controlada a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizando um pHmetro 84 (Radiometer, Copenhagen) acoplado a um registrador gráfico (Solar Instrumentação Ltda), conforme mostra a Figura 3.

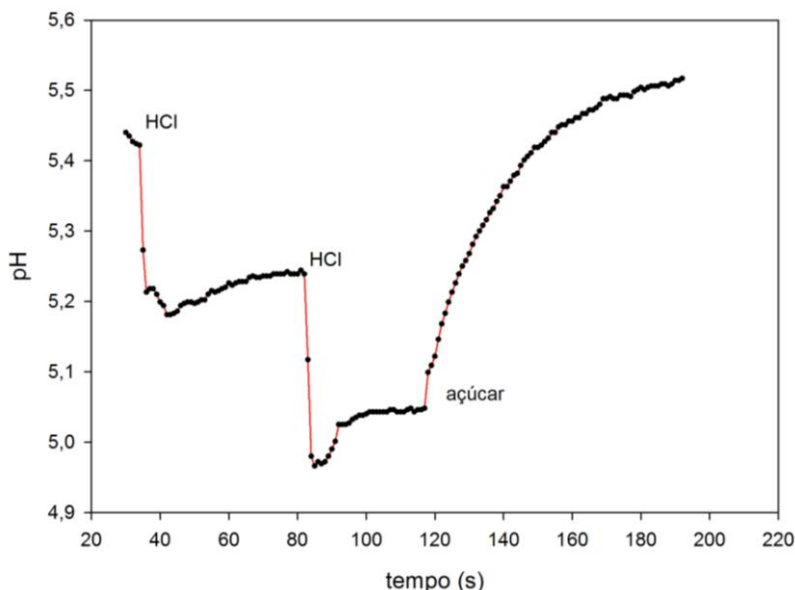


Figura 3 – Mudanças de pH provocadas pelo co-transporte de H^+ -açúcar em leveduras. A figura mostra as alterações no pH da suspensão celular, ao longo do tempo, provocados pela adição de 500 nmoles de HCl, ou pela adição de um açúcar que é co-transportado com H^+ para o interior das células.

Para calcular a quantidade de H^+ captado pelas células foi adicionado 500 nmoles de HCl na suspensão celular, com o intuito de verificar a capacidade tampão das células. Quando a suspensão celular atingiu o pH 5,0, a reação foi iniciada pela adição de diferentes concentrações (1 a 150 mM) do açúcar de interesse (glicose, xilose ou celobiose, ajustado para o pH 5,0), o que ocasiona uma mudança de pH devido ao co-transporte de prótons. As atividades de co-transporte foram calculadas nos primeiros 10 s de reação, subtraindo-se a capturação de H^+ pelas células na ausência do açúcar. As atividade de transporte

ativo pelo co-transporte de prótons foram expressas em nmoles de H^+ captado $mg^{-1} \text{ min}^{-1}$.

3.8.2 Determinação colorimétrica da atividade de transporte utilizando substratos sintéticos.

A atividade de transporte foi avaliada colorimetricamente com o uso do substrato sintético *p*-nitrofenil- β -glicopiranosídeo (*pNP* β G) ou *p*-nitrofenil- β -celobiosídeo (*pNP* β C), através de um protocolo desenvolvido para medir o transporte ativo de α -glucosídeos em *S. cerevisiae*, como descrito por Hollatz & Stambuk (2001). As células, crescidas em meio rico YP contendo 20 g L^{-1} da fonte de carbono de interesse até atingirem uma concentração de $\pm 1 \text{ g L}^{-1}$, foram centrifugadas, lavadas e concentradas a 20 g L^{-1} em tampão 50 mM succinato-Tris pH 5,0. Alíquotas de $100 \text{ }\mu\text{L}$ desta suspensão celular foram mantidas por 15 min a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, e então, adicionados o *pNP* β G ou o *pNP* β C de forma a atingir uma concentração final de 5 mM , e incubados. Depois de incubar as células a 30°C por 10 min , a reação foi parada com 2 M NaHCO_3 (pH 10), e as amostras centrifugadas a 5.000 g por 3 min . O sobrenadante foi utilizado para a determinação do *p*-nitrofenol liberado pela leitura a 400 nm ($\Delta\epsilon = 17,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em placas de ELISA no equipamento TECAN Infinite M2000. Para determinar os parâmetros cinéticos de transporte, a atividade foi avaliada em diferentes concentrações de *pNP* β G ($0,5$ a 25 mM) ou *pNP* β C (2 a 25 mM), em tampão succinato-Tris pH 4,5. Quando indicado, as células foram previamente incubadas por 15 min com $500 \text{ }\mu\text{M}$ de pCMPS (*p*-cloro-mercúrio-fenil-sulfonato), antes da adição do *pNP* β G. Todas as análises de atividade de transporte foram realizadas em triplicatas, e como controle negativo foram utilizadas células previamente fervidas por 5 min a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. As atividades de transporte foram expressas em nmoles de *p*-nitrofenol liberado $mg^{-1} \text{ min}^{-1}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foram analisadas mais de 32 diferentes leveduras isoladas de madeira em decomposição, capazes de fermentar xilose. Entre estas leveduras, uma nova espécie de *Candida* (*C. queroiziae*) mostrou-se também boa fermentadora de celobiose. Desta forma, inicialmente serão mostrados os resultados obtidos com as leveduras fermentadoras de xilose, para a seguir relatar o trabalho desenvolvido com a levedura fermentadora de celobiose.

4.1 FERMENTAÇÃO DE XILOSE POR LEVEDURAS

A primeira etapa desse trabalho foi avaliar a capacidade fermentativa das leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira. O perfil de crescimento, consumo de açúcar e produção de etanol foram analisados em duas fontes de carbono: xilose e glicose. Os resultados obtidos revelaram diversos padrões de consumo e fermentação destes açúcares pelas leveduras. Como exemplo, a Figura 4 mostra o crescimento celular, consumo de açúcar e produção de etanol das linhagens *Kluyveromyces marxianus* HB26.b, *Spathaspora passalidarum* HMD16.1 e *S. arborariae* HM19.1a. Enquanto que as leveduras do gênero *Spathaspora* foram capazes de fermentar eficientemente a xilose e glicose, consumindo estes açúcares em menos de 20 hs e produzindo 5-6 g L⁻¹ de etanol, a levedura *K. marxianus* mostrou um lento consumo da xilose com baixa produção de etanol, quando comparado com o consumo e fermentação de glicose pela mesma linhagem.

Na Figura 5 estão mostrados os resultados de rendimento da fermentação ($Y_{e/s}$, g etanol /g açúcar) obtidos pelas diferentes leveduras quando utilizam xilose ou glicose como fonte de carbono para o crescimento. Estes resultados indicam que não só a capacidade fermentativa das linhagens varia consideravelmente entre linhagens e espécies, mas também revelam que leveduras como *K. marxianus* e *Candida materiae* são melhores fermentadoras de glicose do que xilose, enquanto que boa parte das leveduras *S. passalidarum* e alguns isolados de *Candida shehatae*, apresentam melhor produção de etanol a partir de xilose. Já as leveduras *Scheffersomyces stipitis* e as do gênero *Spathaspora* apresentaram praticamente a mesma produção de etanol a partir de ambos os açúcares. De qualquer forma, os resultados sugerem que a espécie *S. stipitis* e leveduras do gênero *Spathaspora* são as que apresentam um melhor rendimento em etanol quando consomem xilose como fonte de carbono.

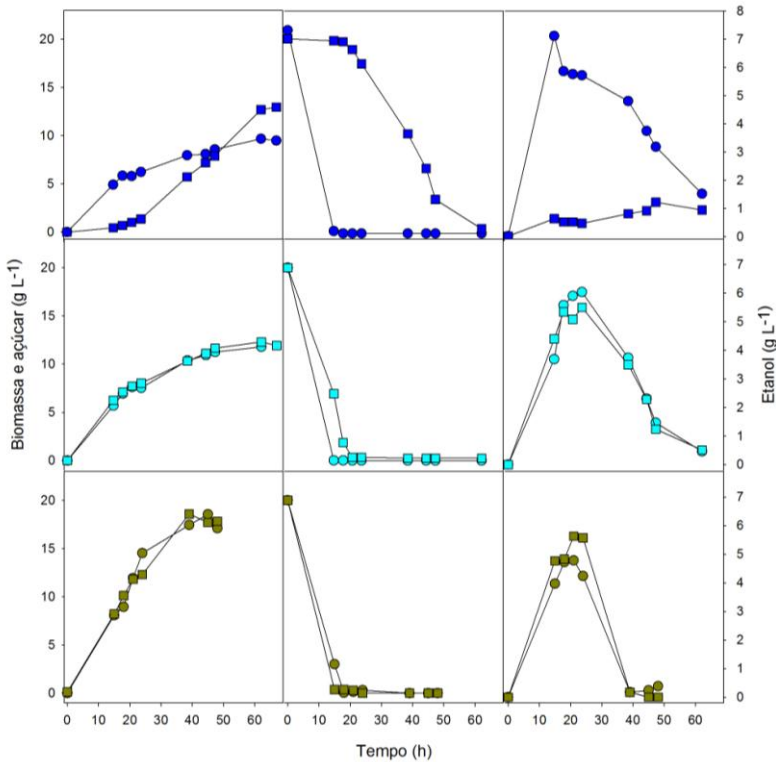


Figura 4 – Crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol por leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira. Nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas da cultura para a determinação do crescimento celular (painéis à esquerda), consumo do açúcar (painéis centrais) e produção de etanol (painéis à direita) em meio YP contendo 2% de glicose (círculos) ou xilose (quadrados), pelas linhagens *K. marxianus* HB63.b (azul escuro), *S. arborariae* HM19.1a (azul claro) e *S. passalidarum* HMD16.1 (amarelo).

