

**Denis Dall Agnolo**

Análise de Supressores da Fermentação de  
Xilose em *Saccharomyces cerevisiae*

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

Orientador: Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

Florianópolis

2014

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

Agnolo, Denis Dall

Análise de Supressores da Fermentação de Xilose em  
*Saccharomyces cerevisiae* / Denis Dall Agnolo ; orientador,  
Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk - Florianópolis, SC, 2014.  
148 p.

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

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. BUD21. 3. PHO13. 4.  
*Saccharomyces cerevisiae*. 5. xilose. I. Juan Carlos Ugarte  
Stambuk, Boris. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e  
Biociências. III. Título.

**“Análise de Supressores da Fermentação de Xilose em  
*Saccharomyces cerevisiae*”.**

por

**Denis Dall Agnolo** Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 12/PPGBTC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:



---

**Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk** (BQA/CCB/UFSC)

Banca examinadora:



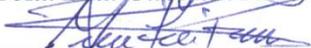
---

**Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert** - FEA/UNICAMP



---

**Prof. Dra. Gabriela Müller** - MIP/CCB/UFSC



---

**Prof. Dr. Marcio José Rossi** - MIP/CCB/UFSC

Coordenador:



---

**Prof. Dr. Marcelo Maraschin**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 09 de maio de 2014.



*Dedico esta Dissertação de Mestrado aos meus pais, Ivanir e Dario, por serem meu porto seguro e meus exemplos a seguir. Amo vocês!*



## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desse mestrado, seja de forma direta ou indireta.

Primeiramente, agradeço ao professor Boris Stambuk pela orientação, ensinamentos e ainda pelas valiosas contribuições na finalização dessa dissertação. Obrigado pela oportunidade de fazer meu mestrado em seu laboratório.

Agradeço ainda aos professores Sonia Carobrez, Jamil Assreyu e Tadeu Lemos, por me apoiarem nessa jornada. Graças a vocês pude conciliar o mestrado com minhas atividades de servidor da UFSC.

À UFSC, por permitir que eu dedicasse parte a minha jornada laboral aos estudos.

Aos professores e colegas do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, pelos conhecimentos compartilhados e a atenção despendida. Agradeço em especial ao professor Marcelo Maraschin pelo apoio em meu pedido de prorrogação.

Aos servidores da Secretaria Integrada da Pós Graduação pela atenção e prontidão sempre que necessário. Agradeço em especial à Joice, por toda a ajuda com a documentação da minha defesa e demais trâmites burocráticos.

Sem elas tudo seria muito mais difícil. Assim, agradeço de forma muito especial às minhas queridas amigas e colegas de trabalho, Bibiana e Vanessa, pelo ótimo convívio diário, pelas risadas, pela amizade e também por assumirem parte das minhas funções no LAMEB durante meu afastamento. Graças a vocês pude concluir essa etapa com alguma tranquilidade. Muitíssimo obrigado! Vocês são D+. Agradeço ainda aos meus amigos e colegas do Lameb II, Chirle, Demétrio e Emily.

Aos todos os meus amigos do futebol do time da LDU, pela parceria e amizade.

Aos meus amigos "pernas-de-pau" da panela Belezita, Ale, MDP, Diogo, Daniel e Vianeí. Um dia vocês chegarão no meu nível futebolístico...

Aos meus amigos do grupo Putanasiê, Gustavo, Márcio, Michelle, Elaine, Jean, Marcelly, Rene e Karla, pela amizade sincera e pelos momentos inesquecíveis. E sim, é claro, pelos ótimos jantares no Outback!

Aos meus queridos amigos da faculdade (Bio 2003-1), Mariana, Macca, Gustavo, Hugo, Cristina, Camila, Laura, Jacó, Lila, Paulo, Moreti e Caca. A amizade de vocês irei carregar para sempre.

Aos meus amigos de longa data, Paulo, Jones, Rene e Guto. Quando junta essa turma não sai nada que presta. Saudades de vocês.

Aos meus companheiros de morada Bruno e Abu, por me aturarem diariamente. É gratificante compartilhar meu hábitat com vocês.

Aos meus amigos e colegas do laboratório LMBML, Gabriela, Victor, Belisa, Davi, Adri, Bruna, Guto, Marília, Margareth e Dani, pela ótima companhia nesses dois anos, pelas trocas de conhecimentos e por todos os momentos de descontração. Agradeço ainda à Gabriela por toda ajuda nos primeiros meses no laboratório e à Belisa por todo o suporte prestado com o HPLC.

Aos meus diversos amigos espalhados por todos os cantos. Chuck, Rampinelli, Iza, Lu, Pati, Dailine, Jéssica, Nakama, Zé, Félix, Alce, Ale, Mari, Yara, Aline, Wagner, Gianni, Marcão, Anderson, Day e tantos outros... e também aos meus tantos amigos dos corredores do CCB. Obrigado pela amizade de vocês.

Aos meus amados sobrinhos, Livia e Leonardo, por serem tão naturalmente lindos e por sempre me presentear com sorrisos e abraços verdadeiros.

Aos meus irmãos, Priscila e Douglas, os quais tenho um enorme carinho e admiração. E ainda aos meus cunhados Alessandro e Thayse, por serem pessoas especiais em nossa família.

E por fim, agradeço carinhosamente aos meus pais, Ivanir e Dario. Não apenas por vocês serem os melhores do mundo, mas também pelo apoio em todas as horas, pelos conselhos e exemplos dados e, até mesmo pelas palmadas e puxões de orelhas (que não foram poucos). Tudo o que vocês me ensinaram foi fundamental para o meu crescimento pessoal e sucesso profissional.

*"O sucesso é ir de fracasso em fracasso  
sem perder entusiasmo"*

**Winston Churchill**



## RESUMO

AGNOLO, D. D. **Análise de Supressores da Fermentação de Xilose em *Saccharomyces cerevisiae***. 148 fls. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

O Brasil se destaca como o segundo maior produtor mundial de bioetanol, sendo detentor do processo de produção mais eficaz e rentável, baseado exclusivamente na utilização da cana-de-açúcar. Porém, apenas um terço de sua biomassa é utilizado para produção de bioetanol. O restante da biomassa (bagaço, folhas e palha) é queimado para a produção de vapor e eletricidade. Estes materiais são compostos majoritariamente de fibras de lignocelulose que são extremamente ricas em açúcares, apresentando grande potencial para produção adicional de bioetanol. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais amplamente utilizado na produção industrial de etanol, sendo capaz de fermentar eficientemente açúcares como a sacarose (principal açúcar presente na cana-de-açúcar) e hexoses. No entanto, essa levedura, em sua condição natural, é incapaz de fermentar pentoses como a xilose, o segundo açúcar mais abundante na biomassa da cana-de-açúcar. O sucesso das tecnologias de produção de biocombustíveis de segunda geração depende, portanto, de leveduras capazes de fermentar tanto as hexoses quanto as pentoses presentes na biomassa lignocelulósica. Recentemente, alguns estudos têm reportado que os genes *BUD21* e *PHO13* funcionam como possíveis supressores da metabolização de xilose em *S. cerevisiae*. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da deleção dos referidos genes em linhagens industriais diploides utilizadas para a produção de etanol combustível no Brasil. Para tanto, utilizou-se técnicas de biologia molecular baseadas em recombinação homóloga para deletar do genoma de *S. cerevisiae* o(s) gene(s) *BUD21* e *PHO13*. Nossos resultados mostraram que linhagens de laboratório com deleção do gene *BUD21* (*bud21Δ*) foram incapazes de utilizar xilose como fonte de carbono, sugerindo que este gene não é um supressor da metabolização de xilose nas leveduras analisadas. Numa segunda abordagem, o gene *PHO13* foi deletado numa levedura industrial diploide recombinante que sobre-expressa os genes necessários à metabolização de xilose (genes *XYL1*, *XYL2* e *XKS1*). A linhagem industrial *pho13Δ* / *pho13Δ* foi capaz de crescer em meios sólidos contendo altas concentrações de xilose, e em cultivos em frascos agitados, a deleção do gene *PHO13* melhorou significativamente o

consumo da xilose, bem como a produção de biomassa e de etanol pela linhagem industrial recombinante. No entanto, ensaios de fermentação em batelada simples em condições microaeróbias revelaram que a deleção do *PHO13* não melhora a fermentação da xilose. Resultados semelhantes foram encontrados nos ensaios de co-fermentações de xilose/glicose e xilose/sacarose.

**Palavras-chave:** *BUD21*, *PHO13*, *Saccharomyces cerevisiae*, xilose, fermentação.

## ABSTRACT

AGNOLO, D. D. **Analysis of Xylose Fermentation Suppressors in *Saccharomyces cerevisiae***. 148 fls. Dissertation (Master in Biotechnology and Life Sciences) - Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

Brazil stands as the second largest world producer of bioethanol, having the most efficient and profitable production process, based exclusively on the use of sugarcane. However, only a third of its biomass is used for bioethanol production. The remaining biomass (bagasse, leaves and straw) is burned to produce steam and electricity. These materials are composed mostly of lignocellulosic fibers that are extremely rich in sugars, with great potential for further production of bioethanol. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the microorganism most widely used in the industrial production of ethanol, been able to efficiently ferment sugars such as sucrose (the principal sugar present sugarcane) and hexoses. However, this yeast, in its natural condition, is unable to ferment pentoses such as xylose, the second most abundant sugar in the sugarcane biomass. The success of the technologies of second generation biofuels production, therefore, depends on yeast capable of fermenting hexoses as well as pentoses present in the lignocellulosic biomass. Recently some studies have reported that the *BUD21* and *PHO13* genes function as potential suppressors of xylose metabolism in *S. cerevisiae*. The aim of this study was to evaluate the effect of the deletion of these genes in diploid industrial strains used for the production of fuel ethanol in Brazil. For this, we used molecular biology techniques based on homologous recombination to delete the *BUD21* and *PHO13* gene(s) from the *S. cerevisiae* genome. Our results showed that laboratory strains deleted in the *BUD21* gene (*bud21*Δ) were unable to use xylose as a carbon source, suggesting that this gene is not a suppressor of xylose metabolism in the analyzed yeasts. In a second approach, the *PHO13* gene was deleted in a recombinant diploid industrial yeast overexpressing the genes required for xylose metabolism (*XYL1*, *XYL2* and *XKS1* genes). The industrial *pho13*Δ / *pho13*Δ strain was able to grow on solid media containing high concentrations of xylose, and in flasks cultivations, the deletion of the *PHO13* gene significantly improved xylose consumption, as well as production of biomass and ethanol by the industrial recombinant strain. However, assays in simple batch fermentation under conditions of limited oxygen revealed that deletion of *PHO13* no improvement of

xylose fermentation. Similar results were found in assays of co-fermentation of xylose / glucose and xylose / sucrose.

**Keywords:** *BUD21*, *PHO13*, *Saccharomyces cerevisiae*, xylose, fermentation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração simplificada mostrando a produção de bioetanol no Brasil.....	34
Figura 2: Produção e bioetanol a partir da cana-de-açúcar.....	38
Figura 3: Fórmula estrutural do monossacarídeo xilose.....	44
Figura 4: Via metabólica para utilização da xilose em fungos, leveduras e bactérias.....	46
Figura 5: Visão geral da via metabólica em cepas de <i>S. cerevisiae</i> alteradas geneticamente para fermentação de xilose, com inserção dos genes exógenos que codificam as enzimas XR e XDH ou XI.....	55
Figura 6: Construção do módulo de deleção do gene <i>BUD21</i> utilizando o gene marcador <i>KanMX</i> .....	78
Figura 7: Construção dos módulos de deleção do gene <i>PHO13</i> utilizando os genes marcadores <i>KanMX</i> e <i>Ble<sup>r</sup></i> .....	79
Figura 8: Estratégia de deleção do gene <i>BUD21</i> no cromossomo XV das linhagens CEN.PK113-7D e CEN.PK2-1C utilizando um módulo de deleção gênica (Módulo 1) com o gene marcador <i>KanMX</i> .....	86
Figura 9: Crescimento das linhagens CEN.PK113-7D e CEN-D1 em meio contendo 20 g L <sup>-1</sup> de xilose como fonte única de carbono.....	88
Figura 10: Crescimento da linhagem YKB2666 <i>bud21</i> Δ em meio contendo 20 g L <sup>-1</sup> de xilose como fonte única de carbono.....	89
Figura 11: Crescimento da linhagem Y01854 <i>bud21</i> Δ em meio contendo 20 g L <sup>-1</sup> de xilose como fonte única de carbono.....	90
Figura 12: Estratégia de deleção da primeira cópia do gene <i>PHO13</i> na linhagem diploide MP-C5.....	94
Figura 13: Estratégia de deleção da segunda cópia do gene <i>PHO13</i> na linhagem DDA-K.....	95
Figura 14: Crescimento das linhagens MP-C5 e DDA-KB em placas contendo glicose ou xilose.....	97
Figura 15: Crescimento das linhagens MP-C5 e DDA-KB em meio contendo 20 g L <sup>-1</sup> xilose como fonte única de carbono.....	99

<b>Figura 16: Crescimento das linhagens MP-C5 e DDA-KB em meio contendo 100 g L<sup>-1</sup> xilose como fonte única de carbono.....</b>	<b>101</b>
<b>Figura 17: Fermentação em batelada simples de 20 g L<sup>-1</sup> de xilose pelas linhagens MP-C5 e DDA-KB.....</b>	<b>105</b>
<b>Figura 18: Fermentação em batelada simples de 100 g L<sup>-1</sup> de xilose pelas linhagens MP-C5 e DDA-KB.....</b>	<b>106</b>
<b>Figura 19: Co-fermentação em batelada simples pelas linhagens MP-C5 e DDA-KB em meio contendo 40 g L<sup>-1</sup> de xilose e de glicose.....</b>	<b>110</b>
<b>Figura 20: Co-fermentação em batelada simples pelas linhagens MP-C5 e DDA-KB em meio contendo 40 g L<sup>-1</sup> de xilose e de sacarose.....</b>	<b>113</b>
<b>Figura 21: Ciclo fútil decorrente da atividade fosfatase da Pho13p sobre a molécula de xilulose-5-fosfato.....</b>	<b>121</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção nacional e por região de cana-de-açúcar (moagem), de açúcar e de etanol (anidro, hidratado e total) para o ano/safra de 2012/2013.....	31
Tabela 2 – Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho.....	66
Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados na construção dos módulos de deleção gênica.....	75
Tabela 4 – Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para verificar a inserção do módulo de deleção gênica no correto local no genoma da levedura transformada.....	80
Tabela 5 – Combinação de iniciadores utilizados para verificar a inserção do módulo de deleção gênica no correto local no genoma da levedura transformada, e o produto de PCR esperado após eletroforese em gel de agarose.....	81
Tabela 6 – Parâmetros fisiológicos das linhagens MP-C5 e DDA-KB em crescimentos em frascos agitados com meios contendo xilose..	102
Tabela 7 – Parâmetros fisiológicos das linhagens MP-C5 e DDA-KB em fermentações em bateladas simples de xilose.....	107
Tabela 8 – Parâmetros fisiológicos das linhagens MP-C5 e DDA-KB em co-fermentações em bateladas simples de xilose e glicose ou sacarose.....	111



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs <sub>600</sub>	Absorbância em 600 nanômetros
ALP	<i>Alcaline Phosphatase</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
CPB	Tampão Citrato-Fosfato
D	Fator de Diluição
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNS	Regente com o Ácido Dinitrosalicílico
dNTP	Dinucleotídeos Trifosfatados (Adenina, Citosina, Guanina e Timina)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
E4F	Eritrose-4-Fosfato
F6F	Frutose-6-Fosfato
G	Força Gravitacional
GA3P	Gliceraldeído-3-Fosfato
GOD	Glicose Oxidase
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
<i>HXT</i>	<i>HeXose Transporter</i>
Meio YP	Meio Rico
Meio LB	Meio Luria-Bertani
Meio YPD	Meio Rico suplementando com 20 g L <sup>-1</sup> de glicose
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Hidreto (forma reduzida)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Desidrogenase (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Hidreto (forma reduzida)

NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleotíeo Fosfato Desidrogenase (forma oxidada)
ORF	<i>Open Read Frame</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
POD	Peroxidase
Pi	Fosfato Inorgânico
pH	Potencial Hidrogeniônico
p/v	Relação Peso-Volume
rpm	Rotações por Minutos
R5F	Ribose-5-Fosfato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>SGD</i>	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
SH7F	Sedoheptulose-7-Fosfato
kDa	Quilo Dalton
U	Unidade de Enzima
VPF	Via das Pentoses-Fosfato
t	Tempo
h	Hora
min	Minuto
s	Segundo
b	Bases Nitrogenadas
pb	Pares de Base Nitrogenada
Kb	Quilo Bases (equivalente a mil pares de bases nitrogenadas)
mb	Mega Bases (equivalente a 1milhão de pares de bases nitrogenadas)
<i>Ss</i>	de <i>Scheffersomyces stipitis</i>
<i>Sc</i>	de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

F ou F1	Iniciador <i>Forward</i>
R ou R1	Iniciador <i>Reverse</i>
mV	miliVolts
$\mu$ M	Micromolar
mM	Milimolar
M	Molar
$\mu$ L	Microlitro
mL	Mililitro
L	Litro
mg	Miligrama
g	Gramma
X5F	Xilulose-5-Fosfato
XR	Xilose Redutase
XDH	Xilitol Desidrogenase
XI	Xilose Isomerase
XK	Xiluloquinase
<i>XYL1</i>	Gene que codifica a Xilose Redutase
<i>XYL2</i>	Gene que codifica a Xilitol Desidrogenase
<i>XKS1</i>	Gene que codifica a Xiluloquinase
<i>XYLA</i>	Gene que codifica a Xilose Isomerase



## LISTA DE SIMBOLOS

$P_{Biomassa}$	Produtividade em biomassa
$P_{Etanol}$	Produtividade em etanol
$Y_{Produto/s}$	Fator de conversão de substrato em produto
$Y_{Biomassa/s}$	Fator de conversão de substrato em biomassa
$Y_{Xilitol/s}$	Fator de conversão de substrato em xilitol
$Y_{Glicerol/s}$	Fator de conversão de substrato em glicerol
$Y_{Etanol/s}$	Fator de conversão de substrato em etanol
$Y_{Xilitol/Xilose}$	Fator de conversão e xilose em xilitol
[E]	Concentração de Etanol
[B]	Concentração de Biomassa Celular
[P]	Concentração de Produto
[S]	Concentração de Substrato
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
$\approx$	Aproximadamente
°C	Graus Centrígrados



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>27</b>
1.1	HISTÓRIA DO BIOETANOL NO BRASIL.....	27
1.2	BIOETANOL OU ETANOL COMBUSTÍVEL.....	29
1.3	PRODUÇÃO DE BIOETANOL NO BRASIL.....	30
<b>1.3.1</b>	<b>Planta de produção de bioetanol no Brasil.....</b>	<b>32</b>
1.4	A LEVEDURA <i>S. cerevisiae</i> .....	35
<b>1.4.1</b>	<b>Leveduras industriais.....</b>	<b>36</b>
1.5	BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	37
1.6	BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	39
<b>1.6.1</b>	<b>Material Lignocelulósico.....</b>	<b>40</b>
1.6.1.1	Pré-tratamento.....	41
1.6.1.2	Hidrólise da celulose e hemicelulose.....	42
<b>1.6.2</b>	<b>Xilose.....</b>	<b>43</b>
<b>1.6.3</b>	<b>Desafios na produção de etanol de segunda geração.....</b>	<b>44</b>
1.7	VIAS DE UTILIZAÇÃO DA XILOSE.....	45
<b>1.7.1</b>	<b>Xilose Redutase (XR).....</b>	<b>47</b>
<b>1.7.2</b>	<b>Xilitol Desidrogenase (XDH).....</b>	<b>47</b>
<b>1.7.3</b>	<b>Balanço Redox Intracelular.....</b>	<b>48</b>
<b>1.7.4</b>	<b>Xilose Isomerase (XI).....</b>	<b>50</b>
<b>1.7.5</b>	<b>Xiluloquinase (XK).....</b>	<b>51</b>
<b>1.7.6</b>	<b>Via das Pentoses-Fosfato (VPF).....</b>	<b>53</b>
<b>1.7.7</b>	<b>Transporte de xilose.....</b>	<b>56</b>
<b>1.7.8</b>	<b>Engenharia evolutiva de leveduras.....</b>	<b>56</b>
<b>1.7.9</b>	<b>Genes supressores da metabolização da xilose.....</b>	<b>57</b>
1.7.9.1	<i>BUD21</i> .....	58
1.7.9.2	<i>PHO13</i> .....	59
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	63
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
3.1	LINHAGENS E MEIOS DE CULTIVO.....	65
<b>3.1.1</b>	<b>Preservação das Linhagens.....</b>	<b>65</b>
3.2	CULTIVOS CELULARES.....	67
<b>3.2.1</b>	<b>Pré-cultivos.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Avaliação do crescimento celular em frasco agitado.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Avaliação do crescimento celular em placas de Petri.....</b>	<b>68</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Fermentação em batelada simples em frasco agitado.....</b>	<b>68</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Processamento das amostras.....</b>	<b>68</b>
3.3	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	69

3.3.1	Quantificação de glicose.....	69
3.3.2	Quantificação de Sacarose.....	69
3.3.3	Quantificação de Açúcares Redutores.....	71
3.4	TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	72
3.4.1	Extração e purificação de plasmídeos.....	72
3.4.2	Extração de DNA genômico das leveduras.....	73
3.4.3	Eletroforese em gel de agarose.....	73
3.4.4	Reações de PCR.....	73
3.4.5	Transformação das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> .....	74
3.5	ENGENHARIA GENÔMICA EM <i>S. cerevisiae</i> .....	76
3.6	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS.....	82
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
4.1	AVALIAÇÃO DA DELEÇÃO DO GENE <i>BUD21</i> NA FERMENTAÇÃO DE XILOSE.....	85
4.1.1	Modificações genômicas em linhagens haploides de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> .....	85
4.1.2	Análise do crescimento em xilose de linhagens <i>bud21Δ</i> de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> .....	87
4.2	AVALIAÇÃO DA DELEÇÃO DO GENE <i>PHO13</i> NA FERMENTAÇÃO DE XILOSE.....	91
4.2.1	Modificações genômicas em linhagem industrial de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> .....	91
4.2.2	Análise de crescimento e fermentação de xilose por linhagem industrial recombinante <i>pho13Δ</i> .....	96
4.2.3	Mecanismo de influência da Pho13p no metabolismo da xilose.....	119
5	<b>PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÕES.....</b>	<b>123</b>
6	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>125</b>

# 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

## 1.1 HISTÓRIA DO BIOETANOL NO BRASIL

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi, provavelmente, a primeira monocultura produzida em larga escala no Brasil, e seu cultivo, assim como a produção de açúcar, estão intimamente relacionados com a época da colonização desse país. Relatos que datam de 1532 apontam para produção de açúcar já nos primeiros anos do Brasil-colônia, uma vez que os portugueses trouxeram as primeiras mudas de cana-de-açúcar. Desde então, o Brasil tem se destacado como importante produtor no âmbito mundial. Nas últimas décadas, o Brasil tornou-se um importante produtor de etanol combustível, tendo sua matriz de produção baseada majoritariamente no cultivo e fermentação da cana-de-açúcar (WHEALS et al., 1999). Desde a primeira metade do século passado, o Brasil já fazia uso de etanol como fonte de energia (SOCCOL et al., 2005).

Nos anos 70, com a crise internacional do petróleo e a alta no preço da gasolina aliada à baixa no preço do açúcar, o Brasil iniciou um programa para diminuir a sua dependência de combustíveis importados à base do petróleo, substituindo-os por combustíveis produzidos a partir de recursos domésticos (SOCCOL et al., 2010). Nesse cenário, em 1975 é criado o Proálcool (Programa Nacional do Álcool – Decreto 76.593 de 14/11/1975) que consistia numa política governamental de incentivos para a produção em larga escala de etanol combustível. Iniciado o Proálcool, os incentivos governamentais criaram ações que permitiram o etanol se tornar um combustível alternativo economicamente, socialmente e ambientalmente aceitável (PUPPIM DE OLIVEIRA, 2002). Nesse programa, a cana-de-açúcar foi mantida como matéria-prima para a produção de etanol combustível e, como consequência, estudos agrícolas e tecnológicos foram amplamente intensificados, levando o Brasil a uma posição favorável, naquela época, em termos de segurança energética (SOCCOL et al., 2010).

Paralelamente a essa política de incentivos à produção de etanol, o Brasil desenvolveu a primeira tecnologia de carros com motores movidos a apenas etanol, fato que agregou maior sucesso ao programa Proálcool (PUPPIM DE OLIVEIRA, 2002). Assim, o etanol combustível passou a ser usado sob duas formas no país: adicionado à gasolina em teores de até 25% de etanol anidro e como etanol puro, na forma hidratada (SOCCOL et al., 2010).

Nos anos 80, houve um significativo aumento na frota de veículos movidos exclusivamente a etanol em virtude de incentivos fiscais e políticas governamentais. No final dos anos 80, o Proálcool começou a ruir à medida que o preço internacional do petróleo baixava, tornando o etanol combustível pouco vantajoso tanto para o consumidor quanto para o produtor. Além disso, o governo brasileiro retirou alguns dos incentivos dados às destilarias produtoras. Para agravar o problema, o preço do açúcar começou a aumentar no mercado internacional na mesma época em que o preço do petróleo baixava, fazendo com que fosse muito mais vantajoso para os usineiros produzir açúcar ao invés de etanol (AMORIM et al., 2011). Esse fato acabou desencadeando diversas crises de desabastecimento de etanol combustível nos postos gerando descontentamento tanto para os consumidores quanto para as montadoras de automóveis, o que culminou praticamente com a extinção do programa Proálcool (GOLDENBERG, 2008; AMORIM et al., 2011).

Em 2003, foi introduzida a tecnologia de carro com motor *flex fuel*, capaz de funcionar com qualquer mistura de etanol-gasolina. Rapidamente essa tecnologia conquistou o consumidor brasileiro, e hoje está presente em cerca de 95% dos veículos aqui fabricados (GOLDENBERG, 2008). Em 2003, foram licenciados 36.380 carros movidos exclusivamente a etanol, 48.178 carros com motor *flex fuel* (movidos a etanol e gasolina) e 1.152.463 carros movidos somente à gasolina (UNICA, 2014). Já em 2012 foram licenciados 117 carros elétricos, 52 carros movidos somente a etanol, 3.162.874 carro com motor *flex fuel* e 273.913 carros movidos à gasolina (UNICA, 2014). Esses dados demonstram a importância que o etanol combustível adquiriu no mercado nacional. Assim, a tecnologia de carros bicomcombustível (*flex fuel*) juntamente com o percentual de etanol anidro presente na gasolina comercializada, trouxeram novas oportunidades para o setor de produção de etanol combustível, o qual tem crescido significativamente (GOLDENBERG, 2008). O etanol, que por muito tempo foi considerado um subproduto na indústria sucroalcooleira, passou a desempenhar novamente um papel estratégico na economia brasileira e uma importante alternativa para a crescente demanda de energia concomitantemente com o esgotamento das reservas de petróleo.