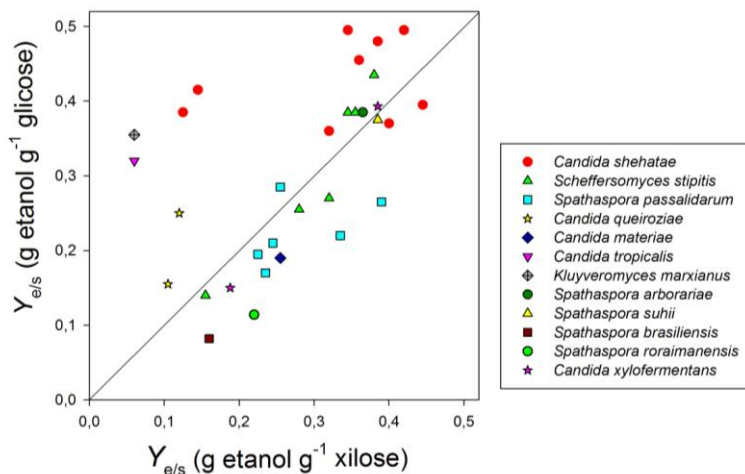


Figura 5 – Rendimento fermentativo em etanol a partir de xilose e glicose das leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira. Os diferentes isolados das espécies indicadas foram crescidas em meio YP contendo 2% de xilose ou glicose, e o rendimento fermentativo ($Y_{e/s}$, g etanol/g açúcar) determinado durante o crescimento das células.

No intuito de verificar as possíveis causas dessa enorme variabilidade na capacidade das leveduras fermentarem a xilose, a seguir foram determinadas as atividades da xilose redutase, xilitol desidrogenase, e xiluloquinase em algumas das leveduras apresentadas na Figura 5, representativas dos vários padrões de perfil fermentativo.

A atividade enzimática da xilose redutase nas diversas linhagens de leveduras (Figura 6), mostrou uma melhor atividade enzimática acoplada ao cofator NADPH em todas as leveduras. Porém, uma atividade enzimática significativa, acoplada ao cofator NADH, é observada para as leveduras *S. arborariae*, *Candida succiphila*, e principalmente *S. passalidarum*. No caso da levedura *K. marxianus* a atividade da xilose redutase, com ambos os cofatores, foi extremamente baixa, o que pode explicar a baixa capacidade fermentativa que esta espécie apresenta quando crescida em xilose (vide Figura 4 e Figura 5). Na Figura 6 é mostrada também a atividade xilose redutase da levedura *S. stipitis* (gene *XYL1*) sobre-expresso em *S. cerevisiae*, uma enzima que sabidamente aceita ambos os cofatores, embora a atividade com NADPH seja maior do que com NADH (Verduyn et al., 1985).

A atividade da xilitol desidrogenase mostrou uma total dependência no cofator NAD^+ em todas as linhagens (Figura 7), e

novamente uma atividade significativa desta enzima é observada principalmente para as linhagens de *S. passalidarum*, enquanto que a levedura *K. marxianus* apresentou a menor atividade enzimática dentre as várias linhagens analisadas. Na Figura 7 é possível verificar também a eficiente sobre-expressão da xilitol desidrogenase de *S. stipitis* (gene *XYL2*) em *S. cerevisiae*, enzima totalmente dependente de NAD^+ (Metzger & Hollenberg, 1995).

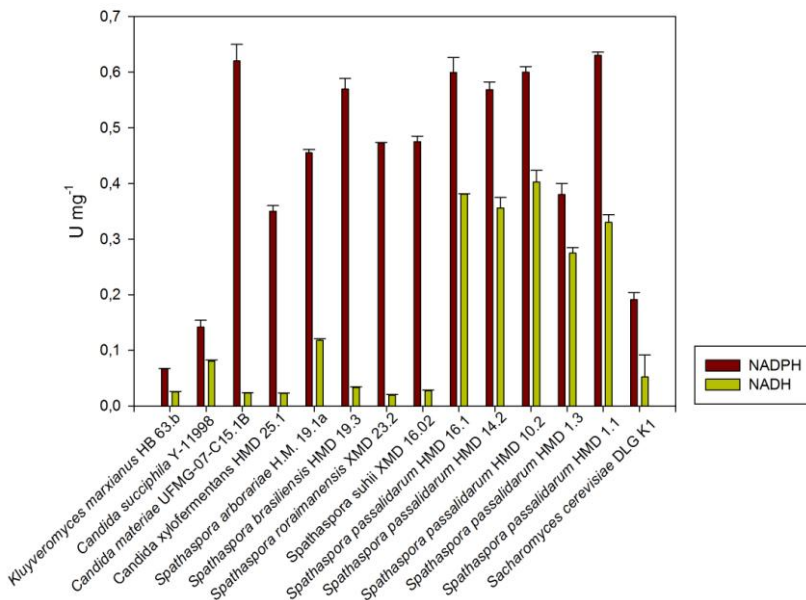


Figura 6 – Atividade da enzima xilose redutase nas leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira. Após crescimento das leveduras em meio com 2% de xilose, foram obtidos extratos celulares e determinada a atividade da xilose redutase com NADPH (barras vermelhas) ou NADH (barras amarelas) como co-fatores, conforme descrito em Material e Métodos.

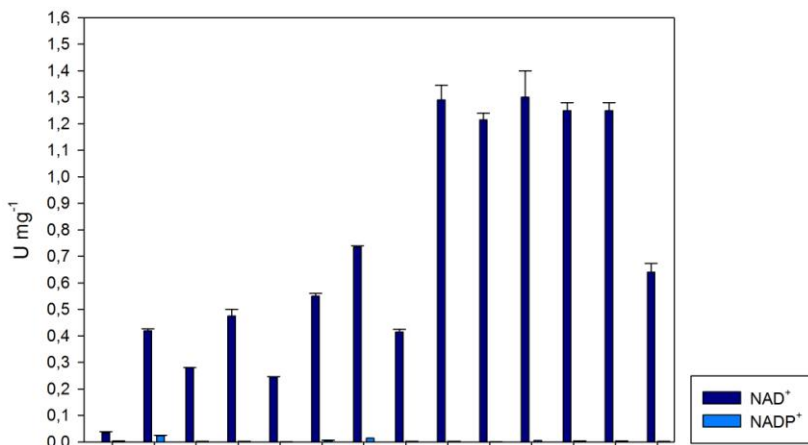


Figura 7 – Atividade da enzima xilitol desidrogenase nas leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira. Após crescimento das leveduras indicadas em meio com 2% de xilose, foram obtidos extratos celulares e determinada a atividade da xilitol desidrogenase com NADP^+ (barras azul claras) ou NAD^+ (barras azul escuras) como co-fatores, conforme descrito em Material e Métodos.

A Figura 8 mostra os resultados obtidos com a enzima xiluloquinase, e novamente a maior atividade foi encontrada nas leveduras *S. passalidarum*. Entretanto, cabe ressaltar que com as leveduras *C. materiae* UFMG-07-C15.1B, *S. passalidarum* HMD 16.1 e *S. cerevisiae* DLG K1, foram obtidos resultados inconclusivos na determinação desta atividade enzimática, uma vez que a atividade medida na ausência de ATP foi maior que a obtida na presença de ATP, refletindo provavelmente problemas na reação acoplada utilizada para determinar a atividade xiluloquinase, que mede o consumo (oxidação) de NADH pela lactato desidrogenase (vide Figura 2).

Técnicas de ultrafiltração e diálise foram utilizadas com a finalidade de remover o ATP endógeno, possivelmente presente nos extratos celulares. Foram incluídos cianeto de potássio (KCN) e fluoreto de sódio (NaF), com o intuito de inibir a atividade de possíveis NADH oxidases e ATPases, respectivamente (Flanagan & Waites, 1992). Outros controles negativos também foram testados, como a remoção do fosfoenolpiruvato, ou da lactato desidrogenase e piruvato quinase, ou

ainda adição de altas concentrações de xilitol, afim de evitar uma possível reação reversa da xilitol desidrogenase, mas a atividade encontrada na ausência de ATP continuava maior do que a obtida na presença de ATP. Como apenas a adição do cofator NADH não foi o suficiente para que ocorra a rápida reação de oxidação, sendo necessária a adição da xilulose, estes resultados sugerem que a xilulose possa estar sendo diretamente reduzida para um outro composto (que não xilitol), e não sendo fosforilada pela xiluloquinase. Novos estudos são necessários para caracterizar esta possível via alternativa de metabolização da xilulose em leveduras.