## 1.2 BIOETANOL OU ETANOL COMBUSTÍVEL

A autossuficiência energética é um determinante importante para a economia de qualquer país. Um dos grandes desafios para a sociedade do século 21 é suprir a crescente demanda de energia para transporte, aquecimento e processos industriais de forma economicamente viável e sustentável. Uma vez que as reservas petrolíferas são finitas e a sua retirada causa grandes impactos no meio ambiente, grandes esforços têm sido despendidos na busca de fontes e estratégias alternativas para a produção de biocombustíveis. No passado, a mudança na matriz energética favorecendo o uso de etanol combustível em detrimento do uso de derivados do petróleo, como a gasolina, teve como motivações principais aspectos econômicos. Atualmente, a ênfase para a manutenção e consolidação da matriz energética baseada no bioetanol, ou em outros biocombustíveis, é também ambiental, onde se busca diminuir as emissões de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) na atmosfera e outros impactos ambientais (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

A principal vantagem ambiental do bioetanol sobre a gasolina é o fato de ser renovável e, em princípio, um recurso sustentável e menos poluente. O aspecto mais importante é que o CO<sub>2</sub> liberado na combustão do bioetanol foi recém captado da atmosfera e fixado nas plantas cultivadas e, portanto, não contribui diretamente (emissão neutra) com o aumento das emissões de gases do efeito estufa e com o aquecimento global (WHEALS et al., 1999). Além disso, o etanol é um excelente combustível motor. Comparado com a gasolina, o etanol possui menor pressão de vapor, o que acarreta em menores emissões por evaporação. Além disso, o etanol é menos inflamável que a gasolina, o que reduz o número e a severidade de acidentes com a queima de veículos. O número de octanagem do etanol é superior ao da gasolina, sendo os valores de 98 e 80, respectivamente. No entanto, o etanol anidro possui um valor calorífico de 21,2 a 23,4 MJ.L<sup>-1</sup>, inferior ao da gasolina que é de 30,1 a 34,9 MJ.L<sup>-1</sup> (COELHO, GOLDENBERG, 2004). Levando em conta o valor calorífico, o etanol possui apenas de 70 a 97% da energia contida no mesmo volume de gasolina. Contudo, uma vez que o número de octanagem do etanol é maior que o da gasolina, pode-se utilizar motor com uma maior razão de compressão (12 para 1, ao invés de 8 para 1 em motores típicos de gasolina). Como resultado, motores abastecidos com bioetanol são em média 15% mais eficientes que os abastecidos com gasolina, o que compensa, em parte, a menor

quantidade de energia contida por unidade de volume (MOREIRA, GOLDENBERG, 1999). Tipicamente, são necessários 20% a mais de etanol do que gasolina para cada quilômetro percorrido.

O etanol combustível pode ser produzido a partir de diversas matérias-primas renováveis, as quais possuem em sua composição compostos que podem ser fermentados a etanol e, posteriormente, purificados por operações de destilação e absorção. De acordo com Balat, Balat e Cahide (2008), as matérias-primas para produção de etanol combustível podem ser convenientemente classificadas em três tipos: (1) matérias-primas contendo sacarose (ex. cana-de-açúcar, beterraba, sorgo); (2) materiais amiláceos (ex. trigo, milho, mandioca); (3) biomassa lignocelulósica (ex. madeira, bagaço e palha vegetal). A produção brasileira de etanol é quase totalmente derivada da cana-de-açúcar. Ambos, o caldo da cana quanto o melaço (gerado após a cristalização do açúcar) apresentam minerais e nutrientes orgânicos e podem ser diretamente fermentados a etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (LIMA, BASSO, AMORIM, 2001).

### 1.3 PRODUÇÃO DE BIOETANOL NO BRASIL

Devido à ampla extensão territorial e às condições climáticas favoráveis, o Brasil é líder mundial na safra de cana-de-açúcar, o principal insumo responsável pela alta produção de bioetanol e de açúcar (WHEELS et al., 1999). O Brasil já foi o maior produtor de bioetanol do mundo, sendo superado atualmente pelos EUA. No entanto, ainda permanece como o maior exportador mundial desse produto, gerando mais de 600.000 empregos diretos (UNICA, 2014). O maior importador de etanol brasileiro é justamente os EUA, que o fizeram em mais de 310 milhões de litros em 2010. Juntos, esses dois países são responsáveis por mais de 70% da produção mundial de bioetanol. No Brasil, a safra de 2012/2013 produziu 13.382 mil m<sup>3</sup> de bioetanol hidratado, 9.844 mil m<sup>3</sup> de bioetanol anidro e 23.226 mil m<sup>3</sup> de bioetanol total, conforme a Tabela 1 (UNICA, 2014). A principal região produtora de cana-de-açúcar e de seus subprodutos (açúcar e etanol) é a região Centro-Sul, sendo o estado de São Paulo o principal contribuinte. A produção de etanol total é estimada em 27,66 bilhões de litros para safra 2013/14, um incremento de 4,02 bilhões de litros, alta de 16,98%. Desse total, 11,73 bilhões de litros deverão ser de etanol anidro e 15,93 bilhões de litros de etanol hidratado. A produção de etanol continuará concentrada na região Centro-Sul, com 91,27% do total produzido no país, principalmente no estado de São Paulo,

**Tabela 1 – Produção nacional e por região de cana-de-açúcar (moagem), de açúcar e de etanol (anidro, hidratado e total) para o ano/safra de 2012/2013**

Produto	Região Centro-Sul	Região Norte-Nordeste	Brasil
Cana-de-açúcar <sup>a</sup>	532.758	55.720	588.478
Açúcar <sup>a</sup>	34.097	4.149	38.246
Etanol Anidro <sup>b</sup>	8.730	1.115	9.844
Etanol Hidratado <sup>b</sup>	12.632	750	13.382
Etanol Total <sup>b</sup>	21.362	1.864	23.226

**Nota:** <sup>a</sup> Quantidade em mil toneladas

<sup>b</sup> Quantidade em mil metros cúbicos.

**Fontes:** UNICA, ALCOPAR, BIOSUL, SIAMIG, SINDALCOOL, SIFAEG, SINDAAF, SUDES e MAPA.

responsável por 56,26% da produção nacional (CONAB, 2014).

O sistema de agroenergia brasileiro baseado na cana-de-açúcar é considerado como o sistema mais eficiente (GOLDEMBERG, 2008). A cana-de-açúcar contém de 12 a 17% de açúcares totais, sendo 90% sacarose e 10% glicose e frutose. A eficiência média de extração do caldo da cana-de-açúcar é de 95% pelo procedimento de moagem, tendo como remanescente um resíduo sólido chamado bagaço (WHEALS et al., 1999).

A sacarose é provavelmente o açúcar mais importante na utilização industrial pela levedura *S. cerevisiae* para produção de etanol combustível. Estima-se que cerca da metade da produção mundial de etanol é feita através da fermentação de caldos contendo sacarose como, por exemplo, caldo de cana e melaço (BATISTA, MILETTI, STAMBUK, 2004). A sacarose é um dissacarídeo não redutor formado por unidades de glicose e frutose unidas através de uma ligação osídica (Gli  $\alpha$ 1- $\beta$ 2 Fru) e sua clivagem em monômeros de glicose e frutose é realizada pelas enzimas invertase ( $\beta$ -frutofuranosidade) ou maltase ( $\alpha$ -glicosidade).

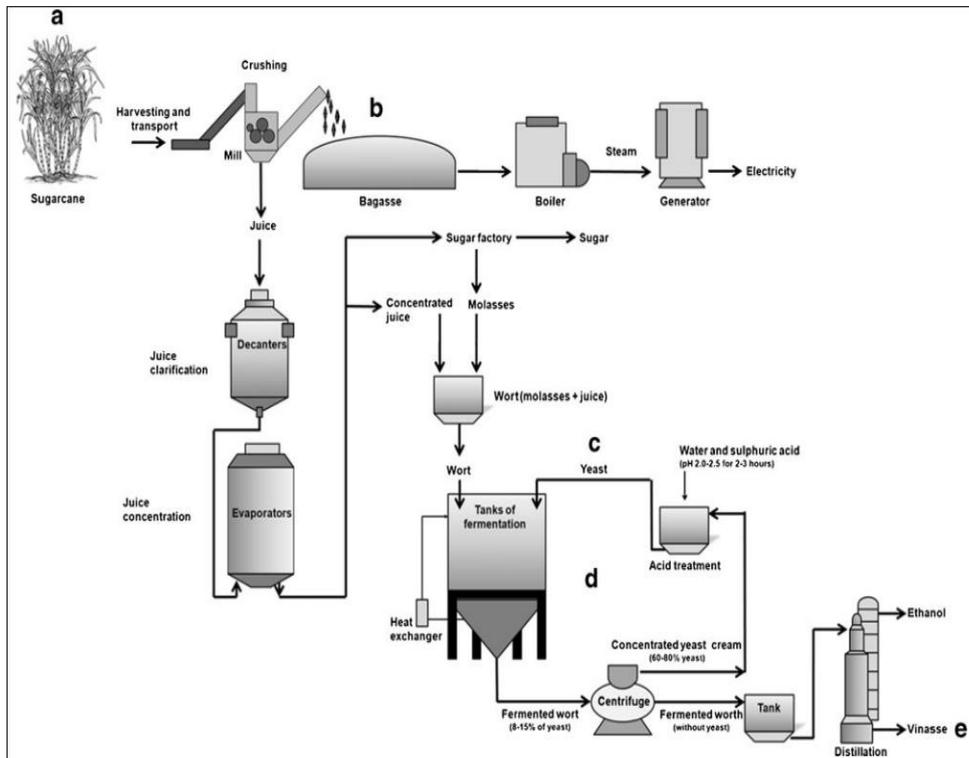
### 1.3.1 Planta de produção de bioetanol no Brasil

Um tonelada de cana-de-açúcar pode gerar até 160 kg de sacarose alcançando um rendimento próximo a 80 litros de etanol. Atualmente, a cana-de-açúcar é a única matéria prima utilizada em escala industrial para a produção de etanol combustível no Brasil. No entanto, a maior parte dos custos de produção do bioetanol está justamente relacionado com o plantio e manejo dessa matéria prima (ANDRIETTA et al., 2007). O processo de produção de bioetanol mais bem consolidado no Brasil foi desenvolvido por Firmino Boinot em destilarias francesas da região de *Melle* e sua tecnologia patenteada em 1937. O processo utiliza a fermentação principalmente da sacarose e é feita pela levedura *S. cerevisiae*. A Figura 1 representa um desenho esquemático do processo de produção de bioetanol. Ao longo dos últimos 30 anos, esse processo foi aperfeiçoado nas destilarias brasileiras o que permitiu alcançar fermentações com rendimentos de etanol de 92-93% em comparação com os rendimentos (75-80%) alcançados no início do programa Proálcool (AMORIM et al., 2011).

O processo denominado Melle-Boinot é tipicamente para produção de etanol em batelada e compreende a pesagem e limpeza da matéria prima, seguida pela redução do pH do meio com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) e ajuste da concentração dos açúcares no mosto de fermentação

(melaço e/ou caldo de cana) para valor próximos a  $180 \text{ g L}^{-1}$  de açúcares totais, sendo a maioria sacarose (AMORIM et al., 2011). O processo de produção de bioetanol brasileiro é caracterizado por uma fermentação em grandes tanques, que chegam a utilizar de 0,5 a 3 milhões de litros de mosto por batelada (processo descontínuo), e com densidades celulares que variam de 10 a 17% p/v (BASSO et al., 2008; AMORIM et al., 2011). Na fermentação em batelada simples, o mosto e as leveduras são adicionados no início da fermentação e ao término são completamente removido. Nos processos de batelada alimentada, o mosto vai sendo gradualmente adicionado a medida que a fermentação acontece e, portanto, pode-se evitar concentrações elevadas de açúcares (que podem causar estresse osmótico às leveduras) nas dornas de fermentação. Ao final do processo de batelada alimentada, o vinho produzido e as leveduras utilizadas são removidos do biorreator e inicia-se um novo processo. Em torno de 85% das destilarias utilizam o processo de batelada alimentada e, somente 15% utilizam o processo de batelada simples (GODOY et al., 2008). As fermentações são realizadas normalmente com uma mistura do melaço e do caldo da cana-de-açúcar por períodos curtos de 6 a 12 horas, sendo possível fazer de 2 a 3 fermentações por dia (BASSO et al., 2008). Ao final da fermentação, a concentração de etanol pode atingir valores de 7 a 11% (v/v) e o açúcar residual fica abaixo de 0,1%. Após o término da fermentação, o vinho produzido é decantado e depois centrifugado para a separação e recuperação das leveduras. O vinho é enviado para a destilação enquanto que as leveduras recuperadas são submetidas a um tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,0 – 2,5) para remover bactérias contaminantes e leveduras mortas (AMORIM et al., 2011). Cerca de 90% das leveduras são recicladas e reutilizadas para a próxima fermentação (BASSO et al., 2008). Esse processo é realizado de 200 a 300 dias por ano, dependendo de diversos fatores, entre eles a região de produção, condições climáticas, variedades da cana-de-açúcar, demandas de mercado, etc. No Brasil, a safra da cana-de-açúcar acontece de abril a novembro e de setembro a março nas regiões Centro-Sul e Norte-Nordeste, respectivamente (AMORIM et al., 2011).

A reutilização das leveduras representa uma vantagem no ambiente industrial, pois o reuso da biomassa viva poupa açúcar e aumenta o rendimento de etanol e também diminui o tempo do processo. Isso acontece porque, ao invés das células utilizarem parte do açúcar



**Figura 1: Ilustração simplificada mostrando a produção de bioetanol no Brasil.** A cana-de-açúcar (a) é coletada, transportada e moída produzindo o bagaço (b) e o caldo de cana. O bagaço pode ser queimado nas caldeiras para produção de vapor e energia elétrica. O caldo da cana é processado (clarificação e ajuste de concentração) e segue para a produção de açúcar e/ou etanol. Em (c) as leveduras são acrescentadas nas dornas juntamente ao caldo da cana ou melão para ocorrer a fermentação (d). Após o término da fermentação, o mosto é centrifugado para a separação das leveduras do vinho. As leveduras sofrem a seguir um tratamento ácido e são recicladas para o uso em uma nova fermentação. O vinho segue para as destilarias (e) onde ocorre a concentração do etanol produzido. Fonte: AMORIM et al., 2011.

para a produção de biomassa, elas convertem essa parte adicional em mais etanol, aumentando a eficiência do processo (AMORIM, LOPES, 2005). Dessa forma, as destilarias brasileiras possuem vantagens não apenas pela matéria prima utilizada (cana-de-açúcar), mas também por fermentações industriais que priorizam altos rendimentos, reutilização de biomassa de levedura e realização em intervalos de tempo bastante curtos (BASSO et al., 2008). Após a fermentação, o vinho produzido é destilado produzindo uma mistura de etanol hidratado de 95,5% (v/v). Para produzir etanol anidro, a água é removida através de um carboidrato desidratado ou com o uso de peneiras moleculares que absorvem água. As destilarias geram um resíduo aquoso denominado vinhaça, a qual é utilizada como fertilizante ou insumo para irrigação (WHEALS et al., 1999). A cada litro de etanol anidro produzido, são gerados cerca de 15 litros de vinhaça.

#### 1.4 A LEVEDURA *S. cerevisiae*

As leveduras, especialmente do gênero *Saccharomyces*, têm sido amplamente utilizadas desde os primórdios da civilização em diversos processos biotecnológicos, que englobam, por exemplo, a produção de bebidas alcóolica (cerveja, vinho, etc.) e produtos de panificação, entre outros. Várias linhagens de *Saccharomyces* foram sendo selecionadas artificialmente ao longo de sucessivos processos de produção devido a sua capacidade de fermentar açúcares e produzir etanol, mesmo na presença de oxigênio. Outro fator determinante para o predomínio do gênero *Saccharomyces* em processos fermentativos é o fato desse se adaptar e suportar baixos valores de pH, altas concentrações de etanol dissolvido, variações de temperaturas e estresse osmótico decorrente das altas concentrações de açúcares nos mostos fermentativos. Dentre as espécies que compõem o gênero *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* é considerada o agente predominante nas fermentações e o principal microrganismo utilizado na produção de etanol combustível nas usinas brasileiras. Outras espécies do complexo *Saccharomyces sensu stricto* que se destacam em processos industriais são a *S. bayanus* e *S. pastorianus* (QUEROL, BOND, 2009).

As leveduras mais adaptadas para o processo industrial foram sendo selecionadas em virtude de sua capacidade de dominar o processo de fermentação ao longo de diversos ciclos durante a safra e, também, em razão de fermentações mais eficientes e estáveis (BASSO et al., 2008). As linhagens selecionadas, conhecidas como “industriais”, são

atualmente utilizadas pela maioria das usinas brasileiras desde o início da safra de produção de bioetanol. Essas linhagens são mais resistentes e respondem de melhor forma às condições estressantes do processo industrial às quais são submetidas.

#### 1.4.1 Leveduras industriais

A seleção de linhagens industriais para a produção de bioetanol trouxe diversos impactos positivos. Como mencionado anteriormente, essas linhagens são melhores adaptadas ao processo fermentativo, apresentando: redução nos custos de produção, maiores rendimentos de etanol, redução na formação de glicerol, manutenção da viabilidade celular durante os ciclos, não floculação, não formação de espuma, capacidade de sobreviver e predominar no ambiente industrial, maior resistência às condições de estresse encontradas no ambiente industrial (AMORIM, 2005; ANDRIETTA et al., 2007).

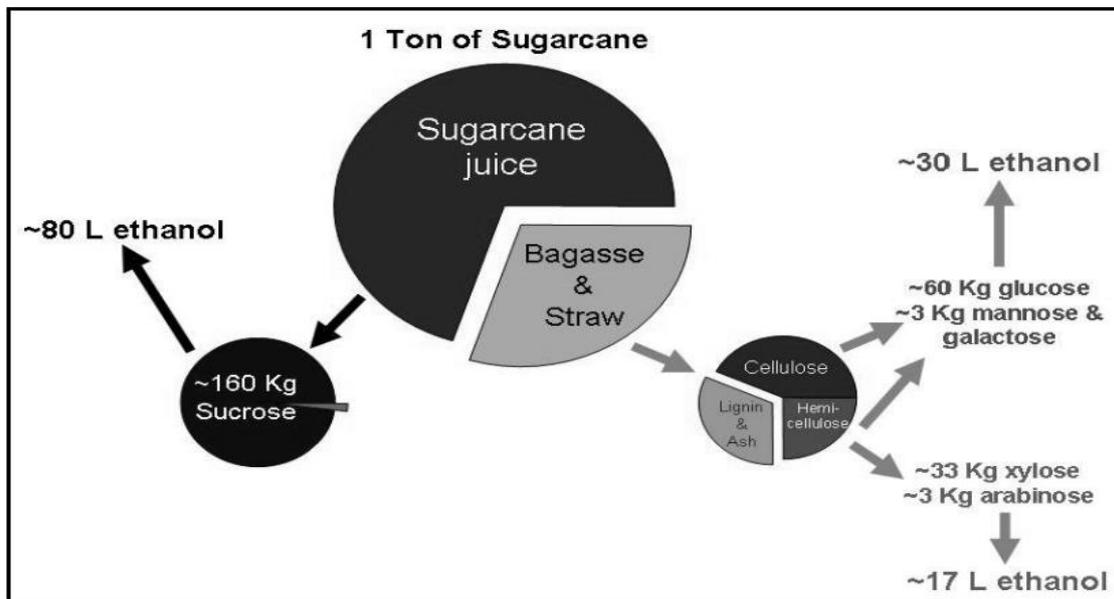
Na década de 90, foram selecionadas duas linhagens industriais de *S. cerevisiae*, CAT-1 e PE-2, isoladas de processos industriais de fermentação em batelada alimentada e contínua (BASSO et al., 2008). Essas linhagens mostraram características notáveis em competir com leveduras selvagens e estão disponíveis comercialmente como inóculo para a indústria do etanol ([www.fermentec.com.br/index.html](http://www.fermentec.com.br/index.html)). Além disso, apresentam alta produtividade de etanol. Ambas as linhagens são diploides e heterotáticas e esporulam com facilidade (LOPES, 2000). Durante a safra de 2007/2008, as linhagens CAT-1 e PE-2 foram usadas em mais de 150 destilarias nacionais e produziram 60% do bioetanol total produzido (BASSO et al., 2008).

A linhagem industrial CAT-1 foi isolada pela empresa Fermentec Ltda. na safra de 1998/1999 na usina VO Catanduva localizada no estado de São Paulo. Essa linhagem foi amplamente estudada e avaliada em condições laboratoriais e reintroduzida durante anos nas destilarias para verificar sua predominância nas dornas de fermentação (ANDRIETTA et al., 2007; BASSO et al., 2008; AMORIM et al., 2011). O sequenciamento completo do genoma da linhagem de *S. cerevisiae* CAT-1 foi publicado recentemente (BABRZADEH et al., 2012). Essa linhagem apresenta alto grau de heterozigose e um genoma diploide de 12 mb. Esse trabalho buscou ainda identificar variações no perfil genético que possam estar associadas a características industriais importantes (BABRZADEH et al., 2012).

## 1.5 BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

A tecnologia de produção de bioetanol de segunda geração é definida como sendo a conversão dos açúcares presentes na biomassa lignocelulósica das plantas em etanol combustível. Nesse sentido, as matérias primas utilizadas nesses processos de segunda geração podem ser resíduos vegetais, e portanto, diferente do material vegetal destinado à alimentação humana. Nos dias atuais, a produção de bioetanol no Brasil depende exclusivamente de tecnologias de primeira geração, as quais são baseadas na utilização da sacarose contida na cana-de-açúcar. A sacarose representa apenas um terço da energia contida na cana-de-açúcar (GOLDEMBERG, 2008) e os custos da matéria-prima (cana-de-açúcar) são reduzidos quando usada toda a planta (caldo, bagaço, palha) para a geração de produtos e coprodutos (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). A previsão é que nos próximos anos a demanda por etanol combustível irá dobrar, ou mesmo triplicar, podendo atingir a marca de 70 bilhões de litros anuais (SOCCOL et al., 2010). O aumento da demanda por etanol implicaria no aumento proporcional da demanda por áreas de cultivo da cana-de-açúcar. A destinação de mais áreas para o plantio geraria um aumento no impacto ambiental causado, além de conflitar com a destinação de áreas para plantio de grãos para alimentação.

Nesse sentido, a implementação de tecnologias de segunda geração permite ampliar a oferta de etanol combustível, tornando o processo mais rentável e atrativo e sem a necessidade de expandir grandemente as áreas plantadas com cana-de-açúcar. O desenvolvimento tecnológico pode certamente ajudar na redução de ambos, o impacto ambiental e o preço do etanol combustível (favorável ao consumidor). Um simples balanço de massa para a cana-de-açúcar colhida, conforme mostrado na Figura 2, indica que o etanol combustível produzido a partir da biomassa lignocelulósica poderia incrementar em mais de 50% do total de etanol atualmente produzido a partir da cana-de-açúcar (caldo e melaço), considerando que as quantidades de açúcares encontrados na biomassa da cana-de-açúcar tenham sido recuperadas e fermentadas com eficiência de aproximadamente 90% (STAMBUK et al., 2008).



**Figura 2: Produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar.** A atual tecnologia de processamento de cana-de-açúcar e produção de bioetanol oriunda da sacarose extraída (setas pretas) está representada no lado esquerdo da figura, enquanto que as realizações tecnológicas necessárias para a produção de bioetanol a partir do bagaço e da palha da cana-de-açúcar (pré-tratamento da biomassa, hidrólise e fermentação das pentoses – setas cinzas) estão representadas no lado direito da figura. Fonte: STAMBUK et al., 2008.

## 1.6 BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar representa tipicamente mais de um terço do custo de produção do etanol combustível. Portanto, torna-se importante o desenvolvimento de tecnologias que maximizem o rendimento de produção de bioetanol (DIEN, COTTA, JEFFRIES, 2003). Para a cana-de-açúcar, apenas parte de sua biomassa é utilizada para produção direta de bioetanol. Assim, um terço da planta é o caldo usado para produção de etanol (ou açúcar); um terço constitui o bagaço (remanescente após a moagem), e o terço restante são as folhas e a palha da planta que permanecem no campo, onde são decompostas por microrganismos ou são queimadas (CORTEZ, LORA, GÓMEZ, 2008).

O bagaço é um resíduo poroso do talo da cana-de-açúcar remanescente após a moagem e extração do caldo da cana (PANDEY et al., 2000). Apresenta grande heterogeneidade morfológica e consiste em feixes de fibras e outros elementos estruturais como vasos, parênquima e células epiteliais (SANJUAN et al., 2001). Sua composição básica consiste de uma estrutura fortemente intrincada de 19-24% de lignina; 27-32% de hemicelulose; 32-44% de celulose; e 4,5-9% de cinzas. (JACOBSEN, WYMAN, 2002).

As usinas de produção de etanol combustível geram aproximadamente 270 a 280 kg de bagaço (50% úmido) por tonelada de cana-de-açúcar. A produção brasileira anual de bagaço é estimada em mais de 186 milhões de toneladas (SOCCOL et al., 2010). Atualmente, a destinação principal desse bagaço e palha da cana-de-açúcar das safras brasileiras é a queima nas usinas e destilarias para geração de calor/energia na forma de vapor. O vapor d'água gerado suplementa energia para os processos de moagem, aquecimento, concentração dos caldos, destilação do etanol, etc. Além disso, a porção excedente do bagaço pode ser usada para a cogeração de bioeletricidade, a qual pode ser vendida às companhias elétricas, principalmente durante as épocas de estiagem no Brasil, onde a demanda por eletricidade é maior e a geração de hidroeletricidade é mais limitada (WHEALS et al., 1999).

Outra destinação para o bagaço da cana-de-açúcar poderá ser, em breve, a produção de bioetanol de segunda geração. No entanto, até a presente data, não existe processo industrial completamente viável para a produção de bioetanol de segunda geração a partir do bagaço da cana-de-açúcar. A biomassa do bagaço é extremamente complexa e possui diferentes açúcares, entre eles hexoses e pentoses. A tecnologia chegará às destilarias apenas quando demonstrar sua viabilidade técnica e

econômica. Assim, para os próximos anos, estudos intensivos na investigação científica desse processo serão necessários para tornar essa tecnologia uma realidade no Brasil (AMORIM et al., 2011). Em um futuro próximo, as destilarias poderão decidir o quanto de biomassa do bagaço será usado para produção de calor/bioeletricidade ou etanol de segunda geração (AMORIM et al., 2011).