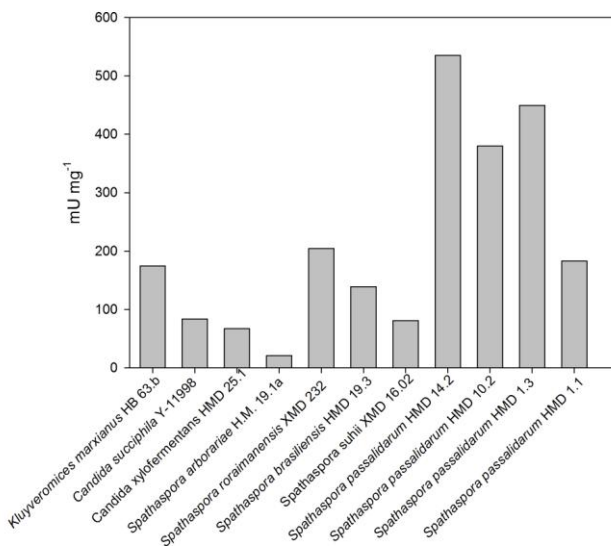


Figura 8 – Atividade da enzima xiluloquinase nas leveduras isoladas da biodiversidade Brasileira. Após crescimento das leveduras indicadas em meio com 2% de xilose, foram obtidos extratos celulares e determinada a atividade da xiluloquinase, conforme descrito em Material e Métodos.

A seguir passamos a determinar não só o pH ótimo das enzimas xilulose redutase e xilitol desidrogenase encontradas nas leveduras estudadas, como também a afinidade das mesmas pelos seus cofatores NADPH/NADH e NAD⁺, respectivamente. Na Figura 9 encontram-se os

perfis de pH ótimo destas enzimas encontradas na levedura *S. passalidarum* HM16.1, enquanto que na Figura 10 encontram-se os resultados obtidos com a levedura *S. arborariae* HM19.1a.

A enzima xilose redutase apresentou um pH ótimo em torno do pH 5,5 a 6,5 para ambos os cofatores em todas as leveduras testadas, corroborando resultados já relatados por outros autores (Verduyn et al., 1985; Lee et al., 2003; Wang et al., 2007; Zhang et al., 2009). Cabe ressaltar que no caso da levedura *S. passalidarum* a xilose redutase apresenta significativa atividade em todos os pHs utilizando NADH como cofator (Fig. 10), enquanto que na levedura *S. arborariae* a atividade da enzima com este cofator é baixa, quando comparada com o NADPH como cofator.

No caso da xilitol desidrogenase, o pH ótimo encontrado para estas duas leveduras *Spathaspora* foi mais elevado, em torno do pH 8,0 a 8,5 (Fig. 9 e 10). No caso da levedura *C. succiphila* o pH ótimo encontrado foi o pH 9,0 (dados não mostrados), um pH ótimo semelhante ao já relatado para a xilitol desidrogenase de *S. stipitis*, *C. albicans*, *C. utilis* e *Pachysolen tannophilus* (revisto por Rizzi et al., 1989).

A análise cinética da xilose redutase encontrada na levedura *S. passalidarum* HM16.1 (Figura 11) revelou que a enzima apresenta alta afinidade pelo NADH (K_m de 10 μM e velocidade máxima de 0,375 U mg^{-1}) e NADPH (K_m de 17,5 μM e velocidade máxima de 0,50 U mg^{-1}). Embora a afinidade da xilose redutase pelo NADPH ser aproximadamente duas vezes menor do que a afinidade para o NADH, a velocidade máxima é maior quando a enzima utiliza NADPH, em relação ao NADH. Um perfil semelhante foi recentemente descrito para um outro isolado da levedura *S. passalidarum*, que mostrou também maior afinidade pelo NADH (Hou, 2012). Entretanto, estes resultados diferem da maioria dos outros trabalhos, que descreveram um K_m de maior afinidade para a xilose redutase acoplada ao NADPH (Verduyn et al. 1985; Zhang et al., 2009; Wang et al. 2007; Lee et al., 2003; Hou, 2012), com exceção da *Candida parapsilosis*, que mostrou um K_m maior (menor afinidade) para NADPH em relação ao NADH (Lee et al., 2003). A atividade xilose redutase na levedura *S. arborariae* HM19.1a exibiu um K_m de 100,6 μM e velocidade máxima de 0,28 U mg^{-1} quando a atividade foi determinada na presença de NADH, enquanto que quando acoplada ao NADPH exibiu uma atividade de alta afinidade com K_m de 10 μM e velocidade máxima de 0,65 U mg^{-1} (Figura 12).

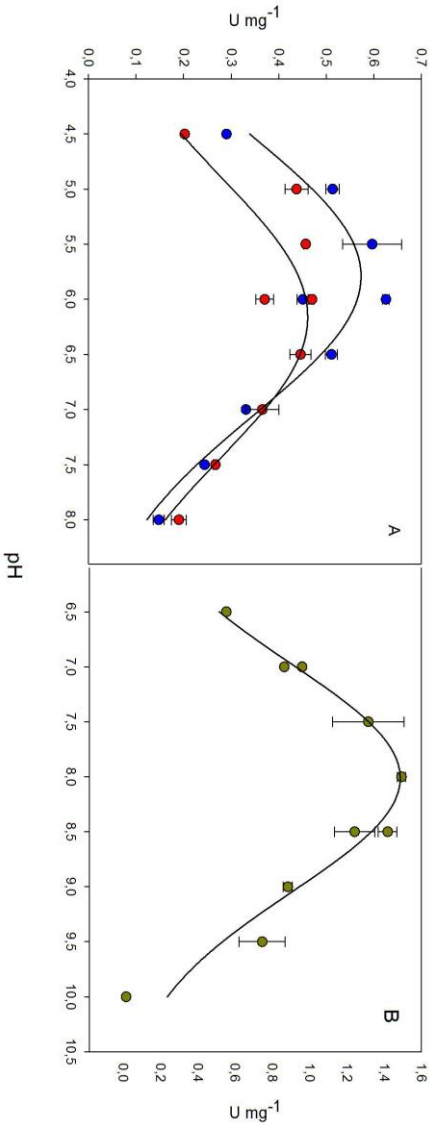


Figura 9 – Determinação do pH ótimo das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase na levedura *S. passalidarum* HMD16.1. A atividade da xilose redutase (A) acoplada a NADH (vermelho) e NADPH (azul), e a atividade da xilitol desidrogenase (B) acoplada a NAD⁺ (amarelo), foi determinada nos pHs indicados como descrito em Materiais e Métodos.

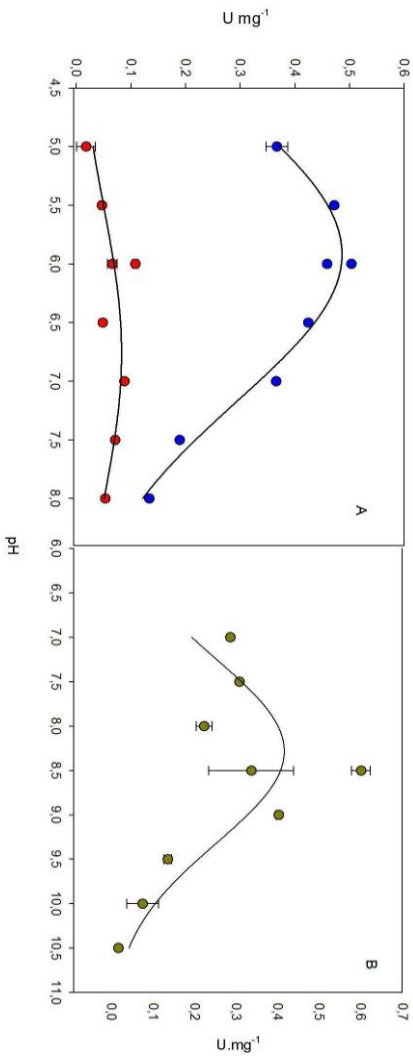


Figura 10 – Determinação do pH ótimo das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase na levedura *S. arborariae* HM19,1a. A atividade da xilose redutase (A) acoplada a NADH (vermelho) e NADPH (azul), e a atividade da xilitol desidrogenase (B) acoplada a NAD⁺ (amarelo), foi determinada nos pHs indicados como descrito em Materiais e Métodos.