Além disso, o desenvolvimento da tecnologia de produção de bioetanol de segunda geração a partir do bagaço da cana-de-açúcar no Brasil pode ser bastante vantajoso devido ao processo de produção poder ser anexado às atuais unidades de produção de açúcar e etanol (de primeira geração), requisitando baixos investimentos de infraestrutura, logística e oferta de energia. Como o bagaço é gerado na própria unidade industrial, isenta também os gastos com transporte (SOCCOL et al., 2010).

### **1.6.1 Material Lignocelulósico**

A lignocelulose é o principal componente da biomassa das plantas (LEE, 1997) e é composta por polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose), lignina e uma parte remanescente menor de extratos e minerais, ligados numa estrutura bastante intrincada e recalcitrante para desconstrução (GIRIO et al., 2010). A celulose e a hemicelulose tipicamente compreendem mais de dois terços da biomassa de lignocelulose e são substratos para a produção de bioetanol de segunda geração (GIRIO et al., 2010).

A celulose é um polímero grande com estrutura composta exclusivamente de unidades de glicose unidas via ligação glicosídica  $\beta$ -1,4. Devido a essas ligações glicosídicas, a celulose é altamente cristalina e compacta e, portanto, bastante resistente a ataques biológicos. O polímero de celulose pode alcançar 10.000 unidades glicosil em sua cadeia formando fibras (GRAY, ZHAO, EMPTAGE, 2006).

A hemicelulose é uma classe heterogênea de polímeros que representam, em geral, de 15 a 35% da biomassa da planta e contém pentoses ( $\beta$ -D-xilose e  $\alpha$ -L-arabinose), hexoses ( $\beta$ -D-manose,  $\beta$ -D-glicose e  $\alpha$ -D-galactose) e/ou ácidos urônicos (ácidos  $\alpha$ -D-glicurônico,  $\alpha$ -D-4-O-metilgalacturônico e  $\alpha$ -D-galacturônico). Outros açúcares como a  $\alpha$ -L-ramnose e  $\alpha$ -L-fucose podem também estar presente em pequenas quantidades, e os grupos hidroxil dos açúcares podem ser parcialmente substituídos por grupamentos acetil (GIRIO et al., 2010). A hemicelulose é um heteropolímero menor (aproximadamente 100-200 unidades), altamente ramificado e dependendo do açúcar predominante,

pode ser referida como xilanos, mananos ou galactanos. Em geral, a hemicelulose consiste em um esqueleto principal de xilano (com ligações  $\beta$ -1,4) e vários ramos de manose, arabinose, galactose, ramnose, ácido glicorônico, etc. O grau de ramificação e a identidade desses açúcares na hemicelulose costuma variar dependendo do tipo de planta (GRAY, ZHAO, EMPTAGE, 2006).

A lignina é um complexo variável, hidrofóbico e reticulado, formado por polímeros aromáticos de unidades de p-hidroxifenilpropanóide conectadas por ligações carbono-carbono e carbono-oxigênio-carbono. As ligninas são extremamente resistentes à degradação química e enzimática, sendo na natureza a degradação biológica feita principalmente por fungos (LEE, 1997). Além disso, a lignina pode ser covalentemente ligada à hemicelulose através de ligações éster com o ácido ferúlico (GRAY, ZHAO, EMPTAGE, 2006). A compactação e a complexidade da biomassa lignocelulósica tornam os processos de degradação enzimática e posterior fermentação alcóolica muito mais difícil do que, por exemplo, para o amido. Além disso, a presença de pentoses na matéria prima lignocelulósica traz um obstáculo adicional ao processo de fermentação (GRAY, ZHAO, EMPTAGE, 2006).

#### 1.6.1.1 Pré-tratamento

O processo biológico da produção de etanol combustível utilizando a biomassa de lignocelulose como substrato pode requerer algumas etapas, como o pré-tratamento da biomassa, hidrólise dos polímeros de carboidratos e fermentação alcóolica da mistura de hexoses e pentoses (LEE, 1997). O principal objetivo do processo de pré-tratamento é diminuir ou colapsar as interações entre os principais componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina) tornando-os susceptíveis à hidrólise e fermentação (GÁMEZ et al., 2006). Para Hahn-Hägerdal e colaboradores (2006), o processo de pré-tratamento aumenta a porosidade e reduz a cristalinidade da celulose no material de lignocelulose. A íntima associação entre os três componentes da parede celular é o fator mais determinante para a baixa acessibilidade a processos de hidrólise enzimática e fermentação (SOCCOL et al., 2010). Assim, a melhor condição de pré-tratamento pode ser definida como aquela na qual a máxima recuperação da água com açúcares solúveis da hemicelulose é obtida, juntamente com a produção de substrato para a hidrólise enzimática e fermentação (SOCCOL et al., 2010).

Os principais processos de fracionamento seletivo da hemicelulose incluem o uso de ácidos, água quente ou vapor, agentes alcalinos e solventes orgânicos (WHEALS et al., 1999; GIRIO et al., 2010). Cada tecnologia de pré-tratamento tem suas vantagens e desvantagens e o pré-tratamento “ideal” possivelmente não existe. O tratamento mais apropriado depende de vários fatores, inclusive da fonte do material lignocelulósico. Após a maioria dos processos de pré-tratamento do material de lignocelulose, a hemicelulose hidrolisada gera uma solução com uma quantidade significativa de oligossacarídeos. Uma vez que os mais eficientes microrganismos produtores de etanol são incapazes de assimilar os oligossacarídeos de hemicelulose, a sua hidrólise em unidades menores e/ou monômeros é quase um requerimento compulsório (GIRIO et al., 2010). Um eficiente pré-tratamento pode substancialmente reduzir o requerimento de hidrólise enzimática posterior, que constitui uma grande parte do custo do processo (HAHN-HÅGERDAL et al., 2006).

#### 1.6.1.2 Hidrólise da celulose e hemicelulose

O processo de hidrólise posterior ao pré-tratamento por ser realizado com o uso de ácidos ou através de catálise enzimática. A hidrólise enzimática da celulose resultante do processo de pré-tratamento pode ser realizada por um consórcio de enzimas, coletivamente conhecidas como celulases, que clivam a celulose em seus monômeros de glicose (WHEALS et al., 1999). A hidrólise enzimática da hemicelulose também é realizada por um consórcio de enzimas denominadas hemicelulases. As hemicelulases podem ser de dois tipos principais: as xilanases (mais utilizadas) e as mananases. A desagregação da hemicelulose através do uso de hemicelulases facilita a hidrólise da celulose, uma vez que suas fibras ficam mais expostas ao complexo enzimático de celulases (SHALLOM, SHOHAM, 2003).

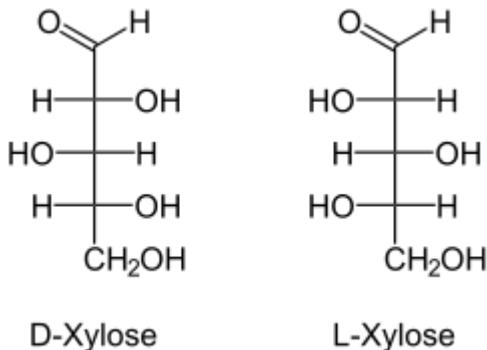
As xilanases são um grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise do xilano. As principais enzimas envolvidas são: (1) a endo-1,4- $\beta$ -xilanase ou 1,4- $\beta$ -D-xilano xilano-hidrolase (E.C. 3.2.1.8); (2) e  $\beta$ -xilosidase ou 1,4- $\beta$ -D-xilano xilohidrolase (E.C. 3.2.1.37) (GRAY, ZHAO, EMPTAGE, 2006; GIRIO et al., 2010). A enzima endo-1,4- $\beta$ -xilanase cliva as ligações glicosídicas do esqueleto de xilano provocando uma redução no grau de polimerização do substrato. Inicialmente, o principal produto da hidrólise são oligômeros de  $\beta$ -D-xilapiranosil, mas em estágios mais avançados pequenas moléculas de mono, di, e trissacarídeos de  $\beta$ -D-xilapiranosil podem ser produzidas (POLIZELI et al., 2005). A atuação de diversas outras enzimas

acessórias, com atividade na clivagem de várias cadeias laterais, é também necessária (POLIZELI et al., 2005; GRAY, ZHAO, EMPTAGE, 2006). Entre essas enzimas acessórias estão: a  $\alpha$ -D-glicuronidase (E.C. 3.2.1.139), a  $\alpha$ -L-arabinofuranosidade (E.C. 3.2.1.55), a acetil xilano esterase (E.C. 3.1.1.72), a ácido ferúlico esterase (E.C. 3.1.1.73) e a  $\alpha$ -galactosidade (E.C. 3.2.1.22) (POLIZELI et al., 2005; CHAVES, BULL, EYZAGUIRRE, 2006; GRAY, ZHAO, EMPTAGE, 2006). A etapa de fermentação alcoólica pode ocorrer de forma separada da hidrólise enzimática em um processo conhecido como Hidrólise e Fermentação Separada ou ambas as etapas podem ser conduzidos simultaneamente num processo que é denominado de Hidrólise e Fermentação Simultânea (SOCCOL et al., 2010).

### 1.6.2 Xilose

Os principais açúcares fermentáveis presentes no hidrolisado de biomassa lignocelulósica são a glicose e a xilose (e significativamente em menores quantidades arabinose, galactose e manose). Portanto, os esforços iniciais são para produzir um organismo comercialmente viável que co-fermente eficientemente esses dois açúcares (GRAY, ZHAO, EMPTAGE, 2006). A xilose é um monossacarídeo e possui a fórmula química  $C_5H_{10}O_5$  constituindo uma aldopentose. A fórmula espacial da xilose está representada na Figura 3. Depois da D-glicose, a D-xilose é o segundo açúcar mais abundante na hemicelulose. Dessa forma, para maximizar o potencial de produção de etanol, as linhagens microbianas utilizadas devem ser capazes de utilizar tanto hexoses quanto pentoses presentes na lignocelulose (USHER et al., 2011).

As matérias primas de lignocelulose, em particular as provindas da agricultura e de madeiras “duras” (angiospermas), podem conter de 5-20% de pentoses, como a xilose e arabinose, (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). A fração de pentoses na cana-de-açúcar representa aproximadamente 14% do total de açúcares disponíveis para fermentação. Essa quantidade de açúcares deve ser fermentada para aumentar a produção de etanol, como também para diminuir o risco de contaminações.



**Figura 3: Fórmula estrutural do monossacarídeo xilose.** A xilose ou (2R,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentanal (IUPAC) é uma aldopentose de fórmula molecular  $C_5H_{10}O_5$  e, por possuir um carbono quiral, apresenta duas formas enantioméricas: D-Xilose e L-Xilose. Somente a forma D-xilose está presente na hemicelulose.

### 1.6.3 Desafios na produção de etanol de segunda geração

Microrganismos fermentadores de xilose são encontrados entre bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SKOOG, HAHN-HÄGERDAL, 1988). Bactérias anaeróbias fermentam pentoses, mas são inibidas já em baixas concentrações de açúcares e de etanol. Além disso, a fermentação alcóolica ocorre com considerável formação de subprodutos, os quais reduzem os rendimentos de etanol (DESAI, GUERINOT, LYND, 2004). A levedura *Scheffersomyces stipitis* fermenta naturalmente a xilose em etanol com rendimento e produtividade razoáveis, contudo essa levedura é inibida por compostos gerados durante os processos de pré-tratamento e hidrólise da matéria prima de lignocelulose (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994a). Fungos filamentosos são tolerantes a esses inibidores, mas são muito lentos para um processo industrial competitivo. Assim, os esforços predominantes têm sido destinados a obter cepas recombinantes de bactérias ou leveduras capazes de atender os requisitos para a fermentação industrial de material lignocelulósico (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

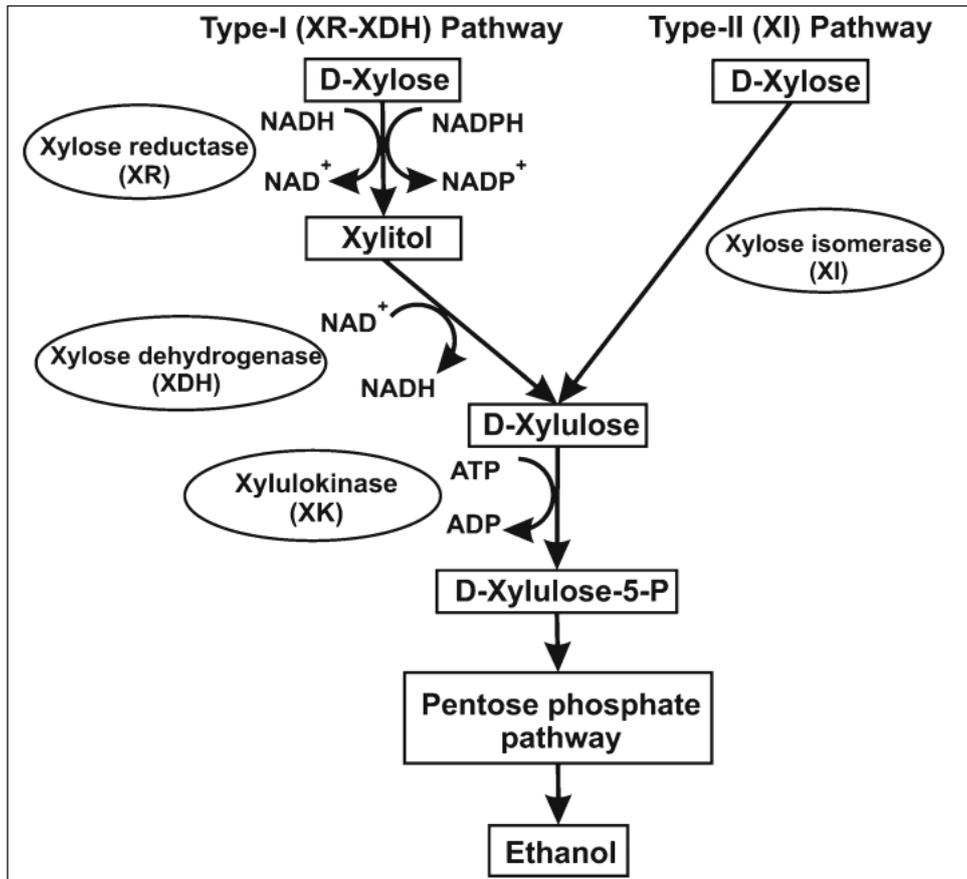
Para produzir etanol a partir da biomassa de lignocelulose de maneira economicamente viável, é essencial ter um biocatalisador capaz de fermentar hexoses e pentoses nas condições adversas do ambiente industrial. A engenharia molecular de cepas industriais que seriam capazes de cofermentar eficientemente todos os açúcares presentes na biomassa de lignocelulose ainda permanece como um desafio aos

biólogos e engenheiros moleculares do mundo todo. Ao longo dos últimos anos, engenheiros metabólicos têm feito construções de linhagens bacterianas e de leveduras com traços apropriados para a produção de etanol a partir de material lignocelulósico (BOTHAST, NICHOLS, DIEN, 1999; HAHN-HÄGERDAL et al., 2001; DIEN, COTTA, JEFFRIES, 2003). Pesquisadores têm basicamente tomado duas estratégias para melhorar o rendimento de etanol. A primeira estratégia tem sido adicionar genes da via de metabolização das pentoses aos microrganismos produtores de etanol através de técnicas de engenharia genética. A segunda estratégia se refere em melhorar o rendimento de etanol, também por técnicas de engenharia genética, dos microrganismos que já possuem a habilidade para fermentar hexoses e pentoses (DIEN, COTTA, JEFFRIES, 2003; JEFFRIES, JIN, 2004).

O maior inconveniente para o uso da levedura *S. cerevisiae* na produção de etanol combustível de segunda geração é a sua inaptidão em utilizar/consumir as pentoses presentes na biomassa de lignocelulose, tais como a xilose e a arabinose (GIRIO et al., 2010). No entanto, uma vez que a levedura *S. cerevisiae* é o microrganismo mais amplamente utilizado nas plantas industriais para produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar e de diversos outros grãos, a ampla maioria dos estudos propostos está sendo realizada usando esse microrganismo e tendo como o objetivo a construção de uma linhagem capaz de fermentar hexoses e pentoses conjuntamente (STAMBUK et al., 2008).

## 1.7 VIAS DE UTILIZAÇÃO DA XILOSE

Na natureza, diversos fungos, bactérias e algumas leveduras são capazes de metabolizar naturalmente a xilose, utilizando-a como fonte de carbono e energia. Esses organismos possuem genes específicos capazes de converter o açúcar xilose em xilulose. A Figura 4 representa as vias metabólicas para utilização da xilose. Leveduras capazes de fermentar xilose são encontradas nos gêneros *Candida*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, *Pachysolen*, *Hansenula*, *Debaromyces*, *Schwanniomyces*, etc. Se a xilose é convertida a xilulose, outras leveduras são capazes de fermentar diretamente a etanol, incluindo *S. cerevisiae* (JEFFRIES, SHI, 1999; ELIASSON et al., 2000). As leveduras conhecidas que melhor fermentam xilose, em condições



**Figura 4: Vias metabólicas para utilização da xilose em fungos, leveduras e bactérias.** Na via tipo 1, as enzimas Xilose Redutase e Xilitol Desidrogenase convertem xilose em xilitol (com o uso dos cofatores NADH e/ou NADPH) e o xilitol em xilulose (com o uso do cofator NAD<sup>+</sup>), respectivamente. Na via tipo 2, a enzima Xilose Isomerase converte, em passo único, a xilose em xilulose sem a necessidade de cofatores. Uma vez formada a molécula de xilulose, esta é convertida pela enzima Xilulokinase em xilulose-5-fosfato e, então, pode seguir para a Via das Pentoses-Fosfato. A via metabólica tipo 1 ocorre principalmente em fungos e leveduras, enquanto que a via metabólica tipo 2 acontece preferencialmente em bactérias. Fonte: LALUCE et al., 2012.

naturais, são a *S. stipitis*, *Pachysolen tannophilus* e *Candida shehatae*, sendo que todas utilizam as duas oxidoreduções representadas na via 1 (Figura 4). *S. stipitis*, *P. tannophilus* e *C. shehatae* foram amplamente investigadas em relação às suas potencialidades de converter xilose a etanol. No entanto, essas espécies são menos tolerantes aos baixos valores de pH, às altas concentrações de etanol e dos inibidores produzidos no pré-tratamento do hidrolisado de lignocelulose quando comparadas à levedura *S. cerevisiae* (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994b). Assim, essas espécies não apresentam os rendimentos necessários que justifiquem o seu uso em produção industrial (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994b; JEFFRIES, SHI, 1999).

### 1.7.1 Xilose Redutase (XR)

A enzima XR dependente de NAD(P)H (EC 1.1.1.21) catalisa a conversão de xilose em xilitol utilizando sempre um dos cofatores NADH ou NADPH, liberando NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup>, respectivamente (BRUINENBERG et al., 1984; VERDUYN et al., 1985; BOLEN, ROTH, FREER, 1986; RIZZI et al., 1988). No entanto, a enzima XR apresenta maior afinidade pelo cofator NADPH, o qual é mais frequentemente utilizado nessas reações. A denominação *XYL1* designa genericamente os genes que codificam uma XR. A XR de *S. stipitis* (gene *SsXYL1e* enzima *SsXR*) possui duas vezes mais afinidade por NADPH do que NADH (LIANG, ZHANG, LIN, 2007; WATANABE et al., 2007a; WATANABE et al., 2007b; WATANABE et al., 2007c).

Em *S. cerevisiae*, o gene *GRE3* (ORF - *YHR104w*) codifica uma XR endógena estritamente dependente do cofator NADPH (KUHN et al., 1995; FORD, ELLIS, 2001; JEONG et al., 2001; JEONG, KIM, LEE, 2002). Essa enzima é um monômero de 37 kDa e foi classificada como um aldo-ceto redutase. Sua afinidade pela xilose é bastante similar à afinidade das XRs de outras leveduras ( $K_m$  14,8-27,9 mM para *S. cerevisiae* e  $K_m$  de 14 mM para *P. tannophilus*) (DITZELMULLER et al., 1984a; KUHN et al., 1995; FORD, ELLIS, 2001; JEONG et al., 2001). No entanto, a expressão desse gene é extremamente baixa ou mesmo inexistente em condições normais.

### 1.7.2 Xilitol Desidrogenase (XDH)

A enzima XDH dependente de NAD<sup>+</sup> (EC 1.1.1.19) catalisa a conversão de xilitol em xilulose utilizando estritamente como cofator a molécula de NAD<sup>+</sup>, regenerando ao final o cofator NADH (BOLEN, ROTH, FREER, 1986; RIZZI et al., 1989a; YANG, JEFFRIES, 1990).

A denominação *XYL2* designa genericamente os genes que codificam uma XDH. A XDH tem sido purificada e caracterizada de diversas leveduras fermentadoras de xilose, incluindo *P. tannophilus* (DITZELMULLER et al., 1984a), *S. stipitis* (RIZZI et al., 1989a; KÖTTER, CIRIACY 1993), *C. shehatae* (YANG, JEFFRIES 1990), *Debaromyces hansenii* (GIRIO et al., 2010), *Candida tropicalis* (TAKAMIZAWA et al., 2000), *Candida guilliermondii* (SENE et al., 2001). A XDH dependente de  $\text{NAD}^+$  de *S. stipitis* (gene *SsXYL2* e enzima *SsXDH*) possui afinidades pelo xilitol e  $\text{NAD}^+$  com valores de  $K_m_{\text{xilitol}} = 26 \text{ mM}$  e  $K_m_{\text{NAD}^+} = 160 \text{ }\mu\text{M}$  (RIZZI et al., 1989b).

Em *S. cerevisiae*, o gene *XYL2* (ORF – YLR070c) codifica uma XDH endógena (RICHARD, TOIVARI, PENTTILA, 2000). As constantes cinéticas da XDH endógena de *S. cerevisiae* (gene *ScXYL2*) em relação aos seus substratos/produtos são:  $K_m_{\text{xilitol}} = 25 \text{ mM}$ ,  $K_m_{\text{NAD}^+} = 240 \text{ }\mu\text{M}$ ,  $K_m_{\text{xilulose}} = 1,1 \text{ mM}$  e  $K_m_{\text{NADH}} = 55 \text{ }\mu\text{M}$  (RICHARD, TOIVARI, PENTTILA, 2000). Esses valores de afinidades sugerem que a enzima atua na direção reversa, ou seja, a xilulose é reduzida a xilitol. No entanto, assim como a expressão do gene *GRE3*, a expressão do *ScXYL2* também é extremamente baixa ou mesmo inexistente.

### 1.7.3 Balanço Redox Intracelular

Eliasson e colaboradores (2000) foram os primeiros a obter sucesso no crescimento anaeróbio de *S. cerevisiae* em meios contendo apenas xilose como fonte de carbono. A linhagem recombinante TMB3001, construída por esses pesquisadores, possuía integrado em seu genoma os genes *XYL1* e *XYL2* de *S. stipitis*, além de uma cópia sobre-expressa do gene endógeno *ScXKS1* (ELIASSON et al., 2000). Essa linhagem proveu um importante ponto de partida para subsequentes experimentos com o objetivo de identificar os passos limitantes no metabolismo e no transporte de xilose em *S. cerevisiae* (ELIASSON et al., 2000; CHU, LEE, 2007).

No entanto, linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes que expressam os genes heterólogos *XYL1* (XR) e *XYL2* (XDH) estão sujeitas a um desequilíbrio no balanço redox intracelular. Isso acontece devido a diferentes especificidades nos cofatores utilizados pelas enzimas XR e XDH. Por exemplo, a enzima XR de *S. stipitis* utiliza NADPH (preferencialmente) enquanto que a XDH de *S. stipitis* utiliza somente  $\text{NAD}^+$ . Durante o metabolismo em condições microaeróbias (propício à fermentação alcoólica) ocorre um acúmulo de  $\text{NADP}^+$  e NADH, gerando um desequilíbrio no balanço redox intracelular ( $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  e  $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ ). Nessas condições, o NADPH pode

ser regenerado na Via das Pentoses-Fosfato, porém uma quantidade pequena de  $\text{NAD}^+$  é reciclada para a reação da XDH (NISSEN et al., 2001). Sabendo que a reação enzimática da XDH fica prejudicada pela falta/escassez do cofator  $\text{NAD}^+$ , ocorre um acúmulo excessivo de seu substrato, o xilitol.

Nesse sentido, *S. cerevisiae* recombinantes que expressam as enzimas *SsXR* e *SsXDH* são capazes de crescer em xilose mas esse desequilíbrio redox pode ser o fator principal para que o xilitol seja excretado como o subproduto mais abundante (BRUINENBERG et al., 1983; KÖTTER, CIRIACY, 1993) em detrimento da produção de etanol. *S. cerevisiae* não possui uma transidrogenase, o que resulta num acúmulo citosólico de NADH durante o consumo de xilose (BRUINENBERG et al., 1985). Uma estratégia estudada para contornar esse problema foi expressar uma Transidrogenase, a qual seria capaz de converter o NADH em NADPH, restabelecendo um equilíbrio entre os cofatores. A expressão heteróloga do gene da transidrogenase da bactéria *Azotobacter vinlandii* (NISSEN et al., 2001) em *S. cerevisiae* reduziu a produção de xilitol, embora tenha aumentado a produção de outro subproduto, o glicerol, ao invés do etanol. Assim, essa abordagem usando a reação da transidrogenase pode não ser tão útil na fermentação alcoólica da xilose (JEPPSSON et al., 2003a).

Uma estratégia promissora para alcançar a redução na excreção de xilitol e melhorar o rendimento de etanol em *S. cerevisiae* consumidoras de xilose é provocar alterações na especificidade dos cofatores nas enzimas XR e XDH através de engenharia proteica (MATSUSHIKA et al., 2009a). Essa tecnologia consiste em desenhar e construir novas proteínas ou enzimas com funções novas ou desejáveis através da modificação da sequência de aminoácidos usando tecnologias de DNA recombinante. Linhagens consumidoras de xilose com proteínas recombinantes com alteração na preferência dos cofatores mostraram aumento no rendimento de etanol e redução na formação de xilitol em condições anaeróbicas. A construção da enzima XR de *S. stipitis* com afinidade reduzida pelo cofator NADPH (KOSTRZYNSKA, SOFHER, LEE, 1998) e sua expressão em *S. cerevisiae* consumidoras de xilose (expressando ainda *SsXDH* e *ScXK*) melhorou a produção de etanol ao mesmo tempo que reduziu a excreção de xilitol (JEPPSSON et al., 2006; SALEH et al., 2006; WATANABE et al., 2007a; WATANABE et al., 2007b). No mesmo sentido, foi construída uma XR com preferência por NADH a partir do genoma da levedura *Cattleya tenuis* (gene *CtXYL1*) e expressa em *S. cerevisiae*

consumidoras de xilose e obteve-se também incremento na produção de etanol e redução na excreção de xilitol (PETSCHARCHER, NIDETZKY, 2008).