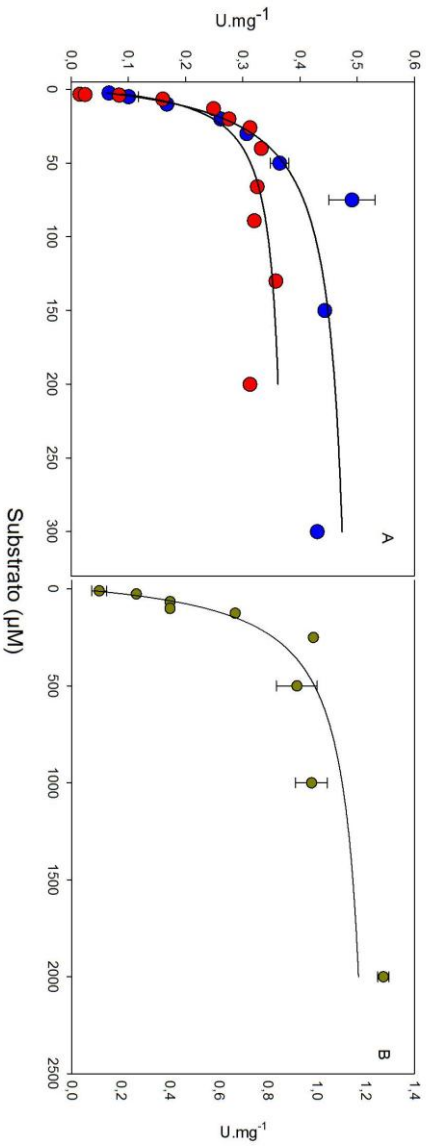


Figura 11 – Análise cinética das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase na levedura *S. passalidarum* HMD16.1. A atividade da xilose redutase (A) acoplada a NADH (vermelho) e NADPH (azul), e a atividade da xilitol desidrogenase (B) acoplada a NAD⁺ (amararelo), foi determinada nas concentrações dos cofatores indicados como descrito em Materiais e Métodos.

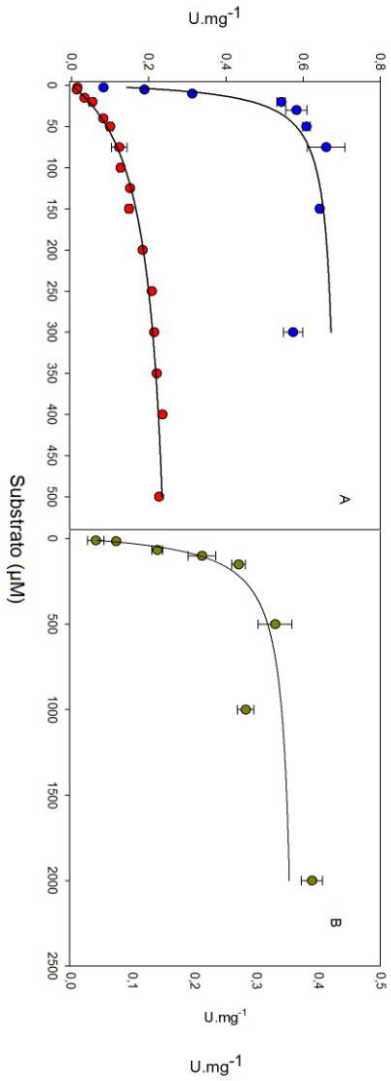


Figura 12 – Análise cinética das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase na levedura *S. arborariae* HM19.1a. A atividade da xilose redutase (A) acoplada a NADH (vermelho) e NADPH (azul), e a atividade da xilitol desidrogenase (B) acoplada a NAD^+ (amarelo), foi determinada nas concentrações indicadas dos cofatores como descrito em Materiais e Métodos.

A atividade xilitol desidrogenase na levedura *S. passalidarum* HMD16.1 possui um K_m de 100,5 μM e velocidade máxima de 0,25 U mg^{-1} com NAD^+ como cofator (Fig. 11), enquanto que na levedura *S. arborariae* HM19.1a a xilitol desidrogenase possui também uma relativa baixa afinidade, com um K_m de 90,2 μM e velocidade máxima de 0,07 U mg^{-1} , novamente utilizando NAD^+ como cofator (Fig. 12).

Os resultados obtidos indicam que no caso da levedura *S. passalidarum* a eficiente fermentação da xilose é provavelmente resultado das altas atividades xilose redutase (tanto com NADPH quanto com NADH como cofator), xilitol desidrogenase e xiluloquinase apresentadas por estas células. Entretanto, no caso da levedura *S. arborariae*, que também fermenta xilose eficientemente, as atividades enzimáticas obtidas foram relativamente baixas, além da xilose redutase ter pouquíssima atividade na presença de NADH . Desta forma, e considerando que outro fator limitante na metabolização de açúcares por leveduras é o transporte para o interior da célula, realizamos uma análise mais detalhada das atividades de co-transporte de H^+ -xilose e H^+ -glicose na levedura *S. arborariae* crescida em xilose ou glicose.

A análise do transporte ativo de açúcares por esta levedura crescida em glicose (Figura 13) revelou a presença de uma atividade de co-transporte H^+ -glicose de alta afinidade (K_m de 0,5 mM e velocidade máxima de 9,7 $\text{nmoles mg}^{-1} \text{min}^{-1}$), enquanto que utilizando xilose como substrato verificamos a presença de uma atividade simporte H^+ -xilose de menor afinidade (K_m de 12,4 mM e velocidade máxima de 11,7 $\text{nmoles mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) pelo açúcar (Figura 13). No caso das células crescidas em xilose (Figura 14), o co-transporte H^+ -glicose apresentou menor afinidade, mas uma capacidade maior (K_m de 1,8 mM e velocidade máxima de 20,7 $\text{nmoles mg}^{-1} \text{min}^{-1}$), sendo que o co-transporte H^+ -xilose (Figura 14) também apresentou menor afinidade mas capacidade maior (K_m de 25 mM e velocidade máxima de 35,3 $\text{nmoles mg}^{-1} \text{min}^{-1}$), quando comparado aos resultados obtidos com células crescidas em glicose.

É importante ressaltar que os resultados apresentados na Figura 13 e na Figura 14 não permitem fazer qualquer inferência sobre a possível existência (ou não) de transportadores de difusão facilitada para estes açúcares em *S. arborariae*, transportadores que em leveduras geralmente apresentam baixa afinidade, mas alta capacidade de transporte. Por exemplo, as leveduras *S. stiptis* exibem uma cinética bifásica de transporte de xilose, com um transporte ativo de alta afinidade e baixa capacidade (K_m de 0,2 mM e $V_{\text{máx}}$ de 2,1 $\text{nmoles mg}^{-1} \text{min}^{-1}$), e uma

atividade de baixa afinidade e maior capacidade (K_m de 19 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 30 nmoles $mg^{-1} min^{-1}$) provavelmente realizada por transportadores de difus\~ao facilitada (Weierstall et al., 1999). De fato, tr\~es transportadores (*SUT1-SUT3*) isolados desta levedura s\~ao anspportadores de xilose de baixa afinidade e alta capacidade, enquanto que os transportadores ativos de alta afinidade ainda n\~ao foram identificados molecularmente. (Weierstall et al., 1999).

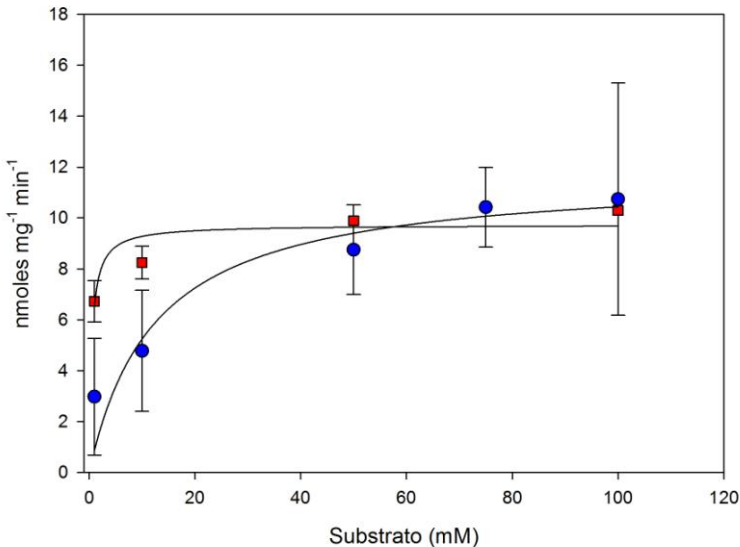


Figura 13 – Cinética de cotransporte H^+ -açúcar pela levedura *S. arborariae* HM19.1a crescida em glicose. O cotransporte de prótons durante a captação de glicose (quadrados vermelhos) ou xilose (círculos azuis) foi determinada com as concentrações de substrato indicadas em células previamente crescidas em glicose, como descrito em Materiais e Métodos.

Resultados semelhantes foram descritos por Stambuk et al. (2003), que mostraram que em células crescidas em xilose este açúcar é transportado ativamente com alta afinidade pela levedura *C. succiphila* (K_m de 3,8 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 15 nmoles $mg^{-1} min^{-1}$) e *K. marxianus* (K_m de 0,2 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 10 nmoles $mg^{-1} min^{-1}$), embora dependendo das condições de crescimento um transporte de difus\~ao facilitada com baixa afinidade e alta capacidade também é detectada. Na levedura *C. intermedia* crescida em xilose, Gardonyi et al. (2003) encontraram um

transporte ativo de alta afinidade para xilose (K_m de 0,2 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 125 nmoles $mg^{-1} min^{-1}$) e um outro sistema de difus\~ao facilitada com menor afinidade mas maior capacidade (K_m de 50 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 183 nmoles $mg^{-1} min^{-1}$). A linhagem de *S. arborariae* HM19.1a difere destas leveduras por possuir um transporte ativo de xilose com relativa baixa afinidade pelo substrato, quando comparado ao transporte ativo de glicose pelas mesmas c\~elulas.

Finalmente, cabe salientar que ap\~os a adi\~ao de glicose \~as c\~elulas de *S. arborariae*, depois da alcaliniza\~ao inicial devido ao influxo de pr\~otons para dentro da levedura, ocorreu uma acentuada acidifica\~ao do meio, o que n\~ao foi observado ap\~os a adi\~ao de xilose (dados n\~ao mostrados). Resultados semelhantes foram descritos para a levedura *C. intermedia* (Gardonyi et al., 2003). Acredita-se que esta acidifica\~ao seja provocada pela sabida ativa\~ao da H^+ -ATPase da membrana pela glicose (Lecchi et al., 2007).

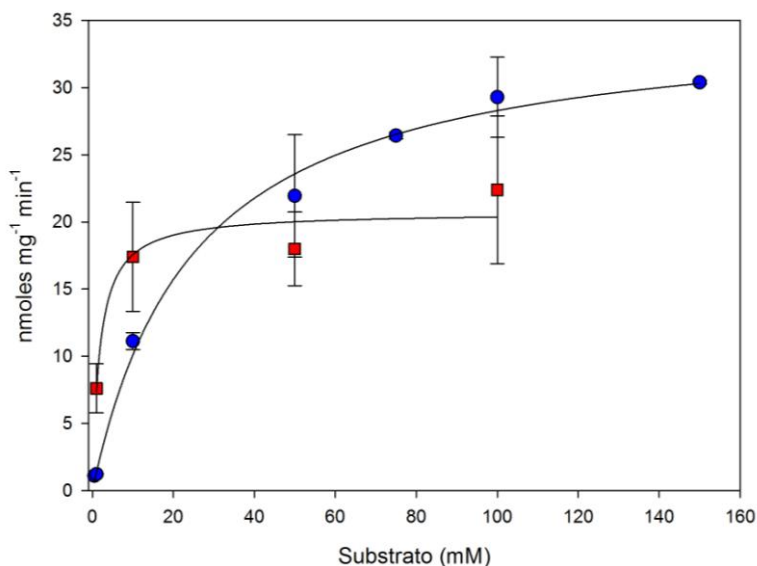


Figura 14 – Cinética de co-transporte H^+ -açúcar pela levedura *S. arborariae* HM19.1a crescida em xilose. O co-transporte de prótons durante a captação de glicose (quadrados vermelhos) ou xilose (círculos azuis) foi determinada com as concentrações de substrato indicadas em células previamente crescidas em xilose, como descrito em Materiais e Métodos.

4.2 FERMENTAÇÃO DE CELOBIOSE POR LEVEDURAS

Como mencionado no início dos Resultados, uma das leveduras fermentadoras de xilose, uma nova espécie de *Candida* (*C. queiroziae*), mostrou-se também boa fermentadora de celobiose. A Figura 15 mostra as cinéticas de crescimento em meio rico YP contendo 2% de glicose ou celobiose pelas linhagens de *C. queiroziae* CLM5.1 e IXM6.1. Como é possível verificar nesta figura, as células desta levedura foram capazes de fermentar eficientemente a glicose e celobiose, consumindo estes açúcares em aproximadamente 20 hs, produzindo 7-8 g L⁻¹ de etanol a partir de glicose, e 5-7,5 g L⁻¹ de etanol a partir da celobiose.

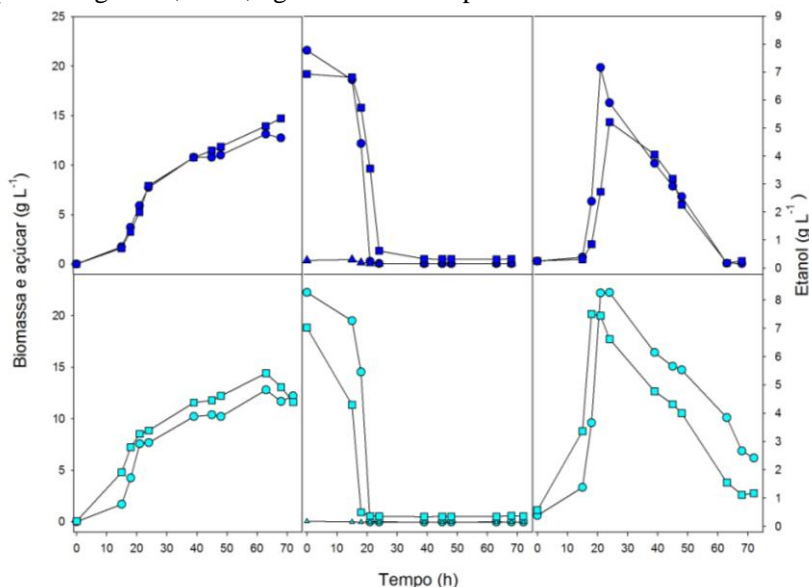


Figura 15 – Cinética de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol por *C. queiroziae*. Nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas da cultura para a determinação do crescimento celular (painéis à esquerda), consumo do açúcar (painéis centrais) e produção de etanol (painéis à direita) em meio YP contendo 2% de glicose (círculos) ou celobiose (quadrados), pelas linhagens *C. queiroziae* CLM5.1 (azul escuro) ou IXM6.1 (azul claro). No painel central é também mostrada a glicose (triângulos) produzida durante o consumo da celobiose.

As fermentações em batelada com altas concentrações de células (10 g L⁻¹) das leveduras *C. queiroziae* CLM5.1 e IXM6.1 em meios YP contendo 2% glicose ou celobiose (Figura 16) revelaram que estas leveduras consomem a celobiose um pouco mais lentamente do que a

glicose, com praticamente a mesma produção de etanol a partir de ambas as fontes de carbono. Entretanto, a ausência de glicose produzida/liberada no meio seja durante o crescimento em celobiose (Figura 15), seja durante a fermentação em batelada deste açúcar (Figura 16), nos levou a melhor caracterizar a localização celular da β -glicosidase responsável pela hidrólise da celobiose em *C. queiroziae*.

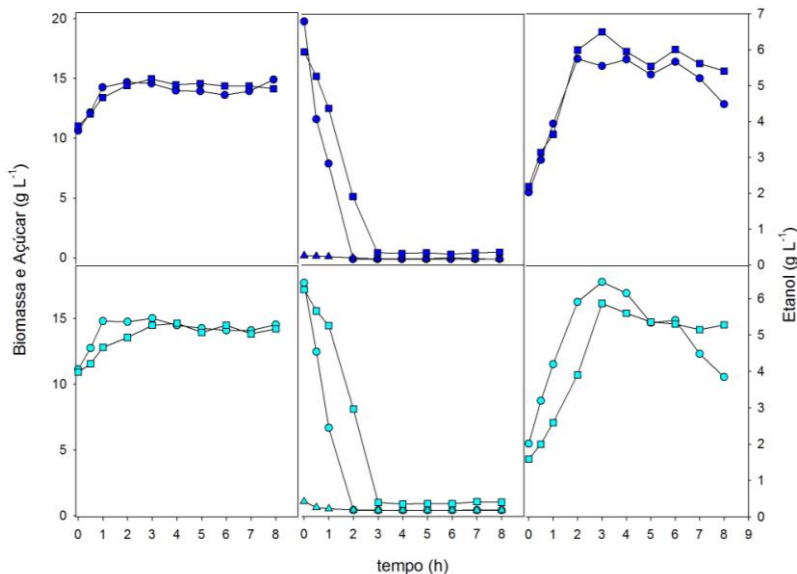


Figura 16 – Fermentação em batelada de glicose ou celobiose por *C. queiroziae*. Células das linhagens *C. queiroziae* CLM5.1 (azul escuro) ou IXM6.1 (azul claro), pré-crescidas em meio YP contendo glicose ou celobiose, foram utilizadas para fermentar meio YP contendo 2% de glicose (círculos) ou celobiose (quadrados), respectivamente. Nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas da cultura para a determinação do crescimento celular (painéis à esquerda), consumo do açúcar (painéis centrais) e produção de etanol (painéis à direita). No painel central é também mostrada a glicose (triângulos) produzida durante o consumo da celobiose.

A Figura 17 mostra a atividade β -glicosidase presente nestas leveduras, onde é possível verificar uma escassa atividade enzimática quando a β -glicosidase foi determinada em células inteiras (portanto uma possível enzima periplasmática) tanto no pH 5 quanto no pH 7, enquanto que a atividade enzimática determinada nas células permeabilizadas (uma enzima intracelular), mostrou uma significativa

atividade em pH 5 (29-47 nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$), mas principalmente no pH 7 (167-230 nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$), o que indica a presença de uma enzima β -glicosidase intracelular em *C. queiroziae*. Quando estas leveduras foram crescidas em meio YP contendo 2% glicose, não foi possível detectar a atividade β -glicosidase. De fato, Liu et al. (2012) também descreveram uma β -glicosidase em extratos celulares da levedura *Clavispora* sp., e observaram baixa atividade da enzima nas células crescidas em glicose.