Além disso, têm sido gerados com sucesso diversos mutantes que expressam o gene *SsXYL2* modificado e que codifica uma XDH com completa reversão de especificidade para o cofator NADP<sup>+</sup>. Essa construção foi feita através de múltiplas mutações sítio-dirigidas dentro do domínio de ligação do cofator (WATANABE, KODAKI, MAKINO, 2005). Uma linhagem industrial recombinante de *S. cerevisiae*, MA-R5, expressando a enzima XDH dependente de NADP<sup>+</sup> rapidamente demonstrou alta produção de etanol e baixo produção de xilitol, não apenas em culturas com xilose sendo a fonte única de carbono, como em co-culturas de glicose e xilose (MATSUSHIKA et al., 2009b). Essas enzimas modificadas são uma demonstração de uma aplicação bem sucedida de engenharia de proteínas para o melhoramento da fermentação de xilose (CHU, LEE, 2007).

#### 1.7.4 Xilose Isomerase (XI)

A enzima XI (EC 5.3.1.5) catalisa a conversão de xilose a xilulose através de uma única etapa que dispensa o uso de cofatores, conforme apresentado na via 2 da Figura 4 (JEFFRIES, JIN, 2000). A denominação *XYLA* designa genericamente os genes que codificam uma XI. O uso da via da XI é uma estratégia alternativa para contornar os problemas do desequilíbrio do balanço redox intracelular e da excessiva excreção de xilitol decorrentes das reações catalisadas pelas enzimas XR e XDH.

A enzima XI está presente em diversos microrganismos (fungos e bactérias), tendo com exemplos: *Actinoplanes missouriensis* (AMORE, WILHELM, HOLLENBERG, 1989), *Clostridium thermosulfurigenes* (MOES, PRETORIUS, VAN ZYL, 1996), *Escherichia coli* (SARTHY et al., 1987), *Bacillus subtilis* (AMORE, WILHELM, HOLLENBERG, 1989), *Streptomyces rubiginosus* (GÁRDONYI, HAHN-HÄGERDAL, 2003), *Thermus thermophilus* (WALFRIDSSON et al., 1996), *Piromyces* sp. (KUYPER et al., 2003), *Orpinomyces* sp. (MADHAVAN et al., 2009a) e *Clostridium phytofermentans* (WALFRIDSSON et al., 1996; KUYPER et al., 2003).

O uso da via da XI vem sendo estudado por diversos pesquisadores. Os genes *XYLA* de *A. missouriensis* (AMORE, WILHELM, HOLLENBERG, 1989), de *B. subtilis* (AMORE, WILHELM, HOLLENBERG, 1989) e de *C. thermosulfurigenes* (MOES, PRETORIUS, VAN ZYL, 1996) foram expressos em *S. cerevisiae*, no

entanto, sem sucesso, resultando em proteína inativas. A XI de *E. coli* expressa em *S. cerevisiae* obteve atividade enzimática 1000 vezes menor (HO et al., 1983; SARTHY et al., 1987). A reduzida ou falta de atividade enzimática da XI bacteriana quando expressas em *S. cerevisiae* tem sido atribuída a erros de dobramento, modificações pós-traducionais, formação de pontes disulfídicas. O primeiro caso bem sucedido de expressão heteróloga de XI em *S. cerevisiae* foi feito com o gene *XYLA* de *T. thermophilus*. A linhagem recombinante criada foi capaz de fermentar xilose, no entanto, ainda com baixo rendimento de etanol e com excreção de xilitol, o qual é inibidor da própria XI (WALFRIDSSON et al., 1996). A XI de *T. thermophilus* tornou-se uma importante enzima para futuros estudos de fermentação de xilose usando uma Isomerase (CHU, LEE, 2007).

O gene *XYLA* de *Piromyces* sp. (KUYPER et al., 2003) e *Orpinomyces* sp. (MADHAVAN et al., 2009a) também foram funcionalmente expressos em altos níveis em *S. cerevisiae* mas o crescimento em xilose foi bastante lento. Para superar essas dificuldades, processos de evolução (KUYPER et al., 2004; KUYPER et al., 2005a; MADHAVAN et al., 2009b) ou engenharia genética extensiva (KUYPER et al., 2005b; MADHAVAN et al., 2009a) têm sido aplicados para melhorar a fermentação de xilose a etanol. Brat, Boles e Wiedemann (2009) reportaram a expressão bem sucedida da XI bacteriana de alta atividade de *C. phytofermentans* em *S. cerevisiae*, enzima essa que demonstrou reduzida inibição pelo xilitol.

### 1.7.5 Xiluloquinase (XK)

A enzima XK (EC 2.7.1.17) promove a conversão catalítica da xilulose em Xilulose-5-Fosfato (X5F) com o consumo de uma molécula de ATP (DENG, HO 1990; RODRIGUEZ-PENA et al., 1998). A X5F é uma molécula precursora capaz de entrar na Via das Pentoses-Fosfato e, dessa forma, ser direcionada para a Glicólise. As unidades de carbono provenientes da X5F podem, então, serem utilizadas para produção de energia via respiração ou fermentação. A Via das Pentoses-Fosfato e seus intermediários metabólicos serão melhores abordados em seção posterior

A denominação *XKS1* designa genericamente os genes que codificam uma XK. Em *S. cerevisiae*, o gene *XKS1* (*ScXKS1* ou ORF – YGR194c) codifica uma XK endógena (YANG, JEFFRIES 1997; RICHARD, TOIVARI, PENTTILA, 2000). Contudo, a *ScXK* é expressa em níveis bastante baixos, e normalmente está relacionada a um ponto

de gargalo no metabolismo da xilose (CHANG, HO 1988). Como já mencionado, *S. cerevisiae* é capaz de crescer utilizando a xilulose como fonte de carbono, e a deleção do gene *ScXKS1* resulta em mutantes incapazes de crescer nesse açúcar (RODRIGUEZ-PENA et al., 1998; RICHARD, TOIVARI, PENTTILA, 2000).

Uma estratégia utilizada por diversos pesquisadores foi sobre-expressar o gene *ScXKS1* em *S. cerevisiae* que utilizam xilose, obtendo resultados diversos e muitas vezes contraditórios. Em relação à atividade da XK, o seu nível de expressão ótimo para uma utilização efetiva da xilose ainda permanece sob debate (MATSUSHIKA et al., 2009a). Eliasson e colaboradores (2000) expressaram os genes *SsXYL1*, *SsXYL2* e *ScXKS1* na linhagem TMB3001 de *S. cerevisiae* a qual foi capaz de fermentar xilose e cofermentar glicose e xilose, embora com um rendimento de etanol ligeiramente baixo. Toivari e colaboradores (2001) também reportaram produção de etanol a partir da xilose em linhagens de *S. cerevisiae* que sobre-expressam o gene *ScXKS1* e expressam os genes *SsXYL1* e *SsXYL2*. Embora esses esforços tenham melhorado o rendimento de etanol a partir da xilose em linhagens de *S. cerevisiae*, o xilitol ainda permaneceu como o principal subproduto do metabolismo. Já Ho, Chen e Brainard (1998) sobre-expressaram o gene *ScXKS1* em *S. cerevisiae* recombinantes que expressavam os genes *SsXYL1* e *SsXYL2* e obtiveram melhora na produção de etanol e queda na excreção de xilitol a partir da xilose.

Por outro lado, Rodriguez-Pena e colaboradores (1998) demonstraram que a sobre-expressão do gene *ScXKS1* inibe o crescimento de *S. cerevisiae* tendo como fonte de carbono a xilulose. Johansson e colaboradores (2001) encontraram que a sobre-expressão do gene *ScXKS1* reduz consideravelmente o consumo de xilose em *S. cerevisiae* recombinantes apesar de aumentar o rendimento de etanol a partir da xilose. Jin e colaboradores (2003) estudaram a expressão do gene *XKS1* da levedura *S. stipitis* (*SsXKS1*) em *S. cerevisiae* recombinantes que expressavam altos níveis de *SsXYL1* e *SsXYL2*. Em linhagens nas quais a expressão de *SsXK* foi elevada, houve um efeito inibitório no crescimento em xilose, enquanto que a expressão em níveis moderados permitiu o crescimento (JIN et al., 2003). Vale ressaltar que a atividade específica da enzima XK oriunda do gene *SsXKS1* é maior quando comparado a do gene *ScXKS1*. Outros pesquisadores não encontraram nenhum efeito inibitório da sobre-expressão do gene *XKS1* em *S. cerevisiae* recombinantes consumidoras de xilose (RICHARD, TOIVARI, PENTTILA, 2000; TOIVARI et al., 2001; MATSUSHIKA, SAWAYAMA, 2008). Uma explicação para o efeito inibitório na

produção de etanol em células expressando altos níveis de XK seria o acúmulo anormal de X5F (produto da reação da enzima XK) e consequentemente, a depleção dos níveis de ATP (JOHANSSON et al., 2001; JIN et al., 2003). Ensaios com mutantes espontâneos ou quimicamente induzidos conduzidos em *S. cerevisiae* transformadas para consumir xilose identificaram dois genes, *TAL1* e *PHO13*, os quais são apontados como importantes moduladores do efeito inibitório causado pela sobre-expressão dos genes *ScXKS1* e *SsXKS1*. Os eventos mutacionais ocorridos e que causaram a sobre-expressão do gene *TAL1* (transaldolase) ou a inativação do gene *PHO13* (fosfatase alcalina) foram suficientes para reverter o efeito inibitório causado pelos altos níveis de XK (NI, LAPLAZA, JEFFRIES, 2007).

### 1.7.6 Via das Pentoses-Fosfato (VPF)

A VPF é a única maneira de introduzir a xilulose na Via Glicolítica, uma vez que ambas as vias possuem metabólitos intermediários em comum (MATSUSHIKA et al., 2009a). Através das reações não oxidativas, a X5F (produto da enzima XK) pode ser convertida em gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) e frutose-6-fosfato (F6F), dois intermediários da Via Glicolítica. Uma vez que as duas vias (VPF e Glicolítica) se intercalam nesses metabólitos, esses intermediários produzidos a partir da xilose podem ser, em teoria, eficientemente convertidos a etanol (CAMPBELL, 2000).

As reações não oxidativas da VPF envolvem transferências de unidades de dois e de três carbonos (Figura 5). As reações de transferências de grupos que ligam a VPF com a via Glicolítica requerem dois tipos de açúcares de cinco carbonos. Duas moléculas de X5F (que podem ser produzidas pela metabolização da xilose) e uma molécula de ribose-5-fosfato (R5F - produto da isomerização da ribulose-5-fosfato pela enzima Fosfopentose-Isomerase) reorganizam-se para originar duas moléculas de F6F e uma molécula de GA3P (CAMPBELL, 2000). Um esquema representando as reações não-oxidativas envolvidas está representado na Figura 5.

A enzima Transcetolase (TKL - E.C. 2.2.1.1) catalisa a conversão de X5F e R5F em sedoheptulose-7-fosfato (SH7F) e GA3P, enquanto a enzima Transaldolase (TAL - E.C. 2.2.1.2) catalisa a conversão de SH7F e GA3P em F6F e eritrose-4-fosfato (E4F). Por último, a TKL catalisa a conversão da E4F e outra molécula de X5F em GA3P e F6F, conforme apresentando na Figura 5 (WALFRIDSSON et al., 1995).

A F6F e o GA3P remanescentes são convertidos a piruvato através da Via de Embden-Meyerhof-Parnas. Em condições anaeróbias, o piruvato será descarboxilado a acetaldeído, pela enzima Piruvato Descarboxilase. O acetaldeído é, então, reduzido a etanol, pela enzima Álcool Desidrogenase (CHU, LEE, 2007). A Figura 5 ilustra esquematicamente toda a via de utilização da xilose até etanol em leveduras *S. cerevisiae* recombinantes, com inserções dos genes da *XYL1* e *XYL2* ou *XYLA*.

Contudo, o fluxo de carbono através da VPF é reduzido em *S. cerevisiae* quando comparado com outras espécies de leveduras. Isso causa o acúmulo de metabólitos dessa via resultando, provavelmente, em baixas velocidades de fermentação da xilulose (KÖTTER, CIRIACY, 1993; WALFRIDSSON et al., 1995; MATSUSHIKA et al., 2009a). Nesse sentido, a superprodução de enzimas não-oxidativas da VPF, tais como as TALs, as TKLs, a ribulose-5-fosfato-3-epimerase (RPE1 - E.C. 5.1.3.1) e a ribose-5-fosfato-ceto-isomerase (RKII - E.C. 5.3.1.6) têm sido estudadas para melhorar o fluxo de carbono através da VPF em linhagens de *S. cerevisiae* consumidoras de xilose. Em particular, as enzimas TAL e TKL têm sido principalmente implicadas com a limitação na fermentação de xilose e xilulose. O acúmulo do intermediário SH7F durante a fermentação de xilulose é uma evidência da importância dessas enzimas para o processo (SENAC, HANH-HÄGERDAL, 1990).

A sobre-expressão do gene endógeno *TAL1* ou do gene *TAL* de *S. stipitis* em *S. cerevisiae* consumidoras de xilose tem demonstrado melhora no crescimento em xilose (WALFRIDSSON et al., 1995; JIN et al. 2003). Isso está de acordo com estudos prévios que apontam que o gene *TAL* limita o crescimento de *S. cerevisiae* em xilose através do fluxo limitado dos metabólitos na VPF (SENAC, HANH-HÄGERDAL, 1990; KÖTTER, CIRIACY, 1993;). Em contraste, a sobre-expressão do gene *TKL* de *S. stipitis* em *S. cerevisiae* consumidora de xilose mostrou considerável redução no crescimento em xilose (METZGER, HOLLENBERG, 1994). A importância da alta atividade enzimática na parte não oxidativa da VPF em linhagens de *S. cerevisiae* consumidoras de xilose foi adicionalmente sustentada por análises de expressão gênica (SONDEREGGER et al., 2004; TOIVARI et al., 2004) e análises de fluxo metabólico (PITKÄNEN et al., 2003).

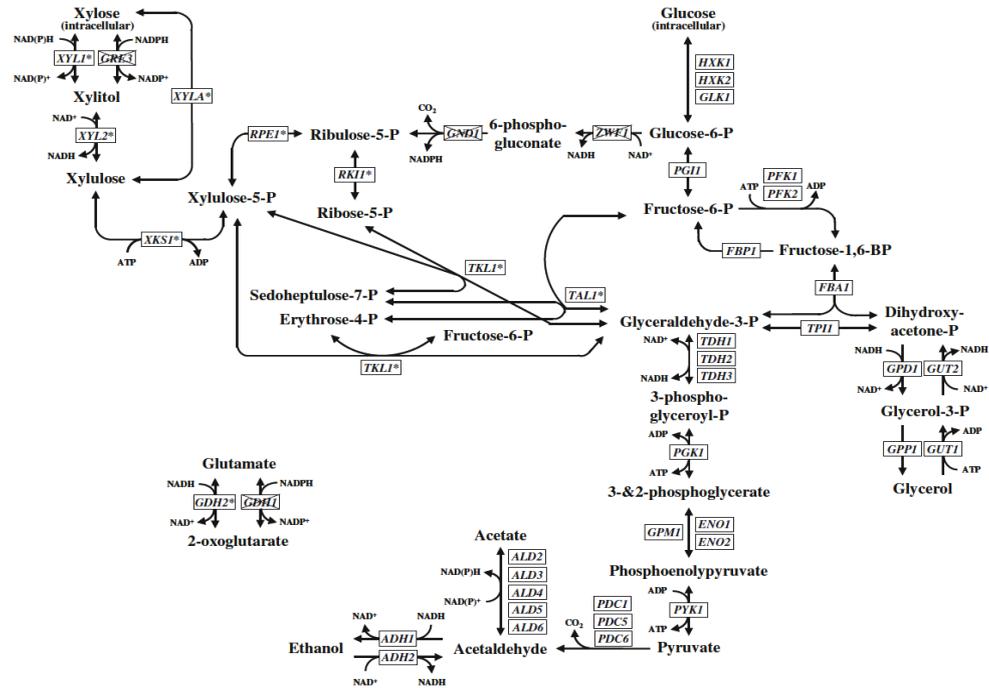


Figura 5: Visão geral da via metabólica em cepas de *S. cerevisiae* alteradas geneticamente para fermentação de xilose, com inserção dos genes exógenos que codificam as enzimas XR e XDH ou XI.

Fonte: MATSUSHIKA et al., 2009a.

### 1.7.7 Transporte de xilose

Mesmo não metabolizando naturalmente a xilose, *S. cerevisiae* nativas são capazes de internalizar esse açúcar. No entanto, essa levedura não possui transportadores específicos de xilose, sendo essa transportada para o ambiente intracelular através de difusão facilitada conduzida, principalmente, por transportadores de hexoses não específicos, como os codificados pelos genes *HXT* (KRUCKEBERG, 1996). Além disso, o gene *AGT1* tem sido reportado como importante para o transporte de xilose. O gene *AGT1* codifica a proteína Agt1 que é um *symporter* de alta afinidade de próton-sacarose e foi associada ao transporte de xilose (BATISTA, MILETTI, STAMBUK, 2004).

Estudos que utilizam a reintrodução e a expressão constitutiva individual dos genes *HXT* em mutantes com deleção prévia em todos os transportadores de hexoses, têm enfatizado a importância dos transportadores de alta e média afinidade Hxt4, Hxt5, Hxt7 e Gal2 como proteínas responsáveis pelo transporte da xilose (SEDLAK, HO, 2004). Os genes *HXT5* e *HXT7* são os únicos expressos quando a levedura *S. cerevisiae* cresce em xilose como fonte de carbono única, demonstrando sua particular importância no transporte de xilose na família de genes *HXT* (HAMACHER et al., 2002).

A expressão heteróloga de transportadores específicos de xilose em *S. cerevisiae* pode ser bastante promissora. Transportadores heterólogos de diferentes espécies, como *Candida intermedia*, *S. stipitis* e *Arabidopsis thaliana* têm sido inseridos em *S. cerevisiae*, resultando em linhagens recombinantes que exibem um transporte de pentoses melhorado (RUNQUIST, HAHN-HÄGERDAL, RADSTROM, 2010). A necessidade de melhorar o transporte de xilose em *S. cerevisiae* é tão importante quanto a necessidade de otimizar a via metabólica da xilose (CHU, LEE, 2007). Assim, a expressão heteróloga desses transportadores de xilose fornece uma grande promessa para o desenvolvimento futuro de linhagens de *S. cerevisiae* fermentadoras de xilose possuindo velocidades elevadas de captação e utilização de xilose (MATSUSHIKA et al., 2009a).

### 1.7.8 Engenharia evolutiva de leveduras

Adaptações evolutivas ou engenharia evolutiva, através de seleção natural e/ou indução de mutações randômicas, têm sido aplicadas com sucesso em *S. cerevisiae* como estratégia para melhorar a utilização/consumo de xilose. A pressão seletiva é um método particularmente útil, uma vez que é não invasivo e pode identificar pontos limitantes na metabolização da xilose. Três abordagens

principais de engenharia evolutiva têm sido aplicadas. Duas delas utilizam linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes consumidoras de xilose e uma utiliza linhagens nativas.

A primeira abordagem de adaptação evolutiva envolve o crescimento de linhagens recombinantes, inicialmente em ambiente aeróbio, e depois gradualmente adaptá-las a um ambiente anaeróbio (SONDEREGGER, SAUER, 2003). A segunda abordagem de adaptação evolutiva envolve o cultivo de linhagens recombinantes em meios com alternância na fonte de carbono disponível. A terceira abordagem adaptativa baseia-se na recente descoberta de que, sob intensa pressão seletiva, mutantes de *S. cerevisiae* podem espontaneamente surgir e crescer lentamente em xilose.

Attfield e Bell (2006) obtiveram colônias microscópicas de *S. cerevisiae* em meio mínimo contendo xilose após várias semanas de incubação. Por reprodução e seleção natural ao longo de várias gerações, uma linhagem não geneticamente modificada (nesse caso, não modificada com o uso de ferramentas moleculares) de *S. cerevisiae* (MGB-2303) foi obtida. Essa linhagem foi capaz de crescer em condições aeróbias em meio contendo xilose e com traços de xilitol, glicerol e etanol sendo produzidos. Além disso, essa linhagem demonstrou atividade enzimática para XDH (gene *ScXYL2*) e XR (gene *GRE3*) endógenas 80 e 4 vezes maiores, respectivamente, quando comparadas com sua linhagem de referência. Para a enzima XK (gene *ScXKS1*) não houve alteração na atividade enzimática (ATTFIELD, BELL, 2006). Essa linhagem representa a primeira evidência conclusiva de que uma linhagem de *S. cerevisiae* não modificada geneticamente pode ser desenvolvida para utilizar xilose através da expressão dos genes nativos para o metabolismo da xilose (*GRE3*, *ScXYL2* e *ScXKS1*).

### 1.7.9 Genes supressores da metabolização da xilose

Recentemente, alguns estudos têm apontado alguns genes como supressores da metabolização da xilose em *S. cerevisiae*. Usher e colaboradores (2011) associaram a deleção isolada dos genes *ALP1*, *ISC1*, *RPL20B* e *BUD21* em *S. cerevisiae* com uma melhora no consumo de xilose. Outros trabalhos destacam a importância do gene *PHO13* como um agente supressor do metabolismo da xilose (NI, LAPLAZA, JEFFRIES, 2007; VAN VLEET, JEFFRIES, OLSSON, 2008; FUJITOMI et al., 2012; SHEN et al., 2012; KIM et al., 2013). Nesses trabalhos, a deleção do gene *PHO13* em *S. cerevisiae* consumidoras de xilose trouxe diversas repercussões metabólicas, a

exemplo do aumento no consumo de xilose, aumento na produção de etanol e alteração na produção de outros metabólitos (acetato, glicerol e o xilitol). Nas seções subsequentes, os genes *BUD21* e *PHO13* serão melhor detalhados.

#### 1.7.9.1 *BUD21*

O gene *BUD21* (*YOR078W*), presente no genoma de *S. cerevisiae*, está localizado no cromossomo XV, possui 645 pb e codifica para um fator de biogênese ribossomal. A proteína Bud21p, a qual apresenta 214 aminoácidos e peso molecular de 24.365 daltons, está relacionada ainda com um componente do processoma da subunidade ribossomal menor (DRAGON et al., 2002; RISLER et al., 2012).

A expressão do gene *BUD21* é regulada positivamente em *S. cerevisiae* quando cultivadas/expostas a meios com altas concentrações de sacarose, possivelmente devido a uma forte resposta ao estresse osmótico existente (ANDO et al., 2006; PEREZ-TORRADO et al., 2010). Embora o gene *BUD21* esteja relacionado com o processamento e biogênese de proteínas ribossomais, essas funções podem ser transitoriamente alteradas quando em condições de estresse, como essas experimentadas durante o ambiente de fermentação (HIRASAWA, FURUSAWA, SHIMIZU, 2010). Portanto, a eliminação de certos aspectos da resposta ao estresse pode ser vantajosa, permitindo ignorar algumas das condições estressantes iniciais que ocorrem durante de fermentação.

Um estudo recente sugeriu o que o gene *BUD21*, o qual nunca havia sido relacionado com o metabolismo das pentoses, poderia estar atuando com o suposto supressor da via de fermentação da xilose (USHER et al., 2011). Segundo esse estudo, a linhagem laboratorial de *S. cerevisiae* S288C e, portanto, não consumidora de xilose, que teve sua cópia do gene *BUD21* deletada, passou a consumir xilose e produzir etanol, embora em quantidade ainda muito modesta (USHER et al., 2011).

No mesmo estudo, Usher et al. (2011) verificaram que a deleção do gene *BUD21* permitiu o crescimento em xilose também para a linhagem CEN.PK 113-13D, a qual também foi capaz de produzir etanol. Esses dados sugerem que a habilidade natural de *S. cerevisiae* de reconhecer e utilizar xilose foi suprimida, uma vez que essa levedura possui em seu genoma genes (*GRE3* e *ScXYL2*) responsáveis pela expressão de enzimas que metabolizam a xilose (XR e XDH) (USHER et al., 2011).

No entanto, a combinação da deleção do gene *BUD21* com a inserção dos genes exógenos *XYLA* e *XKSI* (através do plasmídeo integrativo pXYLA,XKSI) não resultou em incremento adicional na produção de etanol. Ao contrário, a combinação desses dois fatores contribuiu negativamente para a produção de etanol. Dessa forma, esses dados sustentam que a ativação da habilidade natural da levedura *S. cerevisiae* de utilizar/crescer em xilose (em cultivos aeróbios) não ocorre de forma sinérgica através da deleção do gene *BUD21* e da inserção de genes exógenos (*XYLA* e *XKSI*).

A associação/influência do gene *BUD21* no metabolismo da xilose é bastante recente, bem como muito restrita na literatura. Estudos adicionais são necessários para confirmar o real papel/influência desse gene nas vias metabólicas. Dessa forma, a deleção do gene *BUD21* em linhagens de *S. cerevisiae* foi avaliada neste estudo, no que se refere à reversão da inaptidão em consumir xilose.

#### 1.7.9.2 *PHO13*

As fosfatases alcalinas (ALP – *alkaline phosphatase*, termo em inglês) representam uma família de enzimas com várias isoformas, as quais são expressas dependendo da espécie considerada e de sua condição fisiológica (VAN HOOFF, DE BROE, 1994; MILLAN, FISHMAN, 1995). As ALPs são responsáveis por remover grupos fosfatos de diversos tipos de moléculas, incluindo nucleotídeos, proteínas, alcalóides. O Processo de remoção do grupo fosfato é chamado de desfosforilação. Os substratos das ALPs possuem uma molécula de fosfato inorgânico (Pi) em uma posição terminal, o qual pode ser removido e liberado para o meio de reação ou removido e transferido para um acceptor apropriado (DONELLA-DEANE et al., 1993; VAN HOOFF, DE BROE, 1994; MILLAN, FISHMAN, 1995; TULEVA, VASILEVA-TONKOVA, GALEBOVA, 1998; GALABOVA et al., 2000). Dessa forma, as ALPs contribuem para a homeostase celular do Pi, embora nem todos seus substratos naturais e suas funções específicas *in vivo* sejam conhecidos. No entanto, as ALPs têm sido associadas, em várias espécies, a diversos processos celulares fundamentais como: diferenciação, proliferação e sinalização celular, meiose, mitose, apoptose, migração celular, defesas imunológicas, regulação da síntese de DNA.