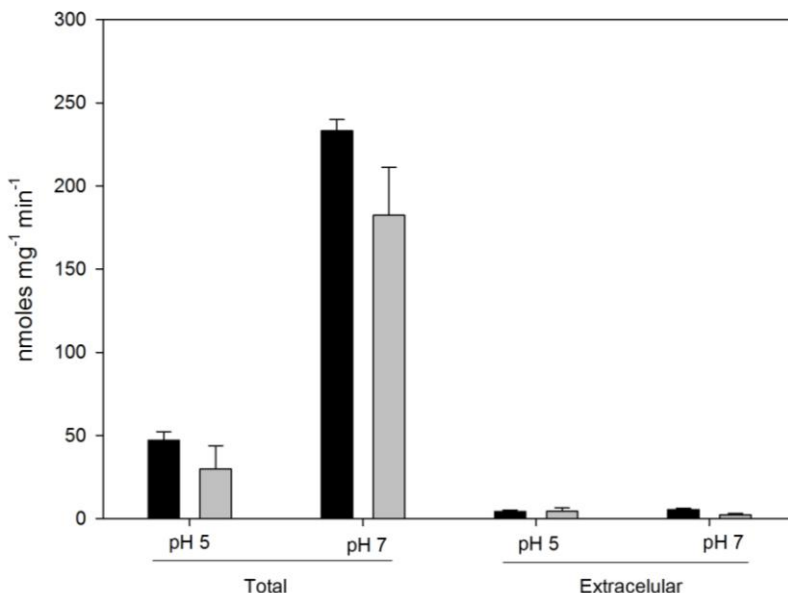


Figura 17 – Atividade β -glicosidase na levedura *C. queiroziae* CLM5.1 e IXM 6.1. Após crescimento da levedura CLM5.1 (barra preta) e IXM 6.1 (barra cinza) em meio YP contendo 2% de celobiose, a atividade da β -glicosidase foi determinada com celobiose em células inteiras (atividade extracelular) ou células permeabilizadas (atividade total) no pH 5,0 ou 7,0, como descrito em Material e Métodos.

Uma análise mais detalhada do pH ótimo da β -glicosidase nas células permeabilizadas da levedura *C. queiroziae* CLM5.1 (Figura 18), utilizando o substrato sintético análogo à celobiose *p*-nitrofenil- β -glicopiranosídeo (*p*NP β G), mostrou uma atividade ótima no pH 7,5. Nestas condições as células permeabilizadas de *C. queiroziae* foram também capazes de hidrolisar o substrato sintético análogo à celotriose *p*-nitrofenil- β -celobiosídeo (*p*NP β C), porém com uma atividade (19,3

nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) significativamente menor do que a observada com $p\text{NP}\beta\text{G}$ nas mesmas condições (vide Figura 18). O pH ótimo da β -glicosidase intracelular de *C. queiroziae* difere do que já se tem descrito para outras leveduras, que apresentam uma melhor atividade enzimática no pH 6,0 (Leclerc et al., 1984; Rosi et al., 1994).

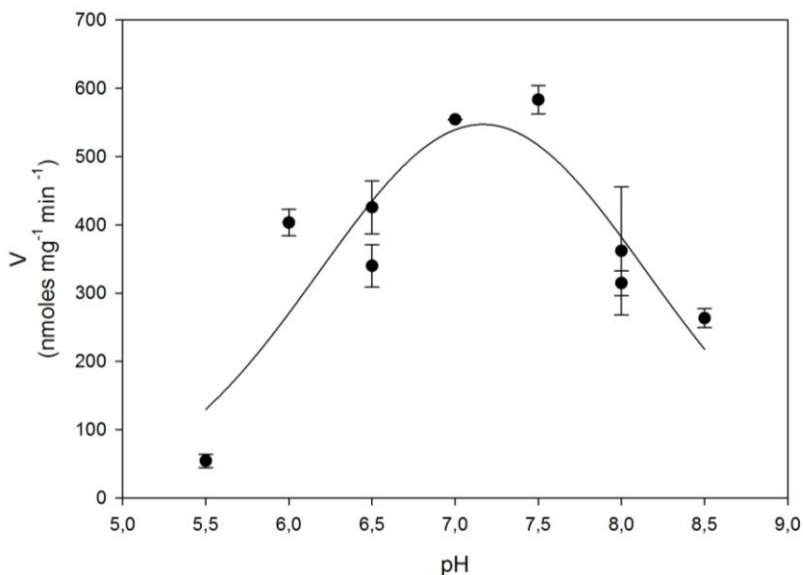


Figura 18 – Determinação do pH ótimo da enzima β -glicosidase na levedura *C. queiroziae* CLM5.1. Após crescimento da levedura em meio YP contendo 2% de celobiose, a atividade da β -glicosidase foi determinada com $p\text{NP}\beta\text{C}$ em células permeabilizadas e nos pHs indicados, como descrito em Material e Métodos.

A análise cinética da β -glicosidase intracelular da levedura *C. queiroziae* CLM5.1 (Figura 19) revelou uma atividade de hidrólise de celobiose com um K_m de 4,7 mM e velocidade máxima de 68 nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, e uma maior afinidade e velocidade máxima de hidrólise utilizando o substrato $p\text{NP}\beta\text{G}$ (K_m de 0,13 mM e $V_{\text{máx}}$ de 433 nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$).

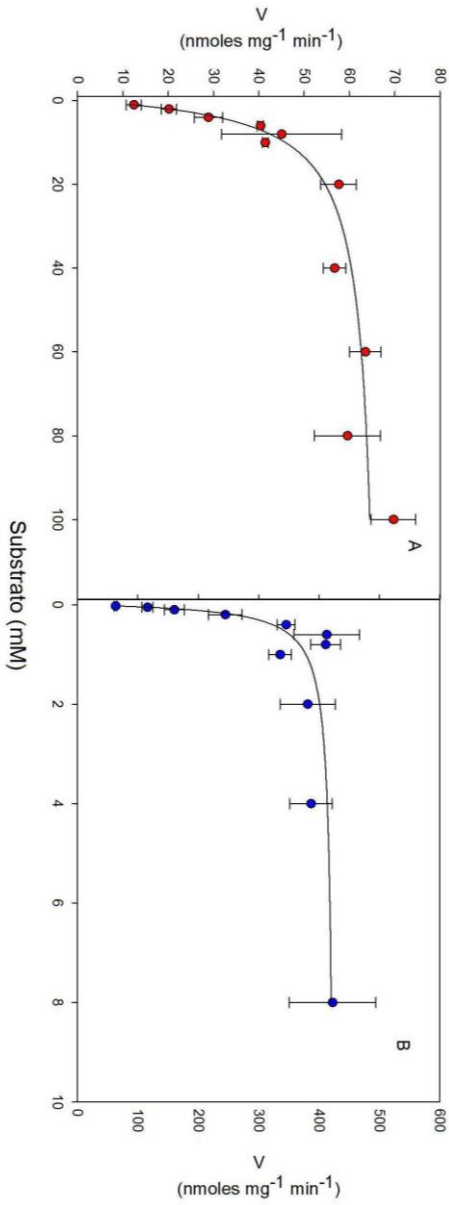


Figura 19 – Análise cinética da atividade β -galactosidase em *C. queiroziae* CLM5.1. Após crescimento da levedura em meio YP contendo 2% de celobiose, a atividade da β -galactosidase foi determinada em células permeabilizadas com as concentrações indicadas de celobiose (A), ou pNPP β C (B), como descrito em Material e Métodos.

Os resultados que mostram que na levedura *C. queiroziae* a celobiose é hidrolisada intracelularmente, indicavam que este açúcar teria que ser transportado através da membrana plasmática para poder ser metabolizado pelas células. Desta forma, foram utilizados substratos sintéticos análogos à celobiose e celotriose para caracterizar colorimetricamente a atividade de transporte destes açúcares por *C. queiroziae*, numa metodologia adaptada do protocolo descrito por Hollatz e Stambuk (2001) para estudar o transporte ativo de α -glicosídeos por leveduras. Inicialmente verificou-se que o pH ótimo de transporte de *pNP β G* era o pH 4,75 (dados não mostrados). A caracterização cinética do transporte neste pH (Figura 20) revelou que células de *C. queiroziae* crescidas em celobiose apresentam uma atividade de transporte com um K_m de $14,8 \pm 4,1$ mM e uma velocidade máxima de $4,2 \pm 0,6$ nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ para o substrato *pNP β G*, e um K_m de $6,8 \pm 1,5$ mM e uma velocidade máxima de $1,1 \pm 0,1$ nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ com o substrato *pNP β C*.

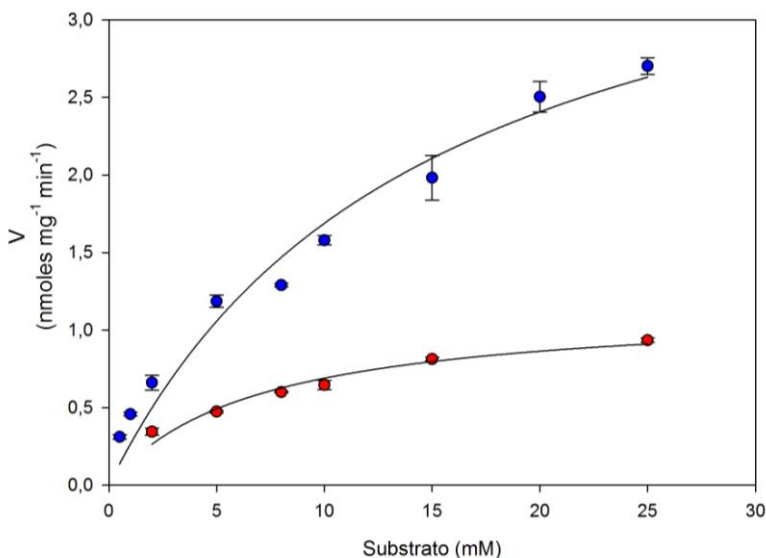


Figura 20 – Cinética de transporte de *pNP β G* e *pNP β C* pela levedura *C. queiroziae* CLM5.1. Após crescimento da levedura em meio YP contendo 2% de celobiose, a atividade de transporte das concentrações indicadas dos substratos sintéticos *pNP β G* (círculos azuis) ou *pNP β C* (círculos vermelhos) foi determinada colorimetricamente como descrito em Material e Métodos.

Como esta atividade de transporte é aparentemente um transporte ativo, uma vez que o desacoplador pCMPS inibiu em 50% o transporte de $pNP\beta G$ e $pNP\beta C$ (dados não mostrados), a seguir determinou-se a cinética de co-transporte de H^+ -celobiose pelas células da levedura *C. queiroziae* crescidas nesta fonte de carbono. Como pode ser observado na Figura 21, esta levedura apresenta um transporte ativo de H^+ -celobiose com um K_m de 1,5 mM e velocidade máxima de $18,5 \text{ nmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, e um co-transporte de H^+ -glicose com um K_m de 3 mM e velocidade máxima de $17 \text{ nmoles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Dados semelhantes foram publicados por Freer et al. (1990), que também descreveram um transporte ativo de alta afinidade para celobiose e glicose, por co-transporte de prótons, pelo fato desses sistemas terem sido sensíveis ao uso de protonóforos. Finalmente, cabe salientar que células de *C. queiroziae* pré-crescidas em glicose não apresentaram co-transporte de H^+ com celobiose nem glicose.

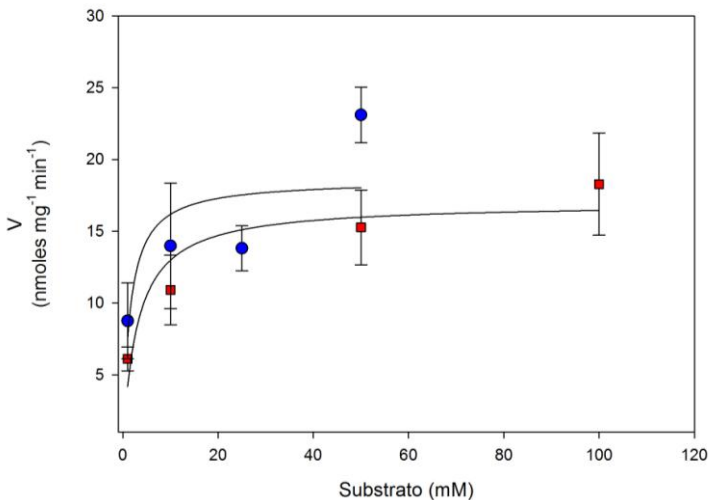


Figura 21 – Cinética de co-transporte H^+ -açúcar pela levedura *C. queiroziae* CLM5.1 crescida em celobiose. O co-transporte de prótons durante a captação de glicose (quadrados vermelhos) ou celobiose (círculos azuis) foi determinada com as concentrações de substrato indicadas em células previamente crescidas em celobiose, como descrito em Materiais e Métodos.

5 CONCLUSÕES

As leveduras isoladas de madeira em decomposição de vários ecossistemas Brasileiros mostraram diferentes perfis de fermentação de xilose. Dentre essas, as leveduras do clado *Spathaspora*, particularmente a espécie *S. passalidarum*, fermentam eficientemente a xilose, quando comparado com a fermentação de glicose pelas células. Na levedura *S. passalidarum* as enzimas envolvidas na metabolização de xilose não só apresentaram maior atividade, mas a enzima xilose redutase mostrou um K_m de maior afinidade para o cofator NADH, em relação ao NADPH, enquanto que a enzima xilitol desidrogenase mostrou uma total dependência no cofator NAD^+ . Esta condição torna esta levedura bastante interessante, já que a grande limitação do metabolismo de xilose em leveduras é o desbalanço de cofatores, e a correção deste desbalanço permite uma maior produção de etanol, com menor acúmulo de xilitol. Embora a levedura *S. arborariae* apresente uma xilose redutase dependente de NADPH, esta levedura fermenta eficientemente a xilose por apresentar um sistema de co-transporte H^+ -xilose de alta capacidade, o que deve contribuir para sua performance fermentativa já o que o transporte é considerado outro fator limitante no metabolismo da xilose.

Por outro lado as leveduras da espécie *C. queiroziae* foram capazes de fermentar eficientemente celobiose por apresentarem uma β -glicosidase intracelular, e um sistema de co-transporte H^+ -celobiose de alta afinidade, sendo esta a condição necessária para uma eficiente fermentação simultânea dos açúcares que estão presentes nos hidrolisados lignocelulósicos pois minimiza a repressão catabólica exercida pela glicose em relação à metabolização da xilose e celobiose. A otimização do processo fermentativo depende da eficiente utilização de todos os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica pela levedura *S. cerevisiae*. Neste sentido, o presente trabalho mostrou, através das análises de transporte e fermentação de celobiose e xilose, que estas leveduras isoladas da biodiversidade brasileira podem ser uma interessante fonte de novas enzimas e/ou transportadores para a fermentação destes açúcares, permitindo a futura otimização da produção de bioetanol no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES JR, S.L.; HERBERTS, R.A.; HOLLATS, C.; MILLET, L.C.; STAMBUK, B.U. Maltose and Maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of American Society of Brewing Chemists**. v. 65, p. 99-104, 2007.

ANDERSON, W. F.; AKIN, D. E. Structural and chemical properties of grass lignocelluloses related to conversion for biofuels. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35(5), p. 355-66, 2008

BANSAL, P; HALL, M; REALFF, M. J.; LEE, J.H.; BOMMARIUS, A. S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**. v. 27, p.833-848, 2009.

BARBOSA, A.C.; CADETE, R.M.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M-A.; ROSA, C.A. *Candida materiae* sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood in the Atlantic Rain Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**.v. 59, p. 2014-16, 2009.

BENGTSSON, O.; HAHN-HÄGERDALL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Xylose reductase from *Pichia stipitis* with altered coenzyme preference improves ethanolic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**. 2:9, 2009.

BEZERRA, R. M.; DIAS, A. A. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis: inhibition by ethanol and cellobiose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 126(1), p.49-59, 2005

BRAT, D, BOLES, E.,WIEDEMANN, B. Functional Expression of a Bacterial Xylose Isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, p. 2304-11, 2009.

CADETE, R. M. ; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D. L.; STAMBUK, B.U.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M-A; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp.

nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p.1338-1342, 2009

CARIOCA, J.O. Biofuels: problems, challenges and perspectives. **Journal of Biotechnology**. v. 5(3), p. 260-73, 2010

CUNHA-PEREIRA, F. da; HICKERT, L.R.; SEHNEM, N.T.; SOUZA-CRUZ, P.B. de; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**. v.102, p. 4219-25, 2011.

DARIO, M.G. Análise molecular do metabolismo de sacarose por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção industrial de álcool combustível. Dissertação de mestrado em Biotecnologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

DASHTBAN, M; SCHRAFT, H; QIN, W. .Fungal bioconversion of lignocellulosic residuos; opportunities & perspectives.l **International Journal of Biological Sciences**. v. 5, p. 578-595, 2009

DU, J.; LI, SIJIN.; ZHAO, HUIMIN. Discovery and characterization of novel D-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stiptis*. **Molecular Biosystems**. V 11, p. 2150-2156, 2010.

ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, F.C.; HAHN-HÄGERDALL, B. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2 and XSK1 in mineral medium chemostat cultures. **Applied and Environmental Microbiology**.v. 66(8), p. 3381-3383, 2000.

FLANAGAN, T. & WAITES. M.J. Purification and characterization of d-xyluloquinase from the pentose-fermenting yeast *Pichia stiptis* NCYC 1541. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 14, p. 975-980, 1992.

FREER, S. N.; GREENE, R.V. Transport of glucose and cellobiose by *Candida wickerhamii* and *Candida lusitanae*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 265 p. 12864-12868, 1990

FREER, S. N. Kinetic Characterization of β -glucosidase from a Yeast, *Candida wickerhamii*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, p. 9337-9342, 1993

JEFFRIES T. W.; KURTZMAN C.P. Strain selection, taxonomy, and genetics of xilose-fermenting yeasts, **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16 , p. 922-932, 1994

JEFFRIES, T. W., ALEXANDER, M. A. Production of ethanol from xylose by *Candida shehatae* grown under continuous or fed-batch conditions. *In*: KIRK, T. K.; CHANG, H-M. **Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1990. p. 311-321.