Em *S. cerevisiae*, as ALPs são produtos de dois genes estruturais: *PHO8* e *PHO13*, ambos localizados no cromossomo IV. O gene estrutural *PHO8* (*ORF - YDR481C*) codifica a enzima Pho8p (EC

3.1.3.1), a qual é uma glicoproteína bastante inespecífica em termos de substrato, localizada no vacúolo celular e de expressão reprimida na presença de Pi no meio celular (CLARK, TKACZ, LAMPEN, 1982; KANEKO, TOH-E, OSHIMA, 1982; KANEKO, et al., 1985). A Pho8p é uma proteína dimérica dependente de  $Mg^{2+}/Zn^{2+}$  bastante similar à encontrada em *E. coli* e em células de mamíferos (MITCHELL et al., 1981; DONELLA-DEANA et al., 1993; TULEVA, VASILEVA-TONKOVA, GALEBOVA, 1998; GALEBOVA et al., 2000;).

O gene estrutural *PHO13* (ORF - YDL236W), que codifica a enzima Pho13p (EC 3.1.3.41), está localizado no braço esquerdo do cromossomo IV (KANEKO et al., 1989). A *open reading frame* (ORF) do gene *PHO13* consiste de 936 pares de bases e codifica um polipeptídeo de 312 aminoácidos, tendo um peso molecular previsto de 34635 daltons (KANEKO et al., 1989). No entanto, a enzima Pho13p possui peso molecular de aproximadamente 60.000 daltons, o que sugere que esta enzima tem sua função ativa na forma de homodímero (ATTIAS, BONNET, 1972), uma vez que sua sequência nucleotídica não contempla a sequência 5'-TACTAAC-3', a qual é essencial para o processamento por *splicing* (LANGFORD, GALLAWITZ, 1983).

A enzima Pho13p é produzida constitutivamente e independe da presença ou ausência de Pi no meio (TOH-E, NAKAMURA, OSHIMA, 1976). A atividade ótima da Pho13p é em pH 8,2 e seu  $K_m$  para o substrato p-nitrofenilfosfato é de  $3,6 \times 10^{-5}$  M (TULEVA, VASILEVA-TONKOVA, GALEBOVA, 1998). A atividade da Pho13p é significativamente aumentada na presença de  $Mg^{2+}$  e inibida na presença dos íons  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Be^{2+}$  (ATTIAS, BONNET, 1972). Fosfato inorgânico e ATP são inibidores competitivos enquanto que o pirofosfato e AMP não apresentam nenhum efeito (ATTIAS, DURAND, 1973).

Embora caracterizada há muito tempo, a enzima Pho13p ainda não possui seu papel fisiológico completamente esclarecido. Alguns compostos artificiais têm sido reportados como substratos dessa enzima: p-nitrofenilfosfato (GORMAN, HU, 1969; ATTIAS, BONNET, 1972; TOH-E, NAKAMURA, OSHIMA, 1976), 4-metil-lumbeliferil-fosfato (MITCHELL et al., 1981), histidinil-fosfato (GORMAN, HU, 1969) e X5F (KIM et al., 2013). Além disso, Tuleva, Vasileva-Tonkova, Galebova, (1998) demonstraram atividade de fosfatase da Pho13p em proteínas nos resíduos de serina e treonina, sendo exemplos as proteínas caseína e histona II-A. Esses resultados mostrando atividade de fosfatase da Pho13p em proteínas traz novas perspectivas para elucidar o real papel dessa enzima, uma vez que sua atividade catalítica pode estar

envolvida na reversão de proteínas fosforiladas (TULEVA, VASILEVA-TONKOVA, GALEBOVA, 1998).

Em *S. cerevisiae*, a deleção do gene *PHO13* não produz nenhum efeito no crescimento celular em condições normais. Além disso, linhagens diploides homozigotas para a deleção do locus *PHO13* não mostraram nenhum defeito na esporulação ou viabilidade dos esporos (KANEKO et al., 1989). No entanto, Ni, Laplaza e Jeffries (2007) foram os primeiros a demonstrar a influência da deleção do gene *PHO13* em *S. cerevisiae* recombinantes consumidoras de xilose. Em seus experimentos, o efeito inibitório no consumo de xilose gerado pela sobre-expressão do gene *XYS1* (*ScXKS1* ou *SsXKS1*) em linhagens que expressam também os genes *SsXYL1* e *SsXYL2* foi revertido quando deletado o gene *PHO13*. Após a publicação desses resultados, diversos outros trabalhos avaliaram os efeitos dessa deleção sob outras circunstâncias experimentais. Van Vleet, Jeffries e Olsson (2008), encontraram que a deleção do gene *PHO13* melhora enormemente o crescimento em xilose como fonte única de carbono em linhagens de *S. cerevisiae* sobre-expressando a enzima XK (*SsXKS1* ou *ScXKS1*). A produção de etanol é também consideravelmente aumentada quando as cepas crescem em condições de oxigênio limitado (VAN VLEET, JEFFRIES, OLSSON, 2008). Fujitomi e colaboradores (2012) mostraram também que a deleção do gene *PHO13* em *S. cerevisiae* recombinantes que expressam *SsXYL1* e *SsXYL2* e sobre-expressam *SsXKI* promove melhora no crescimento celular em condições aeróbias e aumento na produção de etanol em condições de oxigênio limitado. Além disso, a deleção do gene *PHO13* mantém ainda os efeitos positivos quando na presença de inibidores da fermentação, como o ácido acético, o ácido fórmico e o furfural, bem como em hidrolisados de palha de arroz (FUJITOMI et al., 2012). Nesse sentido, a deleção do gene *PHO13* pode ser uma estratégia simples, porém poderosa, para aprimorar a produção eficiente de bioetanol de segunda geração, e será objeto de estudo neste trabalho utilizando uma linhagem industrial.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da deleção de genes potencialmente supressores da metabolização de xilose (genes *BUD21* e *PHO13*) em linhagens de *S. cerevisiae*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter linhagens de laboratório com o gene *BUD21* deletado e avaliar parâmetros de fermentação de xilose pelas linhagens recombinantes;
- b) Aplicar técnicas de deleção gênica em linhagem industrial diploide que sobre-expressa os genes necessários à metabolização de xilose (genes *XYL1*, *XYL2* e *XKS1*) para obtenção de linhagem recombinante com deleção do gene *PHO13*;
- c) Avaliar os parâmetros de crescimento e fermentação de xilose pela linhagem industrial recombinante com o gene *PHO13* deletado;
- d) Avaliar os parâmetros de co-fermentação de xilose/glicose e xilose/sacarose pela linhagem industrial recombinante com o gene *PHO13* deletado



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 LINHAGENS E MEIOS DE CULTIVO

As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas no presente trabalho estão descritas na Tabela 2. A cepa *DH5a* da bactéria *Escherichia coli* foi cultivada em meio líquido Luria-Bertani (LB, Sigma) para a multiplicação dos plasmídeos utilizados neste trabalho. As leveduras foram cultivadas em meio rico (YP) composto de 10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura (Fluka), 20 g L<sup>-1</sup> de peptona bacteriológica (Fluka) e suplementado com diferentes fontes de carbono, como glicose (Vetec), sacarose (Nuclear) ou xilose (Sigma-Aldrich), em diferentes concentrações (2 a 10%). Para a preparação de meio sólido foi adicionado 20 g L<sup>-1</sup> de Bacto-agar (Fluka). O pH dos meios líquidos foi ajustado para pH 5,0 com a adição de ácido clorídrico. Os meios foram esterilizados em autoclave a 120 °C por 15 minutos. Quando necessário, após a esterilização, os meios foram incubados em estufa a 60 °C por 30 min e suplementados com 200 mg L<sup>-1</sup> de Geneticina (G418 - Sigma), ou 500 mg L<sup>-1</sup> de Zeocina (Invitrogen) ou 0,5 mg L<sup>-1</sup> de Aureobasidina-A (Takara-Bio), ou 100 mg L<sup>-1</sup> de Ampicilina, em condições assépticas. Quando utilizada a Zeocina, o pH do meio foi ajustado para 8,0.

A xilose ou glicose foram preparadas e autoclavadas separadamente do meio de cultura, em uma solução de 500 g L<sup>-1</sup>, a fim de evitar a caramelização dos açúcares. Após a etapa de esterilização, a solução de açúcar foi adicionada aos meios de interesse de modo a atingir a concentração desejada. A sacarose foi preparada separadamente em uma solução de 500 g L<sup>-1</sup> e esterilizada por filtração, utilizando filtros estéreis de porosidade de 0,2 µm (Millipore Express® PES Membrane, MILLIPORE), para evitar o processo de hidrólise térmica desse açúcar. Após a etapa de esterilização, a solução de sacarose foi adicionada aos meios de interesse até atingir a concentração desejada.

##### 3.1.1 Preservação das Linhagens

As células de levedura foram armazenadas em criotubo, contendo as células cultivadas em meio de cultura YP suplementado com 25% glicerol (v/v), em *ultrafreezer* a -80 °C. Quando necessária a recuperação das células, os criotubos foram retirados do *ultrafreezer*. Em condições assépticas, uma alça bacteriológica foi friccionada na cultura contida no criotubo. Utilizando a técnica de esgotamento para se

**Tabela 2 – Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho**

<b>Linhagem</b>	<b>Genótipo ou descrição</b>	<b>Fonte ou referência</b>
CEN.PK113-7D	<i>MATaMAL2-8<sup>c</sup> SUC2</i>	Entian, Kötter, (1998)
CEN-D1	CEN.PK113-7D, <i>bud21Δ::KanMX4</i>	Este trabalho
CEN.PK2-1C	<i>MATaMAL2-8<sup>c</sup> SUC2ura3-52 his3Δ1 leu2-3,112 trp1-289</i>	Entian, Kötter, (1998)
CEN-D2	CEN.PK2-1C, <i>bud21Δ::KanMX4</i>	Este trabalho
YKB2666	<i>MATaura3-52 his3Δ1 leu2-3,112 trp1-289 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2 bud21Δ::KanMX6</i>	Usher et al. (2011)
Y01854	<i>MATahis3Δ0 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bud21Δ::KanMX4</i>	EUROSCARF
CAT-1	Linhagem diploide industrial, isolada na Usina VO Catanduva, SP, em 1998/1999	Basso et al. (2008)
MP-C5	CAT-1, <i>AUR1::pAUR-XKXDHXR</i>	Gonçalves (2014)
DDA-K1	MP-C5, <i>PHO13 /pho13Δ::KanMX4</i>	Este trabalho
DDA-B1	MP-C5, <i>pho13Δ::Ble<sup>r</sup> / PHO13</i>	Este trabalho
DDA-KB	DDA-K1, <i>pho13Δ::Ble<sup>r</sup> /pho13Δ::KanMX4</i>	Este trabalho

obter colônias isoladas, estrias foram realizadas com alça bacteriológica na superfície de uma placa de Petri contendo meio sólido YP-ágar suplementado com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 a 3 dias. As colônias obtidas foram coletadas, repicadas em novas placas de Petri contendo o mesmo meio (e suplementadas com Aureobasidina A, Geneticina ou Zeomicina, no caso das linhagens modificadas) e incubadas novamente em estufas bacteriológicas a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 a 3 dias. As linhagens foram conservadas nas placas de Petri a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por até 6 meses e, então, repicada para uma nova placa para armazenagem.

## 3.2 CULTIVOS CELULARES

### 3.2.1 Pré-cultivos

As leveduras, mantidas em placas de Petri, foram coletadas com auxílio de alça bacteriológica por raspagem da superfície do meio em condições assépticas. Uma quantidade suficiente de células para preencher a alça foi transferida para tubos de ensaios contendo 6 mL de meio rico YP acrescido de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Em seguida, os tubos foram incubados a  $28^\circ\text{C}$  por 48 horas com agitação orbital de 160 rpm (Incubator Shaker Series Innova@44 – New Brunswick Scientific).

### 3.2.2 Avaliação do crescimento celular em frasco agitado

Os crescimentos das leveduras foram realizados em frascos de *Erlenmeyers* de 250 mL, contendo 50 mL de meio rico YP suplementado com 20-100  $\text{g L}^{-1}$  de xilose. A esses meios foi adicionado, em condições assépticas, uma quantidade 2 mg de células (concentração inicial de biomassa celular  $\approx 0,04 \text{ g L}^{-1}$ ) sendo a Absorbância em 600 nm ( $\text{Abs}_{600}$ ) inicial ajustada para um valor aproximado de 0,15. As leituras de  $\text{Abs}_{600}$  foram realizadas num espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies), devendo essas leituras ficar entre os valores de 0,030 e 0,300. As amostras foram diluídas conforme a necessidade, ajustando a leitura aos limites aceitos, para que não ocorressem distorções por ausência de linearidade entre a absorbância e a concentração celular em valores de  $\text{Abs}_{600}$  maiores do que 0,300. A seguir as células foram incubadas a  $28^\circ\text{C}$  sob agitação orbital de 160 rpm. As amostras foram removidas da cultura em tempos pré-determinados para a determinação do crescimento celular ( $\text{Abs}_{600}$ ) e concentração de açúcares e metabólitos como descrito a seguir.

### 3.2.3 Avaliação do crescimento celular em placas de Petri

As leveduras foram colocadas em condições assépticas (em capela de fluxo laminar) num poço de uma placa de ELISA com uma  $Abs_{600}$  de 0,5, num volume final de 200  $\mu$ L de água estéril. Essa suspensão celular sofreu cinco diluições seriadas, com fator de diluição igual a cinco. A seguir um carimbo metálico previamente esterilizado foi mergulhado nas suspensões celulares contidas nos poços da placa de ELISA (nas diversas concentrações) e depois posicionado em cima da superfície das placas de Petri contendo os meios sólidos de interesse. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 5 dias e fotografadas a cada 24 horas com um fotodocumentador (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System, Bio-Rad).

### 3.2.4 Fermentação em batelada simples em frasco agitado

As leveduras foram pré-crescidas em 6 tubos, transferidas sob condições assépticas para um tubo Falcon de 50 mL, centrifugadas (4000 G, 3 min, 4 °C), e lavadas duas vezes com 10 mL de água destilada estéril. Os ensaios de fermentação das leveduras foram realizados em garrafas de 25 mL com tampas de rosca, contendo 20 mL de meio rico YP suplementado com o(s) açúcar(es) de interesse (xilose, glicose e/ou sacarose) e uma concentração inicial de células entre 2,7 a 4,05 g L<sup>-1</sup> e que corresponde a uma  $Abs_{600}$  entre 10 e 15 (GONÇALVES, 2014). Os frascos foram incubados sob agitação com barras magnéticas de 3x3x5 mm num Magnetic Stirrer ST10 (FinePCR), em sala com temperatura controlada a 28 °C, e amostras foram removidas da cultura em tempos pré-determinados.

### 3.2.5 Processamento das amostras

Em cada tempo de coleta nos ensaios de crescimento e fermentação, uma alíquota de amostra (conservada em gelo) foi retirada para determinar a  $Abs_{600}$ . Para determinação da massa seca de leveduras, o valor de  $Abs_{600}$  mensurado foi multiplicado pelo fator de diluição e por um Fator de Conversão de 0,27, obtido pela razão entre a massa seca de células e a absorbância da cultura (DÁRIO, 2012). O restante da amostra foi centrifugado (13000 G, 6 min, 4°C) e o sobrenadante coletado, transferido para novo eppendorf e estocado a -20°C para posterior determinação dos açúcares (glicose, sacarose e xilose) e dos metabólitos (xilitol, glicerol e etanol), conforme descrito a seguir. Os ensaios foram realizados com réplicas técnicas e biológicas.

### 3.3 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

A quantificação de sacarose, glicose, frutose, xilose, xilitol, glicerol e etanol foi realizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, JASCO X-LC, Tokyo, Japan), com detector de índice de refração (RI 2031 *plus*, JASCO, Tokyo, Japan) e coluna para ácidos orgânicos (HyperREZ XP Organic Acid Column, Thermo Scientific). A fase móvel utilizada foi solução de ácido sulfúrico 5 mM, a 40 °C, com um fluxo de 100  $\mu\text{L min}^{-1}$ , e o volume de amostra foi de 10  $\mu\text{L}$ . Alternativamente, os açúcares também foram quantificados por métodos enzimáticos/colorimétricos conforme descrito a seguir.

#### 3.3.1 Quantificação de glicose

A concentração de glicose foi determinada através de kit enzimático comercial (GLICOSE PAP Liquiform) utilizado para diagnóstico *in vitro* de glicemia humana, seguindo as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica S.A, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). O princípio do método consiste na oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase (GOD), produzindo ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Em seguida, a enzima peroxidase (POD) catalisa a reação entre o peróxido de hidrogênio, a 4-aminoantipirina e o fenol, formando a quinonimina, que é um complexo químico de cor vermelha. A intensidade de cor, medida em espectrofotômetro, é proporcional à concentração de glicose nas amostras. Um volume de 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra, assim como da solução padrão de 1 g  $\text{L}^{-1}$  de glicose, foram incubados com 1 mL do reagente de cor por 10 minutos em Banho Maria a 37 °C. Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  do padrão e de cada amostra foram transferidos para uma placa de ELISA de 96 poços e a leitura das absorbâncias foi realizada em uma Leitora Multifuncional (TECAN, modelo M200) com comprimento de onda de 505 nm. A concentração de glicose foi calculada através da proporção entre a absorbância apresentada pela amostra e a absorbância da solução padrão de glicose.

#### 3.3.2 Quantificação de Sacarose

O princípio do método consiste em utilizar a enzima invertase para hidrolisar as moléculas de sacarose presentes nas amostras, produzindo glicose e frutose. Em seguida, a glicose formada foi determinada como descrito anteriormente, sendo que a intensidade de cor medida em espectrofotômetro é proporcional à concentração de glicose nas amostras, que por sua vez é proporcional à concentração de sacarose. A concentração da sacarose foi determinada utilizando-se um

protocolo adaptado de Holmes (1997): Um volume de 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi incubado com 80  $\mu\text{L}$  de solução de 1  $\text{g L}^{-1}$  de invertase (Sigma) em tampão CPB (0,05 M de ácido cítrico e 0,09 M de fosfato dibásico de sódio, pH 4.5), em Banho Maria a 37 °C por 30 minutos. A seguir, os tubos foram incubados em Banho Maria a 100°C por 5 minutos e, em seguida, esfriados em banho de gelo por mais 5 minutos. Na sequência, os tubos foram centrifugados (5000 G, 3 min, 4 °C) e a parte líquida (sobrenadante) foi utilizada para quantificar a glicose formada. A concentração da sacarose foi calculada através da concentração da glicose encontrada nas amostras, antes e depois da adição da solução de invertase, utilizando a equação 1.

$$C_{\text{sacarose}} = \{[(\text{Abs}_{\text{amostra}} \cdot C_{\text{padrão}})/\text{Abs}_{\text{padrão}}] \cdot 5 \cdot D\} - C_{\text{glicose}} \cdot 2$$

**(Equação 1)**

Onde:  $C_{\text{sacarose}}$  = Concentração de sacarose na amostra em  $\text{g L}^{-1}$ ;  
 $\text{Abs}_{\text{amostra}}$  = Absorbância em 505 nm do tubo amostra;  
 $\text{Abs}_{\text{padrão}}$  = Absorbância em 505 nm do tubo padrão de glicose;  
 $C_{\text{padrão}}$  = Concentração de glicose no padrão ( $1 \text{ g L}^{-1}$ );  
 5 = fator de diluição da amostra após incubação com invertase (20  $\mu\text{L}$  de amostra e 80  $\mu\text{L}$  de solução de invertase);  
 D = Fator de diluição da amostra;  
 $C_{\text{glicose}}$  = Concentração de glicose em  $\text{g L}^{-1}$ , determinada previamente sem a adição de invertase;  
 2 = Fator para conversão da concentração de glicose em sacarose.

A atividade da invertase foi previamente verificada através da construção de uma curva de calibração. Para isso, um volume de 20  $\mu\text{L}$  dos calibradores (soluções padrão de sacarose contendo 5-20  $\text{g L}^{-1}$ ) foi incubado com invertase e processadas como descrito acima. Curvas de calibração foram construídas através de gráficos ( $C_{\text{calibrador}}$ ) vs. ( $\text{Abs}_{\text{Calculada}}$ ), ou seja, valores de concentração dos calibradores em  $\text{g L}^{-1}$  ( $C_{\text{calibrador}}$ ) em função da absorbância dos calibradores ( $\text{Abs}_{\text{Calculada}}$ ), para confirmar a linearidade da reação (atividade da invertase é constante no intervalo de concentração utilizado).

### 3.3.3 Quantificação de Açúcares Redutores

A concentração de açúcares redutores (glicose, frutose e xilose) foi determinada através da reação química, utilizando um protocolo adaptado de Miller (1959). O princípio do método consiste na reação dos açúcares redutores com o ácido dinitrosalicílico em meio alcalino para formar um complexo de cor púrpura-carmin. A intensidade de cor formada foi determinada em espectrofotômetro, sendo proporcional à concentração de açúcares redutores totais nas amostras. Um volume de 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra e de calibradores (soluções de açúcares com 0,4 a 2  $\text{g L}^{-1}$ ) foi incubado com 150  $\mu\text{L}$  de reagente DNS (0,04 M de ácido 3,5-dinitrosalicílico; 0,5 M de NaOH; 0,7 M de tartarato de sódio e potássio; 0,02 M de fenol) em Banho Maria a 100 °C por 10 minutos, e em seguida esfriados em banho de gelo por 5 minutos. Um volume de 800  $\mu\text{L}$  de água destilada foi adicionado aos tubos e, em sequência, um volume de 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra e dos calibradores foi transferido para uma placa de ELISA de 96 poços para a determinação da absorbância numa Leitora Multifuncional (TECAN) no comprimento de onda de 540 nm. Curvas de calibração foram construídas, através de gráficos ( $C_{\text{Calculada}}$ ) vs. ( $Abs_{\text{Calculada}}$ ), ou seja, valores de concentração dos calibradores em  $\text{g L}^{-1}$  ( $C_{\text{Calculada}}$ ) em função da absorbância dos calibradores ( $Abs_{\text{Calculada}}$ ), e utilizadas para a obtenção de regressões lineares. Os valores de absorbâncias das amostras foram empregados nas regressões lineares obtidas, permitindo calcular a concentração de açúcares redutores totais nas amostras (equação 2).

$$C_{\text{totais}} = [(B_1 \cdot Abs_{\text{Amostra}}) \cdot D] \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:  $C_{\text{totais}}$  = Concentração de açúcares redutores em  $\text{g L}^{-1}$ ;  
 $B_1$  = Valor para o coeficiente angular, obtido a partir da regressão linear dos calibradores;  
 $Abs_{\text{Amostra}}$  = Absorbância em 540 nm do tubo amostra;  
 $D$  = Fator de diluição da amostra;

Nos ensaios de co-fermentação utilizando glicose e xilose ou sacarose e xilose como fontes de carbono, a concentração de xilose foi estimada pela diferença entre a concentração de açúcares redutores e a concentração de glicose. Lamentavelmente, esse método não permite distinguir as concentrações de xilose e frutose (ambos açúcares redutores) no caso das co-fermentações de sacarose com xilose.

## 3.4 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 3.4.1 Extração e purificação de plasmídeos

Bactérias *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse, pUG6 (genótipo relevante *loxP-P<sub>TEF</sub>-KanMX-T<sub>TEF</sub>-loxP*, GÜLDENER et al., 1996) ou pUG66 (*loxP-P<sub>TEF</sub>-Ble<sup>r</sup>-T<sub>TEF</sub>-loxP*, GÜLDENER et al., 2002), foram coletadas da superfície do meio LB sólido com Ampicilina, com auxílio de alça bacteriológica, e transferidas para tubo de ensaio contendo 6 mL de meio líquido LB com Ampicilina. A cultura foi incubada sob agitação orbital de 137 rpm a 37 °C por 24 horas (Incubator Shaker Series Innova®44 – New Brunswick Scientific). A seguir 1,5 mL da cultura foram transferidos para tubos *ependorf* e centrifugado (6000 G; 3 min), desprezando-se a parte líquida. Os plasmídeos de interesse foram extraídos das células através da técnica de *Miniprep* como descrito por Maniatis, Fritsch, Sambrook (1982). Um volume de 100 µL de Tampão GTE (50 mM de glicose, 10 mM de EDTA e tampão 25 mM Tris-HCl, pH 8,0) e 1 µL de RNase (1 g L<sup>-1</sup> de RNase em tampão 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 contendo 1 mM de EDTA) foram adicionados às células precipitadas, as quais foram suspensas invertendo gentilmente o tubo. Após incubação por 5 min a temperatura ambiente, um volume de 200 µL de solução de NaOH/SDS (0,2 M de NaOH e 1% de SDS, preparada na hora) foi adicionado ao tubo. Os tubos foram gentilmente agitados por 1 min e incubados em banho de gelo por 5 min. A seguir um volume de 150 µL de solução 5 M de acetato de potássio foi adicionado, e os tubos agitados em vórtex por 2 segundos. Os tubos foram incubados em banho de gelo por 5 min e novamente agitados em vórtex por 1 segundo. Em seguida, os tubos foram centrifugados (9000 G, 5 min) e um volume de 400 µL do sobrenadante foi transferido para um novo *ependorf*. Na sequência, um volume de 800 µL de etanol 95% foi adicionado ao tubo e incubado a -20°C por 30 minutos. Em seguida, o tubo foi centrifugado (12.000 G, 15 min) e a parte líquida desprezada. Um volume de 1 mL de etanol 70% foi adicionado ao precipitado, e os tubos foram novamente centrifugados (12.000 G, 5 min). A parte líquida foi totalmente removida e os tubos contendo o DNA precipitado (plasmídeos) foram deixados por 1 h em capela de fluxo laminar para secagem. Em seguida o precipitado foi suspenso em 50 µL de água ultrapura estéril. Os plasmídeos foram armazenados sob refrigeração a -20 °C até sua utilização.

### 3.4.2 Extração de DNA genômico das leveduras

O DNA genômico das leveduras foi extraído utilizando-se o kit de extração comercial *YeaStar™ Genomic DNA Kit* (Zymo Research) seguindo todas as recomendações do fabricante. O DNA foi eluído das colunas do kit com água ultrapura e armazenados sob refrigeração a -20°C até sua utilização.

### 3.4.3 Eletroforese em gel de agarose

Plasmídeos e fragmentos de DNA foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (MANIATIS; FRITSGH; SAMBROOK, 1982). Um volume de 10 µL da solução contendo DNA foi misturado com 2 µL de tampão de corrida concentrado 6 vezes (20% de Ficoll 400, 0,1 M de EDTA, 1,6 % SDS e 0,05% de azul de bromo fenol) e aplicado em gel de 1% agarose, contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de brometo de etídio em tampão TBE 0,5X (1 mM de EDTA em tampão 45 mM Tris-borato pH 8,0). Um volume de 6 µL de marcador de peso molecular 1 kb ladder (Fermentas) foi também aplicado no gel. O gel foi submetido à eletroforese em tampão TBE 0,5X a 68 mV por 40 a 80 min. Após o término da corrida, o gel foi analisado e fotografado sob luz ultravioleta em um fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad).