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

JEFFRIES T. W & HEADMAN, J.R. *Pichia stiptis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. **FEMS Yeast research**. v.9, p. 793-807, 2009.

JOJIMA, T.; OMUMASABA, C.A.; INUI, M.; YUKAWA, H. Sugars transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 85, p. 471-480, 2010.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35(5), p. 377-91, 2008.

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

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in**

Biochemical Engineering/Biotechnology. v. 108, p. 41-65, 2007.

GÁRDONYI, M.; ÖSTERBERG, M.; RODRIGUES, C; SPENCER-MARTINS, I; HAHN-HÄGERDALL. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research.** v.3, p. 45-52, 2003.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science.** v. 5813, p. 808-10, 2007

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

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

GONÇALVES, D.L. Produção de Álcool Combustível a Partir de Hidrolizados Enzimáticos de Bagaço de Cana de Açúcar por Leveduras Industriais e Leveduras Fermentadoras de Xilose. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

GUNATA, Y. Z.; BAYONOVE, C. L.; ARNAUD, A.; GALZY, P. Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii* B-glucosidases. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** v.50, p. 499-506, 1990.

HA, S.; GALASKA, J.M.; KIM, S.R.; CHOI, J.; YANG, X.; SEO, J.; GLASS, N.L.; CATE, J.H.D.; JIN, Y. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.** v. 108, p. 504-509, 2011.

HAHN-HAGERDAL B; JEPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 16, p. 933-943, 1994.

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

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

HOLLATZ, C.; STAMBUK, B.U. Colorimetric determination of active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 46, p.253-259, 2001.

HOU. X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 94(1), p. 205-14, 2012.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG E. L.; HOWARD S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**. v. 2, p. 602–619, 2003

KILIAN S. G.; PRIOR, B. A.; DU PREEZ, J. C. The kinetics and regulation of M-xylose transport in *Candida utilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 9, p. 357–360, 1993

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

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

LEANDRO, M.;SPENCER-MARTINS, I GONÇALVES, P. The expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a glucose/xylose symporter from *Candida intermedia* is affected by the presence of

a glucose/xylose facilitador. **Microbiology**. v. 154, p. 1646-1655, 2008.

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

LECCHI, S.; NELSON, C.J.; ALEEN, K.E.; SWANEY, D.L.; THOMPSON, K.L.; COON, J.J.; SUSSMAN, M.R.; SLAYMAN, C.W. Tandem Phosphorylation of Ser-911 and Thr-912 at the C-Terminus of Yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase Leads to Glucose-dependent Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n 49, p.35471-81, 2007.

LECLERC, M.; AMAUD, A.; RATOMAHENINA, R.; GALZY, P; NICOLAS, M. The enzyme system in a strain of *Candida wickerhamii* Meyer and Yarrow participating in the hydrolysis of cellodextrins. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 30, p. 509-521, 1984.

LEE, H.; JAMES, A.P.; ZAHAB, D.M.; MAHMOURIDES, G.; MALESKA, R.; SCHNEIDER, H. Mutants of *Pachysolen tannophilus* with improved production of ethanol from d-xylose. **Applied and Environmental Microbiology** v. 51, p.1252-58, 1986.

LEE, H. The Structure and Function of Yeast Xylose (Aldose) Reductases. **Yeast**. v. 14, p. 977-984, 1998.

LEE, J.; KOO, B.; KIM, S.; Cloning and Characterization of the xyl1 Gene, Encoding an NADH-Preferring Xylose Reductase from *Candida parapsilosis*, and Its Functional Expression in *Candida tropicalis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p.6179-6188, 2003.

LIU, Z.L.; WEBER, S.A.; COTTA, M.A.; LI, S. A new β -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**. v.104, p. 410-416, 2012.

LI S.; DU, J.; SUN, J.; GALASKA, J.M.; GLASS, N.L.; CATE, J.H.D.; YANG, X.; ZHAO, H. Overcoming glucose repression in mixed sugar fermentation by co-expressing a cellobiose transporter and a β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biosystems**. v. 6, p. 2129-2132, 2010.

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. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 82, p. 1067-1078, 2009.

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

MATSUSHIKA, A.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase , NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase, and xyluloquinase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**.v. 105; p. 296-299, 2008b.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 84, p. 37-53, 2009a.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; MAIKINO, K & SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production by a recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain with a genome-integrated NADP⁺ dependent xylitol dehydrogenase gene. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, p.3818-3822, 2009c.

METZGER, M.H. & HOLLENBERG, C.P. Isolation and Characterization of the *Pichia stiptis* Transketolase Gene and Expression in a Xylose –Utilising *Saccharomyces cerevisiae* Transformant. **Applied Microbiology and Biotechnology**.v. 42, p. 319-325, 1994.

METZGER, M.H. & HOLLENBERG, C.P. Amino Acid Substitutions in the Yeast *Pichia Stiptis* Xylitol Dehydrogenase Coenzyme-Binding Domain Affect the Coenzyme Specificity. **European Journal of Biochemistry**. v. 228, p. 50-54, 1995.

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

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

RIZZI, M.; HARWART, K.; ERLEMANN, P.; BUI-THANH, N.; DELLWEG, H. Purification and Properties of the NAD⁺ - Xylitol Dehydrogenase from the *Pichia stiptis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.67, p.20-24, 1989.

ROSI, I.; VINELLA, M.; DOMIZIO, P. Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 77 p. 519-527, 1994.

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

SANDERSON, K. Biofuels. **Nature**.v 474, n° 7352, s 12-s.14, 2010.

SANTOS, R.O.; CADETE, R.M.; BADOTTI, F.; MOURO, A.; WALLHEIM, D.O.; GOMES, F.C.O.; STAMBUK, B.U.; LACHANCE, M-A; ROSA, C.A. *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 99, p. 635-642, 2011.

SHAMANNA, D.K. & SANDERSON, K.E. Uptake and catabolism of d-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. **Journal of Bacteriology**. v. 139, p.64-70, 1979.

SILVEIRA, M.C.F.; CARVAJAL, E.; BON, E.P.S. Assay for *in vivo* yeast invertase activity using NAF. **Analytical Biochemistry**. v. 238, p. 26-28, 1996.

SMILEY, K.L.& BOLEN, P.L. Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology letters** v. 4, p. 607-10, 1982.

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

STAMBUK, B. U. A simple experiment illustrating metabolic regulation: induction versus repression of yeast α -glucosidase. **Biochemical Education**. v.27, p. 178-181, 1999.

STAMBUK, B. U.; FRANDEN, M. A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-xylose transport by *Candida Succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.105-108 p. 255-263, 2003.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. A. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; Bom, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**. v. 67, p. 918 926, 2008.

SUH, S-O.; BLACKWELL, M. Three new beetle-associated yeast species in the *Pichia guilliermondii* clade. **FEMS Yeast Research**. v. 5, p.87-95, 2004.

WALFRIDSSON, M.; HALLBORN, J.; PENTTILÄ, M.; KERÄNEN, S.; HAHN-HÄGERDALL, B. Xylose-Metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* Strains Overexpressing the TKL1 and TAL1 Genes Encoding the Pentose Phosphate Pathway Enzymes Transketolase and Transaldolase. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61(12), p. 4184-4190, 1995.

WANG, X.; FANG, B.; LUO, J.; LI, W.; ZHANG, L. Heterologous expression, purification, and characterization of xylose reductase from *Candida shehatae*. **Biotechnology letters**. v. 29, p. 1409-12, 2007.

WATANABE, S.; SALEH, A.A.; PACK, S.P.; ANNALRU, N.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein engineered NADP+ - dependent xylitol dehydrogenase. *Journal of Biotechnology* . v. 130, p. 316-319, 2007.

WEIERSTALL, T.; HOLLENBERG, C.P.; BOLES, E. Cloning and characterization of three genes (SUT 1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. **Molecular Microbiology**. v. 31, p. 871-883, 1999.

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

TANINO, T., HOTTA, A., ITO, T., ISHII, JUN., YAMADA, R., HASUNUMA, T., OGINO, O., 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. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 88, p. 1215-21, 2010.

TOIVARI, M.H.; ARISTIDOU, A.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. C. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of xylulokinase (XKS1) and oxygen availability. **Metabolic Engineering**. v. 3, p. 236-49, 2001.

VASSEROT, Y.; CHRISTIAENS, H.; CHEMARDIN, P.; AMAUD, A.; GALZY, P. Purification and properties of a β -glucosidase of *Hanseniaspora vineae* Van der Walt and Tscheuschner with the view to its utilization in fruit aroma liberation. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 66, p. 271-279, 1989.

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

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

ZHANG, F.; QIAO, D.; XU, H.;LIAO, C.; LI, S.; CAO, Y. Cloning, expression, and characterization of xylose reductase with higher activity from *Candida tropicalis*. **The Journal of Microbiology**. v.47, p.351-57, 2009.

APÊNDICE

Publicações em periódicos vinculadas a esta dissertação:

SANTOS, R.O.; CADETE, R.M.; BADOTTI, F.; MOURO, A.; WALLHEIM, D.O.; GOMES, F.C.O.; STAMBUK, B.U.; LACHANCE, M-A; ROSA, C.A. *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 99, p. 635-642, 2011.