### 3.4.4 Reações de PCR

Para construção dos módulos de deleção gênica, a reação de PCR foi realizada utilizando uma enzima de alta fidelidade durante a polimerização das fitas de DNA (*Phusion High Fidelity DNA Polymerase*, Finnzymes) nas seguintes condições: 50 ng de DNA plasmidial, 200 µM de dNTPs, 5 µM de cada iniciador, 1 U da enzima *Phusion* em tampão apropriado (vem junto com a enzima) e água ultrapura esterilizada para completar um volume de 50 µL. O programa de PCR utilizado num termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) foi composto pelas seguintes etapas: (1) desnaturação inicial a 98 °C por 30 s; (2) 30 ciclos com um passo de desnaturação a 98 °C por 10 s, anelamento dos iniciadores a 59 °C por 20 s, e a extensão das fitas a 72 °C por 15-30 s/Kb; e (3) um passo de extensão final de 72 °C por 5 minutos. Para a verificação da correta inserção dos módulos de deleção gênica no genoma das linhagens transformadas, as reações da PCR foram realizadas utilizando-se a enzima PAQ5000 (Stratagene) com as seguintes condições: 50 ng de DNA genômico, 200 µM de dNTPs, 5 µM de cada iniciador, 2,5 U de PAQ5000 DNA polimerase em tampão apropriado (vem junto com a enzima) e água ultrapura esterilizada para

completar um volume de 25  $\mu\text{L}$ . O programa utilizado no termociclador foi idêntico ao detalhado acima, com exceção que o passo de extensão das fitas durante os 30 ciclos foi a 72 °C por 30-60 s/Kb.

### 3.4.5 Transformação das linhagens de *S. cerevisiae*

As transformações de leveduras foram conduzidas de acordo com métodos descritos na literatura (AGATEP et al., 2002; GIETZ, WOODS, 2002). As linhagens de interesse foram pré-cultivadas conforme descrito no item 3.2.1, e um volume de 1,5 mL do pré-cultivo foi transferido para um frasco de *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 50 mL de meio rico YP contendo 20  $\text{g L}^{-1}$  de glicose. O frasco foi incubado a 28 °C sob agitação orbital de 160 rpm, até atingir  $\text{Abs}_{600}$  de aproximadamente 1 (em torno de 4 a 6 h). Após atingir a concentração celular desejada (em fase exponencial), a cultura foi transferida para um tubo Falcon e centrifugada (3000 G; 5 min), e a parte líquida contida no tubo foi totalmente desprezada com auxílio de pipetador. As células foram gentilmente suspensas em 1 mL de solução 0,1 M de acetato de lítio estéril e transferidas para um tubo eppendorf estéril. Em seguida, o tubo foi centrifugado (4000 G, 2 min), o sobrenadante desprezado e um volume de 300 a 500  $\mu\text{L}$  de 0,1 M de acetato de lítio foi adicionado ao tubo (o volume adicionado depende da  $\text{Abs}_{600}$  inicial da cultura, por ex.:  $\text{Abs}_{600} \approx 0,9$  adicionou-se 300  $\mu\text{L}$ ;  $\text{Abs}_{600} \approx 1,5$  adicionou-se 500  $\mu\text{L}$ ).

As células foram suspensas novamente com auxílio de agitador vórtex, e para cada alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de células (num tubo novo), foi acrescentado 300  $\mu\text{L}$  de 0,1 M de acetato de lítio contendo 40% de polietileno glicol (PEG 3350, Sigma), 5  $\mu\text{L}$  de DNA de fita simples (10  $\text{g L}^{-1}$  de DNA de esperma de salmão, previamente incubado em Banho Maria a 100 °C por 5 min e resfriado rapidamente em banho de gelo), e 50  $\mu\text{L}$  do DNA do módulo para transformação (Tabela 3), ou o mesmo volume de água deionizada estéril nos controles negativos. As suspensões celulares foram gentilmente agitadas e em seguida incubadas em Banho Maria a 42 °C por 30 a 40 min, sendo depois os tubos centrifugados (4000 G, 2 min) e o sobrenadante desprezado com auxílio de pipetador. Em seguida, um volume de 1 mL de meio líquido YP contendo 20  $\text{g L}^{-1}$  de glicose foi adicionado ao tubo para suspender as células (gentilmente). Os tubos foram incubados a 28 °C por 3 a 4 h sob agitação orbital de 160 rpm, e então centrifugados (4000 G, 2 min) para desprezar o sobrenadante. Um volume de 500  $\mu\text{L}$  de água deionizada

**Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados na construção dos módulos de deleção gênica**

Oligonucleotídeo	Seqüência 5'→3'
DI-BUD21-F1	ATGAGTAATGGACACGTCAAGTTTGGATGCCGATGAAAGTCCAGCTGAAGCTTCGTACGC (1 a 40)
DE-BUD21-F1	CTGAACTGTTACTACCCGTATACACGTATTAAGTAAGACACCAGCTGAAGCTTCGTACGC (-40 a -1)
DI-BUD21-R1	TTACCCTTTATTCAAAGCCTTTCTATTTAGCCAACGGTCTGCATAGGCCACTAGTGGATC (645 a 606)
DE-BUD21-R1	TGTGATTGTACTATTATTTTATTATGTTGTATGCTATATAGCATAGGCCACTAGTGGATC(685 a 646)
DI-PHO13-F1	ATGACTGCTCAACAAGGTGTACCAATAAAGATAACCAATACCAGCTGAAGCTTCGTACGC (1 a 40)
DE-PHO13-F1	CTTATAGCTTGCCCTGACAAAGAATATACAACTCGGGAAACCAGCTGAAGCTTCGTACGC (-40 a -1)
DI-PHO13-R1	CTATAACTCATTATTGGTTAAGGTGTAGATGTCACCAAGTGCATAGGCCACTAGTGGATC(939 a 900)
DE-PHO13-R1	TTCAAAAAGTAATTCTACCCCTAGATTTTGCATTGCTCCTGCATAGGCCACTAGTGGATC (979 a 940)

**Nota:** <sup>1</sup>Os iniciadores F (*forward*) apresentam homologia à região a montante do gene, enquanto que os iniciadores R (*reverse*) apresentam homologia à região a jusante do gene. <sup>2</sup>As seqüências de 20 nucleotídeos sublinhados são homólogas aos plasmídeos pUG6 e pUG66 (PETRACEK, LONGTINE, 2002). <sup>3</sup>Os valores entre parênteses correspondem à posição na qual a seqüência de nucleotídeos dos oligonucleotídeos apresentam homologia ao gene, a partir do códon de início da tradução do mesmo.

estéril foi adicionado para suspender as células, e inocular as mesmas utilizando alça de Drigalsky na superfície de placas de Petri contendo o meio sólido seletivo requerido (meio suplementado com Geneticina ou Zeocina). As placas foram deixadas com a tampa aberta dentro da capela de fluxo laminar até secar a superfície do meio sólido ( $\approx 20$  min) e, em seguida, foram incubadas em estufa bacteriológica a  $28^\circ\text{C}$  por 2 a 3 dias até surgirem colônias de células na superfície do meio. As colônias que cresceram foram repicadas com auxílio de alça bacteriológica para novas placas contendo o mesmo tipo de meio utilizado anteriormente.

### 3.5 ENGENHARIA GENÔMICA EM *S. cerevisiae*

As regiões cromossômicas correspondentes aos genes de interesse, presentes no genoma das linhagens de leveduras, foram modificadas através de metodologias fundamentadas em PCR e no processo de integração no genoma por recombinação homóloga, como descrito na literatura (DEMARINI; CARLIN; LIVI, 2001; PETRACEK, LONGTINE, 2002). Essa técnica permitiu remover do genoma da levedura a sequência de nucleotídeos dos genes *BUD21* ou *PHO13*, e substituí-las por sequências de nucleotídeos que codificam um gene marcador de interesse (*KanMX* e/ou *Ble<sup>r</sup>*).

Oligonucleotídeos iniciadores (ou somente iniciadores, Tabela 3) foram desenhados de forma a conter regiões de homologia a uma região do DNA alvo no genoma da levedura (aproximadamente 40 nucleotídeos), seguido de uma sequência (aproximadamente 20 nucleotídeos) que permite amplificar o(s) gene(s) marcador(es) presentes nos plasmídeos pUG6 e pUG66 (GÜLDENER et al., 1996; GÜLDENER et al., 2002). Os iniciadores foram desenhados com o auxílio de softwares específicos (*Primer Expresse*, *PerlPimer*, *FastPrimer*) atendendo critérios recomendados para melhor performance dos mesmos, enquanto que a sequências de nucleotídeos das regiões alvo de interesse no genoma da levedura foram obtidas a partir do *Saccharomyces Genome Database* (SGD, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).

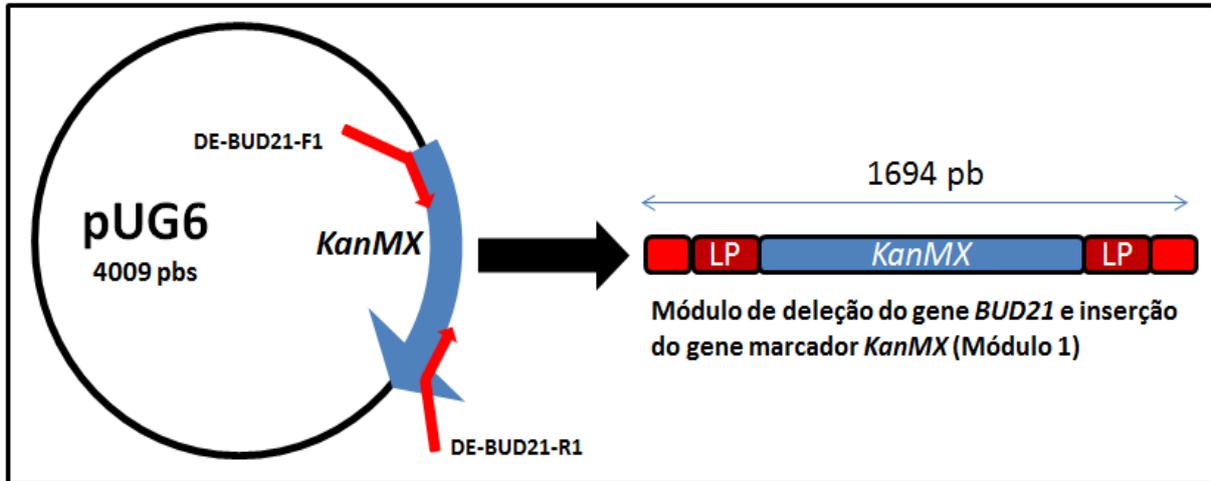
Os fragmentos lineares de DNA obtidos por PCR, denominados “módulos de deleção/substituição gênica”, apresentam o gene marcador flanqueado por sequências homólogas à região alvo (a jusante e montante do gene a ser deletado) presentes no genoma da levedura. Após a transformação das linhagens com esses módulos, os mesmos podem recombinar com o DNA cromossômico, resultando numa linhagem que expressa o marcador de seleção (*KanMX* e/ou *Ble<sup>r</sup>*) no

lugar do gene de interesse (que foi deletado). A seguir o DNA das leveduras transformadas foi extraído e utilizado para verificação por PCR se a inserção do módulo de deleção ocorreu no local correto no genoma da levedura.

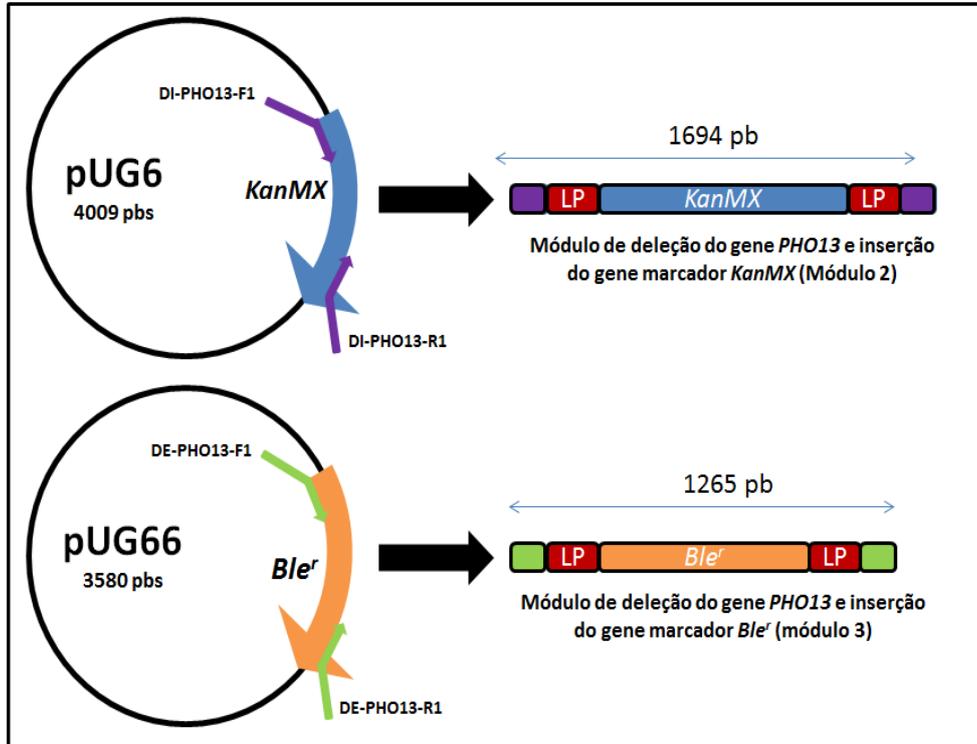
O módulo de deleção do gene *BUD21* nas linhagens de laboratório foi obtido utilizando o plasmídeo pUG6 como DNA molde e os iniciadores DE-BUD21-F1 e DE-BUD21-R1 (Tabela 3), que amplificam um fragmento de DNA linear de 1.694 pares de bases (pb) contendo o gene *KanMX* (Figura 6). A Figura 7 mostra a estratégia utilizada para produzir os módulos de deleção do gene *PHO13* nas linhagens industriais, que por serem diploides, exigem que 2 cópias do gene (um em cada cromossomo IV) sejam deletados utilizando genes marcadores distintos (*KanMX* e *Ble<sup>r</sup>*). O módulo contendo o gene *KanMX*, amplificado do plasmídeo pUG6 utilizando os iniciadores DI-PHO13-F1 e DI-PHO13-R1 (Tabela 3), possui 1.694 pb, enquanto que o módulo contendo o gene *Ble<sup>r</sup>* foi amplificado a partir do plasmídeo pUG66 utilizando os iniciadores DE-PHO13-F1 e DE-PHO13-R1 (Tabela 3), e possui 1.265 pb (Figura 7).

Confirmado a obtenção dos módulos de deleção gênica com o tamanho esperado, os produtos amplificados por PCR em 6 a 10 tubos (50 µL cada) foram concentrados em um único eppendorf através da precipitação do DNA. Ao tubo contendo os módulos de deleção adicionou-se 30 µL de solução 3 M de cloreto de sódio e 750 µL de etanol absoluto gelado (etanol 100 % a -20°C), e em seguida foi estocado em freezer -20 °C por uma noite. A seguir o tubo foi centrifugado (13.000 G, 15 min, 4 °C), o sobrenadante desprezado, e o DNA lavado com 1 mL de etanol 70% gelado (a -20 °C). Após foi realizada nova centrifugação (13.000 G, 7 min, 4°C), o sobrenadante foi desprezado e o tubo mantido em capela de fluxo laminar por 30 min para a secagem do etanol remanescente. Finalmente, o DNA precipitado dos 6 a 10 tubos de PCR foi ressuscitado em 50 µL de água deionizada estéril, e a solução contendo o módulo de deleção foi mantida a -20 °C até sua utilização para transformação das linhagens das linhagens.

Após a transformação das leveduras e seleção das células nos meios contendo Geneticina ou Zeomicina, a correta inserção dos módulos de deleção gênica no genoma das leveduras transformadas foi verificada por PCR utilizando os iniciadores descritos na Tabela 4. A relação dos tamanhos dos fragmentos esperados em função do conjunto de iniciadores utilizados, e das linhagens avaliadas, está presente na Tabela 5.



**Figura 6:** Construção do módulo de deleção do gene *BUD21* utilizando o gene marcador *KanMX*. Os iniciadores (em vermelho) possuem uma região de homologia ao plasmídeo pUG6 (flaqueando o gene marcador *KanMX*) e uma região de homologia ao genoma da levedura em regiões que flanqueiam o gene *BUD21*. Dessa forma, quando amplificado o módulo de deleção (Módulo 1), este é constituído por duas regiões externas homólogas às duas sequências alvo no genoma da levedura (em vermelho no Módulo 1), e uma região central formada pelo gene marcador *KanMX* (azul) com duas sequências *LoxP* nas suas extremidades (vermelho escuro).



**Figura 7: Construção dos módulos de deleção do gene *PHO13* utilizando os genes marcadores *KanMX* e *Ble<sup>r</sup>*.** Os iniciadores para construção do Módulo 2 (em roxo) possuem uma região de homologia ao plasmídeo pUG6 (flaqueando o gene marcador *KanMX*, azul) e uma região de homologia ao genoma da levedura na região que flanqueia o gene *PHO13* (roxo). O módulo para a deleção da segunda cópia do gene *PHO13* (Módulo 3) foi obtido utilizando iniciadores (em verde) que possuem uma região de homologia ao plasmídeo pUG66 (flaqueando o gene marcador *Ble<sup>r</sup>*, laranja), e uma região de homologia ao genoma da levedura na região interna do gene *PHO13* (os primeiros e últimos 40 nucleotídeos do gene *PHO13*, verde). Em ambos os módulos o genes marcadores são flanqueados por sequências *LoxP* nas suas extremidades (vermelho escuro).

**Tabela 4 – Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para verificar a inserção do módulo de deleção gênica no correto local no genoma da levedura transformada**

Iniciador	Sequência 5'→3'
IE-BUD21-F	GAGCAAGAAGTCATAGCCG (-337 a -319)
IE-BUD21-R	CTTCTGCTTATGAGTGGTGG (933 a 914)
IME-BUD21-F	CGAGTATGTTCAAGATCGCG (-554 a -535)
IME-BUD21-R	AATTCCTGCCGTTCTTTCCC (1105 a 1086)
IE-PHO13-F	GGAAGTAGATTGTTTCGACGC (-407 a -388)
IE-PHO13-R	TACAAGTGGACGATAAAGACG (1247 a 1227)
IME-PHO13-F	ATAAGTGGCTTGAGCTGTGG (-470 a -452)
IME-PHO13-R	ATTGGTCAACACTCTGAGCG (1321 a 1302)
VE-PHO13-F	GATACGCCGTTTCGATGCAG (421 a 439)
V-KAN <sub>r</sub> -R	GGAATCGAATGCAACCGG
V-BLE-F	CCTTCTATGAAAGGTTGGGC

**Nota:** <sup>1</sup> Os iniciadores F (*forward*) são complementares às fitas 3'→5', enquanto que os iniciadores R (*reverse*) são complementares as fitas 5'→3'. Os valores entre parênteses correspondem à posição a qual a sequência de nucleotídeos dos iniciadores apresenta homologia ao genoma da levedura, a partir do códon de início da tradução do gene.

**Tabela 5 – Combinação de iniciadores utilizados para verificar a inserção do módulo de deleção gênica no correto local no genoma da levedura transformada, e o produto de PCR esperado após eletroforese em gel de agarose**

<b>Iniciador <i>Foward</i></b>	<b>Iniciador <i>Reverse</i></b>	<b>Linhagem Avaliada</b>	<b>Tamanho do fragmento (pb)</b>
IE-BUD21-F	IE-BUD21-R	CEN.PK 113-7D <sup>a</sup>	1270
IE-BUD21-F	V-KANr-R	CEN.PK 113-7D <sup>a</sup>	--
IE-BUD21-F	IE-BUD21-R	CEN-D1 <sup>b</sup>	2318
IE-BUD21-F	V-KANr-R	CEN-D1 <sup>b</sup>	1247
IE-PHO13-F	IE-PHO13-R	MP-C5	1654
IE-PHO13-F	V-KANr-R	MP-C5	--
VE-PHO13-F	IE-PHO13-R	MP-C5	827
V-BLE-F	IE-PHO13-R	MP-C5	--
IE-PHO13-F	IE-PHO13-R	DDA-K	2409 e 1654
IE-PHO13-F	V-KANr-R	DDA-K	1318
VE-PHO13-F	IE-PHO13-R	DDA-K	827
V-BLE-F	IE-PHO13-R	DDA-K	--
IE-PHO13-F	IE-PHO13-R	DDA-B	1900 e 1654
IE-PHO13-F	V-KANr-R	DDA-B	--
VE-PHO13-F	IE-PHO13-R	DDA-B	827
V-BLE-F	IE-PHO13-R	DDA-B	965
IE-PHO13-F	IE-PHO13-R	DDA-KB	2409 e 1900
IE-PHO13-F	V-KANr-R	DDA-KB	1318
VE-PHO13-F	IE-PHO13-R	DDA-KB	--
V-BLE-F	IE-PHO13-R	DDA-KB	965

**Nota:** <sup>a</sup> Perfil de bandas idêntico para a linhagem CEN.PK 2-1C.

<sup>b</sup> Perfil de bandas idêntico para as linhagens CEN-D2, YKB-2666 e Y01854.

### 3.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

Para os ensaios de crescimento celular e de fermentação, foram calculados o fator de conversão de substrato (açúcar) a biomassa ( $Y_{Biomassa/S}$ ) e os fatores de conversão de substrato a produto ( $Y_{Produto/S}$ ). Os produtos avaliados foram os metabólitos xilitol, glicerol e etanol, sendo os seguintes fatores de conversão  $Y_{Xilitol/S}$ ,  $Y_{Glicerol/S}$  e  $Y_{Etanol/S}$ , respectivamente.

O cálculo do fator de conversão de substrato a biomassa foi feito através da razão da quantidade de biomassa produzida ( $[B]_{produzida}$ ), que corresponde à concentração máxima de biomassa celular ( $[B]_{máxima}$ ) menos a concentração de biomassa inicial ( $[B]_{inicial}$ ), com a concentração de substrato consumido ( $[S]_{consumido}$ ) no mesmo intervalo de tempo, conforme a equação 3. Os valores estão expressos em  $g_{Biomassa} (g_{Substrato})^{-1}$ .

$$Y_{Biomassa/S} = \frac{[B]_{máxima} - [B]_{inicial}}{[S]_{consumido}} \quad \text{(Equação 3)}$$

O cálculo do fator de conversão de substrato a produto (seja xilitol, glicerol ou etanol) foi realizado através da razão da concentração máxima do produto alcançada ( $[P]_{máxima}$ ) com a concentração de substrato consumido ( $[S]_{consumido}$ ) no mesmo intervalo de tempo, conforme equação geral para os três metabólitos (equação 4). Os valores estão expressos em  $g_{Produto} (g_{Substrato})^{-1}$ .

$$Y_{Produto/S} = \frac{[P]_{máxima}}{[S]_{consumido}} \quad \text{(Equação 4)}$$

Importante salientar que o parâmetro “substrato consumido”, utilizado nos cálculos dos fatores de conversão, refere-se à concentração total de açúcares consumida do meio de cultura. Assim, nos ensaios de crescimento celular e de fermentação em meios com xilose apenas, a quantidade de substrato consumido é igual a quantidade de xilose consumida. Nos ensaios de co-fermentação, a quantidade de substrato consumido é igual a quantidade conjunta de glicose/xilose ou

sacarose/xilose consumidas. Como exceção, considerando que o xilitol é produzido exclusivamente a partir da xilose (e não a partir da glicose e sacarose), o fator de conversão de substrato a xilitol para os ensaios de co-fermentação considerou a quantidade de substrato consumido como sendo a quantidade de xilose consumida (e não à soma total de açúcares consumidos, como para os demais fatores de conversão).

A produtividade em biomassa ( $P_{Biomassa}$ ) foi calculada através da razão da quantidade de biomassa produzida pelo tempo (t) necessário para obtenção desse incremento de biomassa, conforme a equação 5. Os valores foram expressos em  $g L^{-1}h^{-1}$ .

$$P_{Biomasa} = \frac{[B]_{máxima} - [B]_{inicial}}{t} \quad \text{(Equação 5)}$$

A produtividade em etanol ( $P_{Etanol}$ ) foi calculada através da razão da concentração máxima de etanol alcançada ( $[E]_{máxima}$ ) pelo tempo (t) necessário para obtenção dessa concentração de etanol, conforme a equação 6. Os valores foram expressos em  $g L^{-1}h^{-1}$ .

$$P_{Etanol} = \frac{[E]_{máximo}}{t} \quad \text{(Equação 6)}$$



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AVALIAÇÃO DA DELEÇÃO DO GENE *BUD21* NA FERMENTAÇÃO DE XILOSE

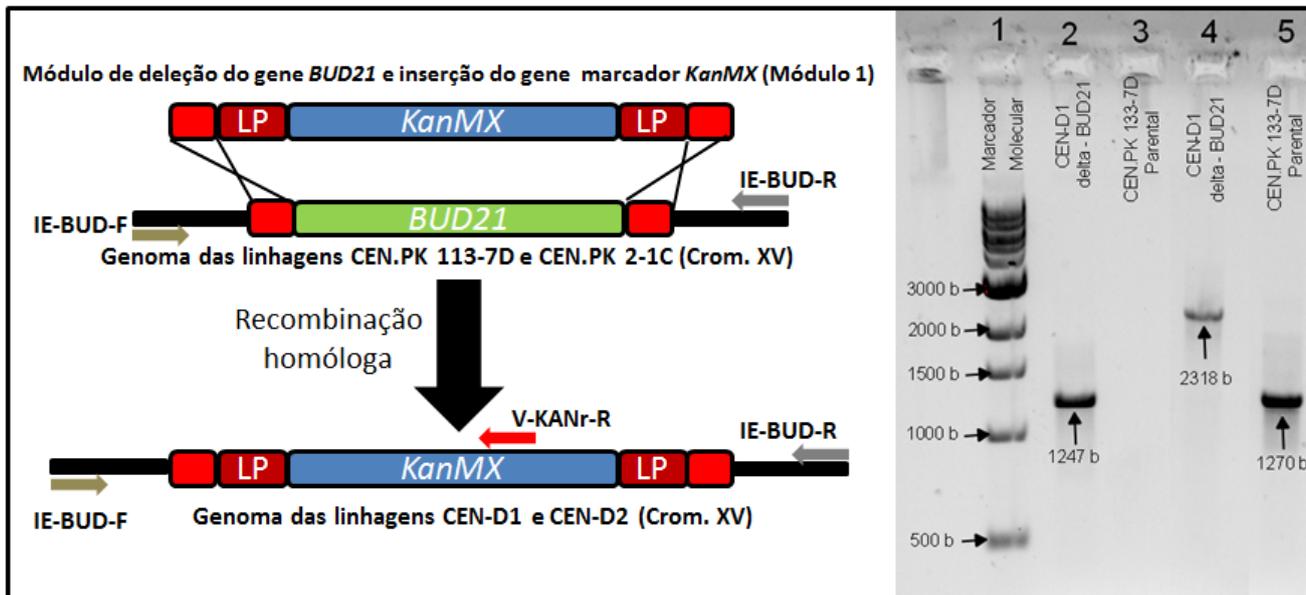
#### 4.1.1 Modificações genômicas em linhagens haploides de *S. cerevisiae*

Como abordado anteriormente, o gene *BUD21* é apontado como um supressor da via de fermentação da xilose e a sua eliminação do genoma poderia reverter o estado de inaptidão de *S. cerevisiae* em consumir/fermentar xilose (USHER et al., 2011). O presente estudo buscou avaliar os efeitos da deleção do referido gene em linhagens industriais de *S. cerevisiae*. Inicialmente, realizou-se a deleção do gene *BUD21* em linhagens de laboratório haploides, inclusive para confirmar os resultados reportados por Usher e colaboradores (2011), para depois essa tecnologia ser aplicada em linhagens industriais.

As linhagens de laboratório CEN.PK 113-7D (prototrófica) e CEN.PK 2-1C (auxotrófica) foram submetidas ao evento de transformação genômica visando deletar o gene *BUD21* do genoma de *S. cerevisiae* (presente no cromossomo XV) e inserir em seu lugar uma cópia do gene marcador *KanMX*, através dos processos de recombinação homóloga descritos anteriormente. Ambas as linhagens estudadas não apresentam genes exógenos para a metabolização da xilose e são inaptas em crescer em meios contendo exclusivamente xilose como fonte de carbono.

A estratégia de substituição do gene *BUD21* pelo gene marcador *KanMX* presente no módulo de deleção (Módulo 1) está representada na Figura 8. Os transformantes foram selecionados em placas de Petri contendo meio YPD-ágar suplementado com Geneticina, e o seu DNA foi amplificado por PCR para verificação da correta integração do Módulo 1. O gel de agarose mostrando os fragmentos obtidos está apresentado na Figura 8. O perfil previsto de tamanho dos fragmentos amplificados, considerando o par de iniciadores utilizados e a linhagem avaliada, consta na Tabela 5.

Utilizando-se os iniciadores IE-BUD21-F, IE-BUD21-R foi possível amplificar uma banda de  $\approx 1270$  pb (linha 5) compatível com a presença do gene *BUD21* no cromossomo XV das linhagens parentais (CEN.PK113-7D e CEN.PK2-1C). Nas linhagens transformadas (CEN-D1 e CEN-D2) o mesmo par de iniciadores permitiu a amplificação de



**Figura 8:** Estratégia de deleção do gene *BUD21* no cromossomo XV das linhagens CEN.PK113-7D e CEN.PK2-1C utilizando um módulo de deleção gênica (Módulo 1) com o gene marcador *KanMX*. A região em vermelho presente no Módulo 1 possui homologia com a região em vermelho presente no genoma da levedura, a jusante e montante do gene *BUD21*. Um evento de recombinação homóloga entre essas regiões em vermelho é responsável por excisar/deletar o gene *BUD21* (em verde) e inserir o gene marcador *KanMX* (em azul) com sequências *LoxP* (em vermelho escuro) no genoma da levedura, resultando nas linhagens CEN-D1 e CEN-D2, as quais possuem o cromossomo XV transformado (*bud21* $\Delta$ ::*KanMX*). No gel de agarose: linha 1 (marcador molecular 1kb Biolabs); linhas 2 e 3 (iniciadores IE-BUD21-F e V-KANr-R); linhas 4 e 5 (iniciadores IE-BUD21-F e IE-BUD21-R).

uma banda de  $\approx 2318$  pb (linha 4) compatível com a inserção do Módulo 1 no lugar do gene *BUD21*. Utilizando outro par de iniciadores, IE-BUD21-F e V-KANr-R, foi visualizada uma banda de  $\approx 1247$  pb (linha 2) referente a presença do gene *KanMX* no cromossomo XV das linhagens transformadas, enquanto que nas linhagens parentais não foi visualizada amplificação dessa banda (linha 3).

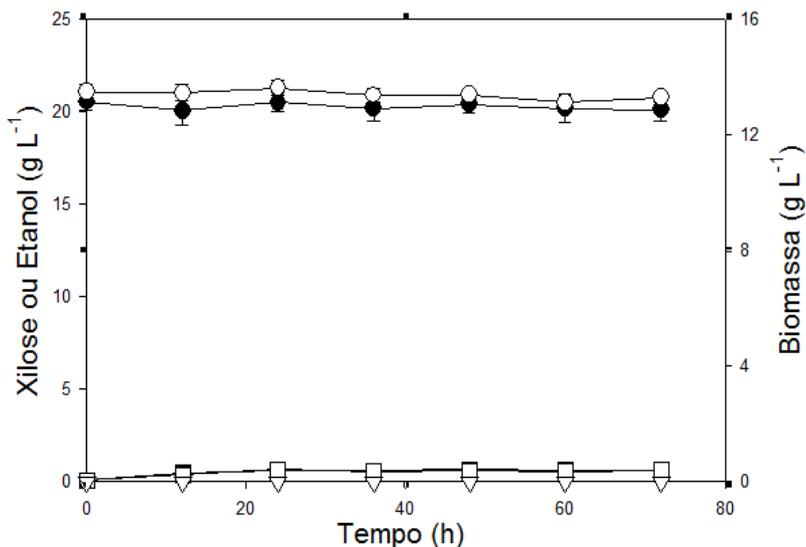
#### 4.1.2 Análise do crescimento em xilose de linhagens *bud21* $\Delta$ de *S. cerevisiae*.

Obtidos com sucesso os transformantes das linhagens CEN.PK113-7D e CEN.PK2-1C com deleção do gene *BUD21*, agora denominadas CEN-D1 e CEN-D2, respectivamente, essas linhagens foram utilizadas em ensaios de crescimento celular com xilose em frasco agitado, buscando avaliar o perfil de consumo desse açúcar, bem como o perfil de produção de biomassa celular e de etanol. As linhagens transformadas (CEN-D1 e CEN-D2) e as linhagens parentais-controle (CEN.PK113-7D e CEN.PK2-1C) foram pré-crescidas em meios YP contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Em seguida, as células foram inoculadas em quantidades iguais de biomassa em 50 mL de meio YP contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilose. As linhagens recombinantes avaliadas, assim como as linhagens parentais (controles negativos) apresentaram um modesto crescimento celular nas primeiras 24 horas de cultivo (de  $0,04 \text{ g L}^{-1}$  em 0 horas para  $\approx 0,4 \text{ g L}^{-1}$  em 24 horas), mas não ocorreu consumo de xilose ou produção de etanol mesmo após 70 h de incubação. A Figura 9 mostra os resultados obtidos com as linhagens CEN.PK113-7D e CEN-D1, sendo que as linhagens CEN.PK2-1C e CEN-D2 apresentaram comportamento idêntico (dados não mostrados).

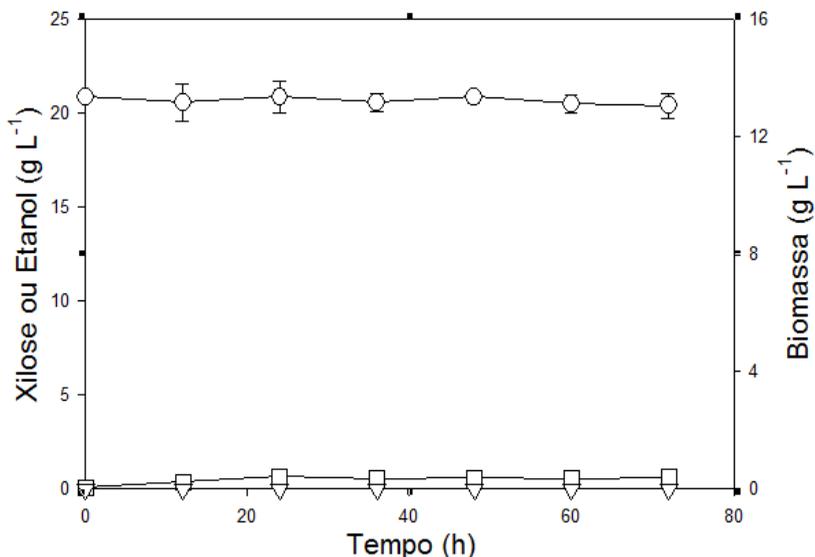
Os resultados acima contradizem os dados publicados por Usher e colaboradores (2011) que associaram o gene *BUD21* como a supressão no metabolismo da xilose. Embora o evento de transformação (deleção do gene *BUD21* e inserção do gene marcador *KanMX*) tenha sido corretamente verificado e confirmado através da metodologia de PCR (Figura 8), o fragmento de DNA obtido por PCR foi sequenciado nas duas extremidades. A análise do sequenciamento também confirmou a correta inserção do gene marcador *KanMX* no lugar cromossômico do gene *BUD21* (dados não mostrados).

Considerando a discrepância com os resultados publicados por Usher e colaboradores (2011), foi solicitado ao grupo de pesquisa canadense o envio da linhagem com a deleção do gene *BUD21* analisada por eles (linhagem YKB2666), a qual foi relatada como sendo apta em consumir xilose. No mesmo sentido, um grupo de pesquisa da

Universidad Nacional de Córdoba (Argentina) cedeu gentilmente a linhagem Y01854 com o gene *BUD21* deletado, linhagem que faz parte da coleção de linhagens deletadas nos genes não-essenciais de *S. cerevisiae* (EUROSCARF). Nossos resultados mostram que linhagem YKB2666 quando cultivada em frascos contendo xilose (Figura 10), foi incapaz de consumir ou crescer utilizando esse açúcar como fonte de carbono. Resultados semelhantes (ausência de consumo de xilose) foram obtidos com a linhagem Y01854 *bud21* $\Delta$  (Figura 11).

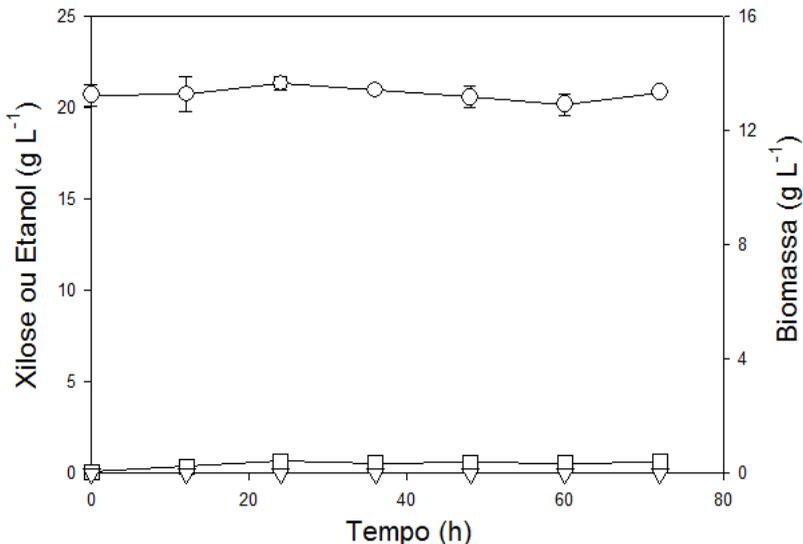


**Figura 9: Crescimento das linhagens CEN.PK113-7D e CEN-D1 em meio contendo 20 g L<sup>-1</sup> de xilose como fonte única de carbono.** Os cultivos das linhagens CEN.PK113-7D (símbolos pretos) e CEN-D1 (símbolos brancos) foram realizados em batelada simples em condições aeróbias. A concentração de xilose (círculos) e etanol (triângulo invertido), bem como a quantidade de biomassa celular (quadrados) foram determinadas ao longo do tempo.



**Figura 10: Crescimento da linhagem YKB2666 *bud21*Δ em meio contendo 20 g L<sup>-1</sup> de xilose como fonte única de carbono.** O cultivo da linhagem foi realizado em batelada simples em condições aeróbias. A concentração de xilose (círculos) e etanol (triângulo invertido), bem como a quantidade de biomassa celular (quadrados) foram determinadas ao longo do tempo.

Portanto, nossos resultados (obtidos com 4 linhagens *bud21*Δ, inclusive de *backgrounds* genéticos distintos) indicam que o gene *BUD21* não é um supressor da fermentação de xilose na levedura *S. cerevisiae*. De fato, na literatura, apenas o trabalho de Usher e colaboradores (2011) indicam esse fato. O referido trabalho relaciona ainda os genes *ALP1* (transportador de arginina), *ISC1* (Inositol Fosfolipase mitocondrial) e *RPL20B* (componente da subunidade ribossomal 60S) como prováveis supressores da utilização da xilose. Naquele trabalho, a deleção singular de cada gene foi capaz de melhorar a utilização da xilose, embora em níveis inferiores ao alcançado pela deleção do *BUD21*.



**Figura 11: Crescimento da linhagem Y01854 *bud21Δ* em meio contendo 20 g L<sup>-1</sup> de xilose como fonte única de carbono.** O cultivo da linhagem foi realizado em batelada simples em condições aeróbias. A concentração de xilose (círculos) e etanol (triângulo invertido), bem como a quantidade de biomassa celular (quadrados) foram determinadas ao longo do tempo.

Em linhagens recombinantes que expressam genes heterólogos para o metabolismo da xilose (*SsXYL1* e *SsXYL2*, por exemplo), as quais são capazes de consumir/utilizar esse açúcar (ainda que não com completa eficiência), o efeito da deleção do gene *BUD21* não foi avaliado. Já em linhagem de *S. cerevisiae* consumidora de xilose, e que expressam os genes *XYLA* e *XKS1*, a deleção do gene *BUD21* teve um forte efeito deletério, onde o consumo da xilose e o crescimento celular foram inibidos após poucas horas (USHER et al., 2011).

O insucesso nessa etapa de corroborar os resultados previamente publicados por Usher e colaboradores (2011) resultou no cancelamento da segunda etapa da presente pesquisa, na qual seria feita a deleção do gene *BUD21* em linhagens industriais diploides. No entanto, outros genes (*PHO13*, *TAL1*, *ALD6*) têm sido apontados como prováveis moduladores da via metabólica da xilose (WALFRIDSSON et al., 1995; NI, LAPLAZA, JEFFRIES, 2007; KIM et al., 2013). Os efeitos desses genes moduladores têm sido avaliados apenas em

linhagens recombinantes consumidoras de xilose, as quais expressam genes heterólogos. Assim, o gene *PHO13* passou a ser o principal objeto de estudo desse trabalho. No capítulo seguinte, os efeitos da deleção do gene *PHO13* em linhagem industrial de *S. cerevisiae* serão detalhados.

## 4.2 AVALIAÇÃO DA DELEÇÃO DO GENE *PHO13* NA FERMENTAÇÃO DE XILOSE

### 4.2.1 Modificações genômicas em linhagem industrial de *S. cerevisiae*

Ni, Laplaza e Jeffries (2007) demonstraram um provável efeito supressor do gene *PHO13* na metabolização da xilose em linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes que expressam as enzimas *SsXR*, *SsXDH* e *ScXK*. As linhagens recombinantes foram capazes de consumir e fermentar a xilose produzindo quantidades significativas de etanol. No entanto, quando o gene *PHO13* foi deletado, o efeito inibitório gerado pela sobre-expressão do gene endógeno *ScXKS1*, verificado por esses autores, foi significativamente diminuído. Assim, a linhagem *pho13Δ* foi capaz de crescer melhor e atingir rendimentos maiores de etanol. Outros estudos investigaram os efeitos da deleção do gene supressor *PHO13* em *S. cerevisiae* (VAN VLEET, JEFFRIES, OLSSON, 2008; FUJITOMI et al., 2012; KIM et al., 2013), alcançando resultados promissores e que seguem a mesma linha dos resultados obtidos por Ni, Laplaza e Jeffries (2007). Fujitomi e colaboradores (2012) relataram ainda ganhos benéficos (maior consumo de xilose e produção de etanol) decorrentes da deleção do gene *PHO13* em cultivos contendo os inibidores da fermentação, como o ácido acético, o ácido fórmico e o furfural (compostos produzidos e liberados durante as etapas de pré-tratamento).

A linhagem selecionada para o presente trabalho foi a MP-C5 (GONÇALVES, 2014), linhagem isogênica à linhagem industrial CAT-1 mas que possui o plasmídeo pAUR-XKXDHXR integrado em seu genoma, contendo os genes *SsXYL1*, *SsXYL2* e *ScXKS1* sobre controle do promotor constitutivo *PGK* (gene da Fosfoglicerato Quinase), e assim expressa as enzimas XR e XDH (de *S. stipitis*) e sobre-expressa a enzima endógena XK, sendo, portanto, capaz de metabolizar a xilose. Como relatado anteriormente, a CAT-1 é uma das linhagem industriais utilizadas para a fermentação de açúcares e produção de bioetanol mais bem consolidadas na indústria sucro-alcooleira nacional (BASSO et al., 2008).

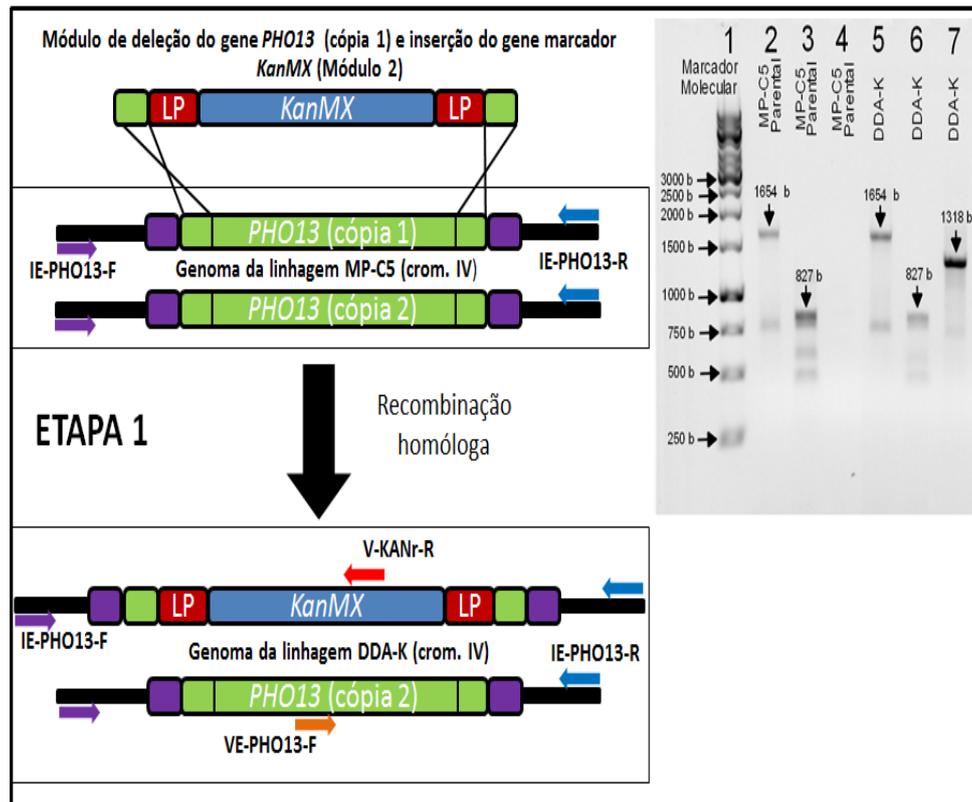
A levedura industrial MP-C5 foi submetida ao evento de transformação genômica visando à deleção do gene *PHO13*. Por se tratar de uma linhagem com um genoma diploide, essa cepa possui duas cópias do gene *PHO13* em seu genoma e foi necessária uma estratégia que garantisse a deleção conjunta de ambas as cópias. Assim, a deleção do gene *PHO13* foi realizada em duas etapas através da substituição de cada cópia (de ambos os cromossomo IV) por um gene marcador diferente, através dos processos de recombinação homóloga descritos previamente. Para a deleção da primeira cópia do gene *PHO13* foi utilizado um módulo de deleção (Módulo 2) contendo o gene marcador *KanMX*. Para a deleção da segunda cópia do gene *PHO13* foi utilizado outro módulo de deleção (Módulo 3) contendo o gene marcador *Ble<sup>r</sup>*. As estratégias de substituição do gene *PHO13* pelos genes marcadores *KanMX* no primeiro cromossomo IV, e *Ble<sup>r</sup>* no segundo cromossomo IV, estão representadas nas Figuras 12 e 13, respectivamente. Os transformantes foram selecionados em placas de Petri contendo meio YPD-ágar suplementado com Geneticina e/ou Zeocina, e o seu DNA foi amplificado por PCR para verificação da correta integração dos Módulos 2 e 3.

A estratégia mais lógica para a deleção das duas cópias do gene *PHO13* seria utilizar o Módulo 3 primeiro (etapa 2) e depois o Módulo 2 (etapa 1). Isso porque o Módulo 3 poderia, no segundo evento de transformação, deletar o Módulo 2 ao invés da segunda cópia do gene *PHO13*, mas o inverso não seria possível. Na primeira tentativa de transformação, utilizaram-se ambos os módulos (2 e 3), separadamente, para transformar a levedura MP-C5 e produzir as linhagens DDA-K e DDA-B, respectivamente. A linhagem DDA-K foi obtida com sucesso mas não foram obtidos transformantes DDA-B. Assim, no segundo evento de transformação, utilizou-se o Módulo 3 para transformar as linhagens MP-C5 e DDA-K e produzir as linhagens DDA-B e DDA-KB, respectivamente. Foram obtidos onze supostos transformantes DDA-KB, sendo que 9 deles tiveram o Módulo 2 deletado e permaneceram com a segunda cópia do gene *PHO13*, sendo inúteis para o presente trabalho. Os outros dois transformantes tiveram ambas as cópias do gene *PHO13* deletadas e os módulos 2 e 3 corretamente inseridos, conforme o gel de agarose apresentando na Figura 13. Uma vez já obtida a linhagem DDA-KB, não foi necessária nova transformação da linhagem DDA-B com o Módulo 2 para obtenção de nova linhagem DDA-KB.

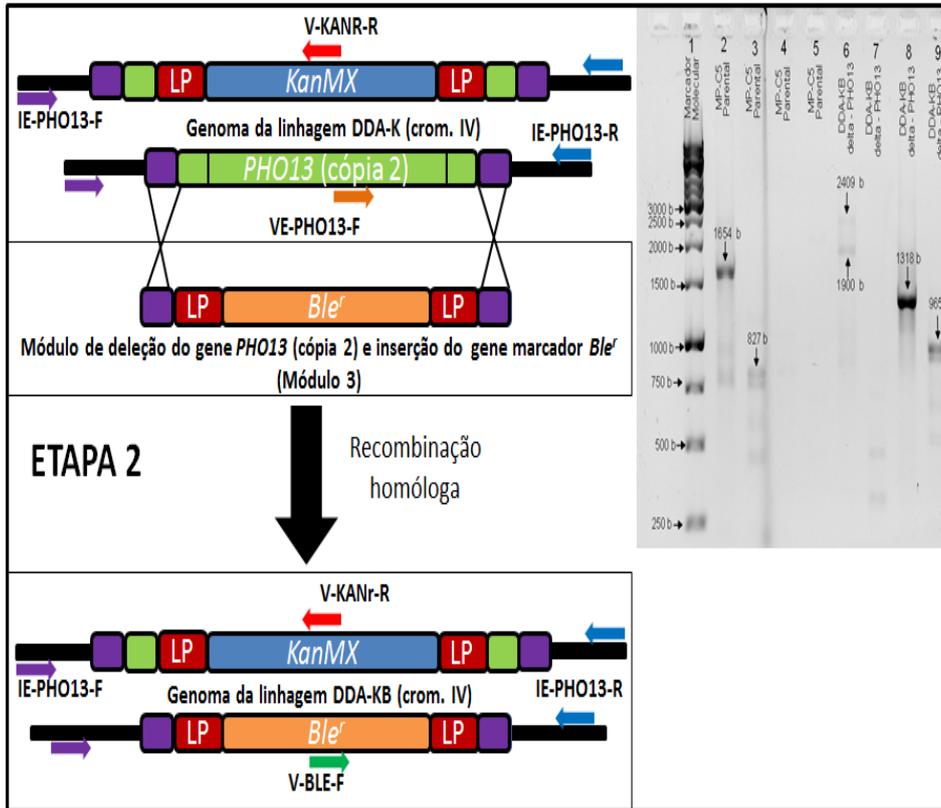
O gel de agarose de confirmação da inserção do Módulo 2 no genoma da linhagem MP-C5, produzindo a linhagem DDA-K1, consta

na Figura 12. Utilizando-se os iniciadores IE-PHO13-F e IE-PHO13-R foi possível amplificar uma banda de  $\approx 1654$  pb (linhas 2 e 5) compatível com a presença do gene *PHO13* no cromossomo IV das linhagens parental (MP-C5) e transformada (DDA-K1). Embora a linhagem DDA-K1 tenha tido uma cópia do gene *PHO13* deletada, a outra cópia permanece intacta no genoma resultando na banda supracitada. Uma banda adicional de  $\approx 2409$  pb (compatível com a inserção do Módulo 2 no lugar do gene *PHO13*) também era esperada para a linhagem transformada (linha 5), porém o fragmento de 1654 pb, por ser significativamente menor, pode ter sido preferencialmente amplificado. Utilizando outro par de iniciadores, VE-PHO13-F e IE-PHO13-R, foi visualizada uma banda de  $\approx 827$  pb (linhas 3 e 6) referente a presença do gene *PHO13* no cromossomo IV das linhagens parental e transformada. Já na presença dos iniciadores IE-PHO13-F e V-KANr-R foi possível visualizar uma banda de  $\approx 1318$  pb (linha 7) referente a presença do gene *KanMX* no cromossomo IV da linhagem transformada, enquanto que na linhagem parental não foi visualizada amplificação de bandas (linha 4).

O gel de agarose de confirmação da inserção do Módulo 3 no genoma da linhagem DDA-K1, produzindo a linhagem DDA-KB, consta na Figura 13. Utilizando-se os iniciadores IE-PHO13-F e IE-PHO13-R foi possível amplificar uma banda de  $\approx 1654$  pb (linhas 2) compatível com a presença do gene *PHO13* no cromossomo IV da linhagem parental (MP-C5). Na linhagem transformada (DDA-KB) o mesmo par de iniciadores permitiu a amplificação de duas bandas com  $\approx 2409$  pb e  $\approx 1900$  pb (linha 6) compatíveis com as inserções dos Módulos 2 e 3, respectivamente. Nota-se que a ausência da banda de  $\approx 1654$  pb indica sucesso na deleção dupla o gene *PHO13*. Utilizando outro par de iniciadores, VE-PHO13-F e IE-PHO13-R, foi visualizada uma banda de  $\approx 827$  pb (linhas 3) referente a presença do gene *PHO13* no cromossomo IV da linhagem parental, enquanto que na linhagem DDA-KB não foi visualizada amplificação dessa banda (linha 7). Já na presença dos pares de iniciadores IE-PHO13-F com V-KANr-R e V-BLE-F com IE-PHO13-R foi possível visualizar, para a linhagem transformada, as banda de  $\approx 1318$  pb (linha 8) e  $\approx 965$  pb (linha 9) referentes a presença dos genes *KanMX* e *Ble<sup>r</sup>* no cromossomo IV, respectivamente. Para a linhagem parental não foi visualizada amplificação dessas bandas (linha 4 e 5).



**Figura 12: Estratégia de deleção da primeira cópia do gene *PHO13* na linhagem diploide MP-C5.** Foi utilizado um módulo de deleção gênica (Módulo 2) com o gene marcador *KanMX*. As regiões representadas em verde presentes no módulo 2 possuem homologia com a regiões inicial e final do gene *PHO13* presentes no genoma da levedura de interesse (MP-C5). Um evento de recombinação homóloga entre essas regiões em verde é responsável por excisar/deletar o gene *PHO13* (em verde) e inserir o gene marcador *KanMX* (em azul) com sequências *LoxP* (em vermelho) no genoma da levedura, resultando na linhagem DDA-K a qual possui um cromossomo IV íntegro (com a segunda cópia do gene *PHO13*) e um cromossomo IV alterado (*pho13Δ::KanMX*). No gel de agarose: linha 1 (marcador molecular 1kb Fermentas); linhas 2 e 5 (iniciadores IE-PHO13-F e IE-PHO13-R); linhas 3 e 6 (iniciadores VE-PHO13-F e IE-PHO13-R); linhas 4 e 7 (iniciadores IE-PHO13-F e V-KANr-R).



**Figura 13: Estratégia de deleção da segunda cópia do gene *PHO13* na linhagem DDA-K.** Foi utilizado um módulo de deleção gênica (Módulo 3) com o gene marcador *Ble<sup>r</sup>*. As regiões em roxo presentes no Módulo 3 possuem homologia com as regiões em roxo a jusante e montante do gene *PHO13* presentes no genoma da levedura DDA-K (*pho13Δ::KanMX / PHO13*), originada a partir da linhagem MP-C5. Um evento de recombinação homóloga entre ambas as regiões em roxo é responsável por excisar/deletar a segunda cópia do gene *PHO13* (em verde) e inserir o gene marcador *Ble<sup>r</sup>* (em laranja) com sequências *LoxP* (em vermelho) no genoma da levedura, resultando na linhagem DDA-KB a qual possui os dois cromossomos IV transformados (*pho13Δ::KanMX / pho13Δ::Ble<sup>r</sup>*). No gel de agarose: linha 1 (marcador molecular 1kb Fermentas); linhas 2 e 6 (iniciadores IE-PHO13-F e IE-PHO13-R); linhas 3 e 7 (iniciadores VE-PHO13-F e IE-PHO13-R); linhas 4 e 8 (iniciadores IE-PHO13-F e V-KANr-R); linhas 5 e 9 (iniciadores V-BLE-F e IE-PHO13-R).

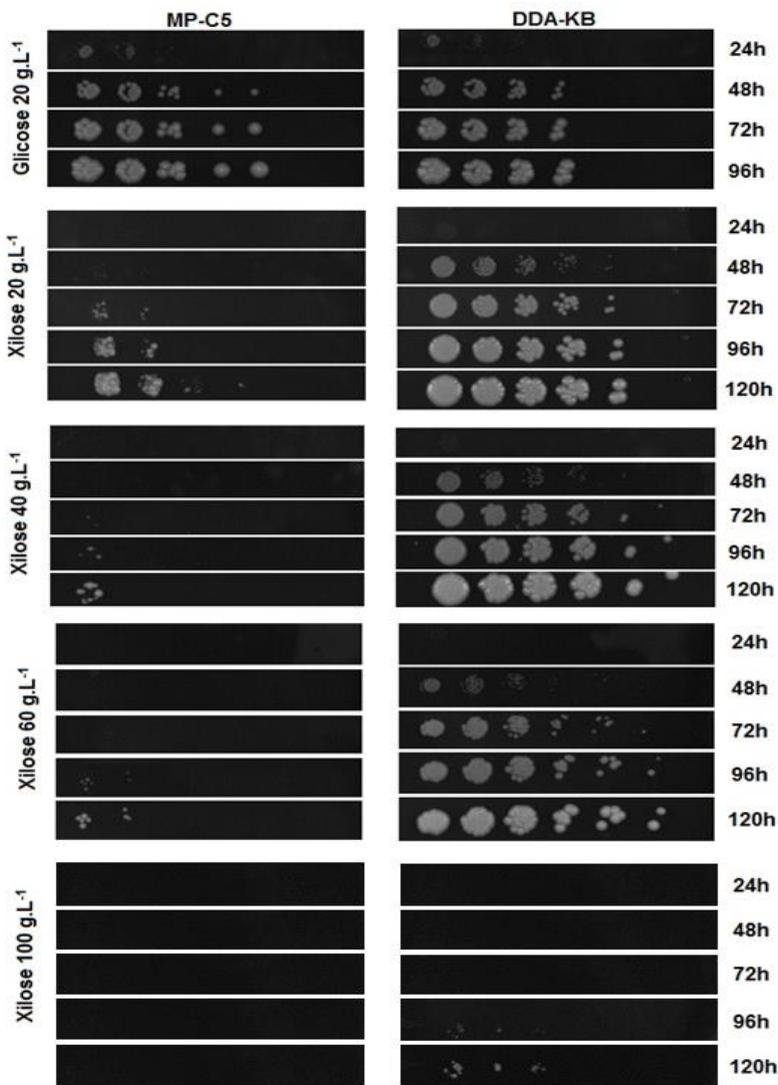
#### 4.2.2 Análise de crescimento e fermentação de xilose por linhagem industrial recombinante *pho13Δ*.

Em um primeiro momento, buscou-se avaliar a potencial melhora no crescimento da levedura recombinante com deleção do gene *PHO13* (linhagem DDA-KB) em meios sólidos contendo xilose ou glicose como fonte de carbono. O crescimento celular em placas de Petri contendo 20 g L<sup>-1</sup> de glicose como fonte única de carbono não apresentou diferenças aparentes de crescimento entre as linhagens avaliadas (MP-C5 e DDA-KB), conforme mostra a Figura 14 (homogeneidade de número e tamanho de colônias). Isso segue a mesma linha dos resultados obtidos por Van Vleet, Jeffries e Olsson (2008) que reportaram que a deleção do gene *PHO13* não trouxe impactos significativos na metabolização da glicose, quando as linhagens foram cultivadas em bateladas aeróbias.

Em outro aspecto, Van Vleet, Jeffries e Olsson (2008) relataram a existência de uma inibição no consumo/crescimento em xilose quando as células estão submetidas a concentrações mais elevadas desse açúcar. Kim e colaboradores (2013) reportaram que a velocidade específica de crescimento celular aumenta quando a concentração inicial de xilose varia de 1 a 10 g L<sup>-1</sup>. A partir de 20 g L<sup>-1</sup>, contudo, a velocidade específica de crescimento decresce drasticamente à medida que aumenta a concentração inicial de xilose. O efeito tóxico decorrente das altas concentrações iniciais de xilose ocasiona uma longa fase *lag* no processo de fermentação, e precisaria ser superado para tornar o processo economicamente viável.

Em um estudo utilizando engenharia evolutiva, a pressão de seleção foi a persistência de crescimento celular em alta concentração de xilose (40 g L<sup>-1</sup>), obtive-se clones capazes de crescer mais rapidamente nessas condições (KIM et al., 2013). Uma análise de sequenciamento genético, comparando as linhagens parental e evoluídas, identificou mutações no gene *PHO13*, as quais foram benéficas para transpor o efeito inibitório causado pela alta concentração de xilose (KIM et al., 2013).

No presente estudo, quando analisadas as placas de crescimento celular com diferentes concentrações de xilose, fica evidente a ocorrência de inibição à medida que a concentração de açúcar se eleva. Em meio contendo 100 g L<sup>-1</sup> de xilose, a linhagem MP-C5 foi incapaz de crescer, e mesmo a linhagem DDA-KB apresentou poucas colônias somente após 120 h de crescimento (Figura 14).

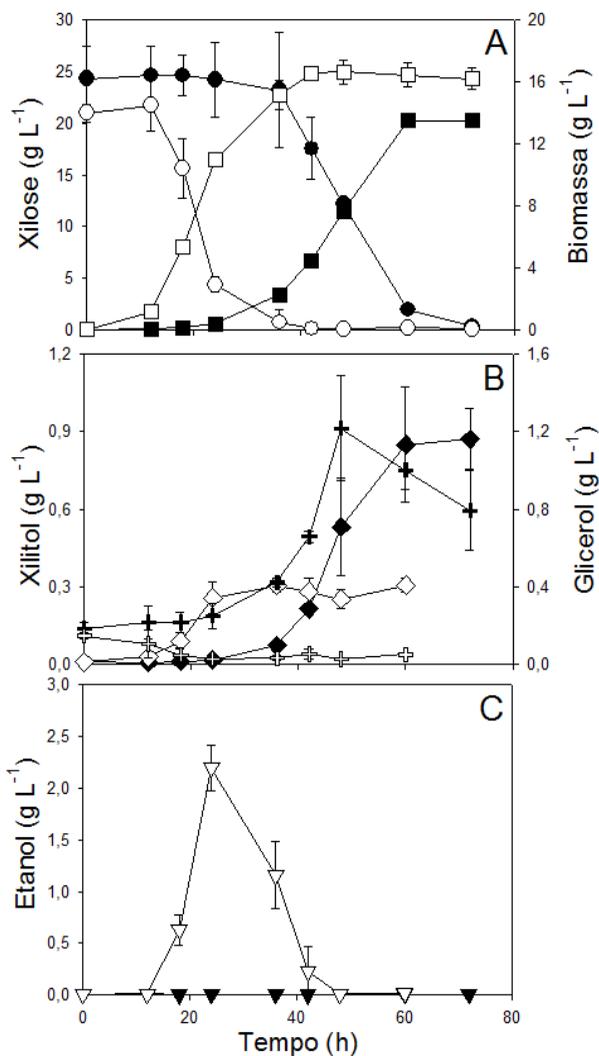


**Figura 14:** Crescimento das linhagens MP-C5 e DDA-KB em placas contendo glicose ou xilose. Diluições seriadas das linhagens com fator de 5 vezes (a partir de uma  $Abs_{600}$  inicial de 0,5) foram incubadas em placas de Petri contendo meio YP suplementado com 20 g L<sup>-1</sup> glicose ou 20-100 g L<sup>-1</sup> xilose, sendo que as imagens foram obtidas nos tempos indicados à direita da figura.

Comparando as linhagem MP-C5 e DDA-KB, percebe-se que crescimento celular foi profundamente alterado em função da deleção do gene *PHO13* e, que o efeito inibitório, embora ainda presente, vai sendo gradualmente revertido (Figura 14). Na placa com 20 g L<sup>-1</sup> de xilose, a linhagem MP-C5 apresentou algumas colônias somente após 72 horas, enquanto que a linhagem DDA-KB com 48 horas já demonstrava um crescimento bastante intenso, com grande número de colônias (Figura 14). Para a placa contendo 40 e 60 g L<sup>-1</sup> de xilose, as primeiras colônias da linhagem MP-C5 aparecem apenas com 96 horas. No entanto, com apenas 48 horas, a linhagem DDA-KB novamente apresenta um crescimento bastante expressivo. Esses resultados são comparáveis aos obtidos por Shen e colaboradores (2012) em que duas linhagens de laboratório com *backgrounds* distintos (uma expressando as enzimas XR, XDH e XK e a outra as enzimas XI e XK), crescidas em placas contendo meio mínimo e 20 g L<sup>-1</sup> de xilose, foram capazes de crescer melhor quando o gene *PHO13* foi deletado.

A deleção do gene *PHO13* permitiu um crescimento mais acentuado da linhagem transformada em condições de concentração de xilose moderadas, bem como reverter parcialmente o efeito inibitório de crescimento quando em condições de concentração elevada de xilose. O sucesso dessa etapa em corroborar resultados que apontavam para os efeitos positivos da deleção do gene *PHO13* possibilitou a continuidade dos estudos. Na sequência, serão apresentados e discutidos os resultados para os crescimentos celulares em frascos agitados e para os ensaios de fermentação em condições microaeróbias.

Os experimentos de crescimento celular em frascos agitados buscaram avaliar o perfil de consumo da xilose, bem como de produção de biomassa celular e de metabólitos (xilitol, glicerol e etanol). Sobre a produção de biomassa, a linhagem transformada DDA-KB apresentou um crescimento mais acelerado quando comparada com a linhagem parental MP-C5 (Figura 15). Nos ensaios de crescimento celular em frascos contendo 20 g L<sup>-1</sup> de xilose, a linhagem transformada levou ≈ 12 horas para entrar na fase exponencial e ≈ 42 horas para atingir a máxima concentração celular. A linhagem MP-C5 demorou ≈ 36 horas para entrar na fase exponencial e ≈ 60 horas para atingir o máximo de crescimento celular, conforme mostrado na Figura 15. Já para os ensaios de crescimento celular em frascos contendo 100 g L<sup>-1</sup> de xilose, a linhagem DDA-KB demorou ≈ 24 horas para entrar na fase exponencial e ≈ 72 horas para atingir a máxima concentração celular. A linhagem MP-C5, em 108 horas de crescimento, não entrou na fase exponencial, apresentando apenas um crescimento basal (Figura 16).

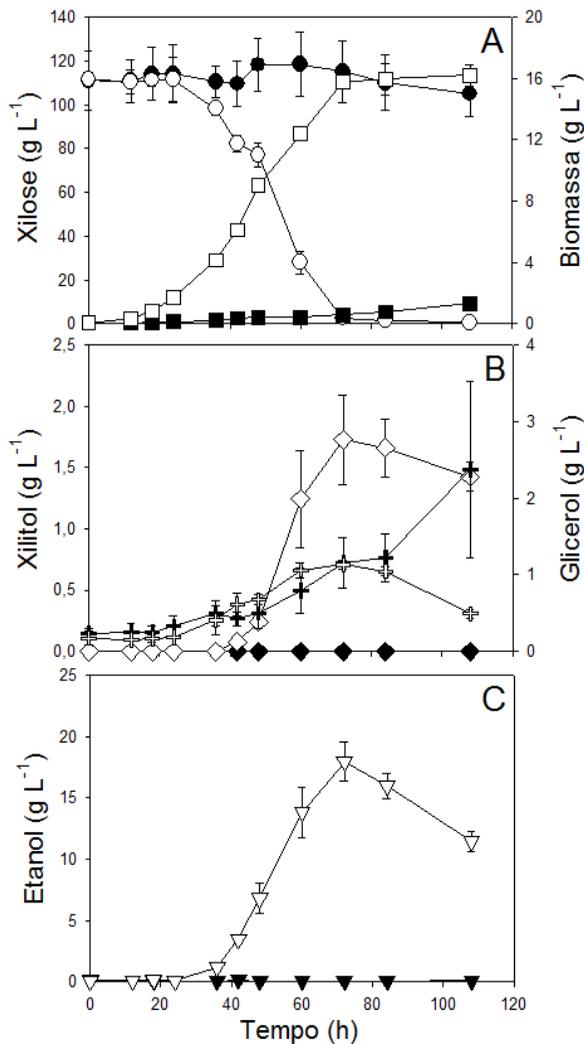


**Figura 15:** Crescimento das linhagens MP-C5 e DDA-KB em meio contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilose como fonte única de carbono. Os cultivos das linhagens MP-C5 (símbolos pretos) e DDA-KB (símbolos brancos) foram realizados em batelada simples. (A) A concentração de xilose (círculos) e quantidade de biomassa celular (quadrados), (B) produção de xilitol (losangos) e glicerol (cruzes), e (C) produção de etanol (triângulo invertido) foram determinadas ao longo do tempo.

O consumo da xilose, como previsto, acompanhou a tendência de crescimento celular observada. A linhagem transformada consumiu xilose mais rapidamente que a linhagem parental. Quando crescidas em meios contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilose, em  $\approx 36$  horas a linhagem DDA-KB consumiu todo o açúcar presente no meio, enquanto que a linhagem MP-C5 demorou  $\approx 60$  horas. Já quando crescidas em meios contendo  $100 \text{ g L}^{-1}$  de xilose, a linhagem DDA-KB levou  $\approx 72$  horas para consumir todo esse açúcar presente. A linhagem MP-C5, mesmo após 108 horas de crescimento, consumiu apenas um pequeno percentual de xilose.

Quando analisado o perfil de produção dos metabólitos (xilitol, glicerol etanol), houve também notável diferença entre os grupos. Nos ensaios com meios contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilose, a linhagem parental produziu  $\approx 0,9 \text{ g L}^{-1}$  de xilitol e  $1,2 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol contra  $0,3 \text{ g L}^{-1}$  de xilitol e resquícios de glicerol produzidos pela linhagem transformada. Em relação ao etanol, a linhagem DDA-KB teve uma produção de  $\approx 2,2 \text{ g L}^{-1}$  enquanto que a linhagem MP-C5 não produziu etanol (Figura 16). Nos ensaios com meios contendo  $100 \text{ g L}^{-1}$  de xilose houve forte inibição de crescimento celular e de consumo de xilose na linhagem parental. Essa linhagem teve produção apenas de glicerol ( $\approx 2,4 \text{ g L}^{-1}$ ) não sendo detectada produção de xilitol e etanol. Já a linhagem transformada, que conseguiu reverter parcialmente esse efeito inibitório, teve uma produção aproximada de  $1,7 \text{ g L}^{-1}$  de xilitol, de  $1,1 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol e de  $18 \text{ g L}^{-1}$  de etanol (Figura 16).

Para os ensaios de crescimento celular, os parâmetros fermentativos ou fisiológicos (valores de produtividade em biomassa, produtividade em etanol, fator de conversão de substrato a xilitol, fator de conversão de substrato a glicerol, fator de conversão de substrato a etanol e fator de conversão de substrato a biomassa) estão apresentados na Tabela 6. Nos ensaios com meios contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilose, a produtividade em biomassa foi maior na linhagem *PHO13Δ* quando comparada com a linhagem parental. Além disso, a produtividade em etanol e a fator de conversão de substrato em etanol foram iguais a zero na linhagem MP-C5 enquanto que na linhagem transformada foram  $P_{\text{Etanol}} = 0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e  $Y_{\text{Etanol/s}} = 0,11 \text{ g}_{\text{Etanol}} (\text{g}_{\text{substrato}})^{-1}$ . Contudo, os fatores de conversão de substrato a xilitol e a glicerol foram maiores na



**Figura 16:** Crescimento das linhagens MP-C5 e DDA-KB em meio contendo  $100 \text{ g L}^{-1}$  de xilose como fonte única de carbono. Os cultivos das linhagens MP-C5 (símbolos pretos) e DDA-KB (símbolos brancos) foram realizados em batelada simples. (A) A concentração de xilose (círculos) e quantidade de biomassa celular (quadrados), (B) produção de xilitol (losangos) e glicerol (cruzes), e (C) produção de etanol (triângulo invertido) foram determinadas ao longo do tempo.

**Tabela 6 – Parâmetros fisiológicos das linhagens MP-C5 e DDA-KB em crescimentos em frascos agitados com meios contendo xilose**

<b>Concentração de xilose e Linhagem</b>	<b><math>P_{Biomassa}</math></b>	<b><math>P_{Etanol}</math></b>	<b><math>Y_{Xilitol/s}</math></b>	<b><math>Y_{Glicerol/s}</math></b>	<b><math>Y_{Etanol/s}</math></b>	<b><math>Y_{Biomassa/s}</math></b>
20 g L <sup>-1</sup> xilose:						
MP-C5	0,225	0	0,04±0,01	0,11±0,04	0	
DDA-KB	0,41±0,02	0,02±0,001	0,01±0,001	0	0,11±0,01	
100 g L <sup>-1</sup> xilose:						
MP-C5	0,01±0,003	0	0	0,30±0,16	0	0,15±0,06
DDA-KB	0,22±0,005	0,25±0,02	0,02±0,003	0,01±0,001	0,16±0,01	0,14±0,003

**Nota:** <sup>1</sup> Os valores de produtividade estão expresso em g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. <sup>2</sup> Os valores dos fatores de conversão de substrato em produto ou em biomassa estão expresso em  $g_{Produto} (g_{Substrato})^{-1}$  e  $g_{Biomassa} (g_{Substrato})^{-1}$ , respectivamente.

linhagem parental. Nos ensaios com meios contendo  $100 \text{ g L}^{-1}$  de xilose, a linhagem DDA-KB sobressaiu em relação à MP-C5 (que teve o crescimento fortemente inibido). A linhagem transformada apresentou produtividade em biomassa e produtividade em etanol maior quando comparada a linhagem parental. Além disso, a fator de conversão de substrato a etanol da linhagem DDA-KB foi de  $0,16 \text{ g}_{\text{Etanol}} (\text{g}_{\text{Substrato}})^{-1}$  enquanto que na linhagem MP-C5 foi igual a zero (Tabela 6).

Estudos de crescimento celular em condições aeróbias em meios contendo  $6,7 \text{ g L}^{-1}$  (SHEN et al., 2012) ou  $20 \text{ g L}^{-1}$  (VAN VLEET, JEFRIES, OLSSON, 2012) de xilose reportaram uma marcante diferença entre as linhagens com e sem deleção do gene *PHO13* (expressando os genes *XYL1*, *XYL2* e *XYL3* (ou *XKS1*) de *S. stipitis*). Nesses estudos, as linhagens *pho13Δ* tiveram maiores fatores de crescimento específico e de consumo da xilose. No entanto, a produção de glicerol e xilitol foi menor na linhagem *pho13Δ*, resultados esses que se assemelham aos encontrados no presente trabalho. Além disso, a linhagem DDA-KB (presente estudo) e a linhagem *pho13Δ* (SHEN et al., 2012) foram capazes de produzir etanol. Da mesma forma, Fujitomi e colaboradores (2012) relatam que uma linhagem *pho13Δ* (expressando os genes *XYL1* e *XYL2* de *S. stipitis* e *XKS1* de *S. cerevisiae*) quando crescida em condições aeróbias (meios com  $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilose) apresentou uma redução de  $\approx 50 \text{ h}$  em sua fase *lag* quando comparada com a linhagem parental (fase *lag* de  $\approx 60 \text{ h}$ ). No entanto, a literatura não apresenta resultados de crescimentos celulares em bateladas aeróbias com meios contendo altas concentrações de xilose e, justamente nessas condições experimentais é que foram encontradas as diferenças mais acentuadas entre as linhagens aqui estudadas.

Os experimentos de fermentação tiveram o propósito de avaliar o perfil de consumo da xilose, de produção de biomassa celular e de metabólitos (xilitol, glicerol e etanol) em condições microaeróbias de cultivo. Em relação à concentração de biomassa celular, a linhagem DDA-KB atingiu valores de  $6,11 \text{ g L}^{-1}$  e  $8,97 \text{ g L}^{-1}$  enquanto que a linhagem MP-C5 alcançou valores de  $7,10 \text{ g L}^{-1}$  e  $5,33 \text{ g L}^{-1}$ , quando cultivadas em meios contendo 20 e  $100 \text{ g L}^{-1}$  de xilose, respectivamente (Figuras 17 e 18). Assim, a linhagem parental cresceu melhor em meios contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilose, mas quando cultivada em meios com alta concentração de açúcar, a sua produção de biomassa celular foi bastante reduzida.

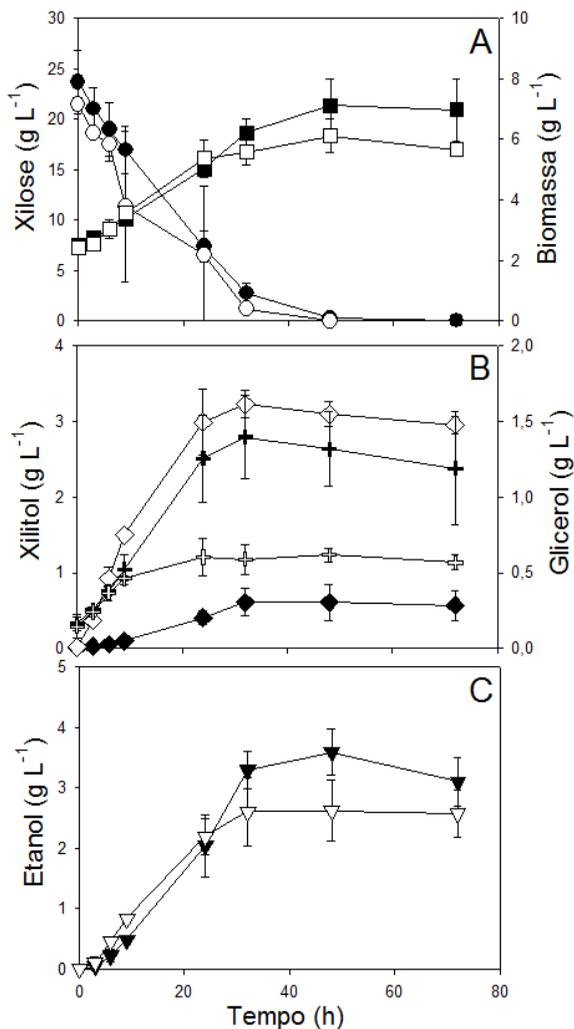
O perfil de consumo da xilose foi bastante semelhante nos ensaios com meios contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilose, mas não para os ensaios com alta concentração de xilose. No primeiro caso, os níveis de xilose

foram reduzidos a 2,7 e 1,2 g L<sup>-1</sup> em 32 horas nas linhagens MP-C5 e DDA-KB, respectivamente (Figura 17). Já nos ensaios com meios contendo 100 g L<sup>-1</sup> de xilose, os níveis de xilose foram reduzidos a ≈ 57 e 9,4 g L<sup>-1</sup> em 72 horas nas linhagens parental e transformada, respectivamente (Figura 18).

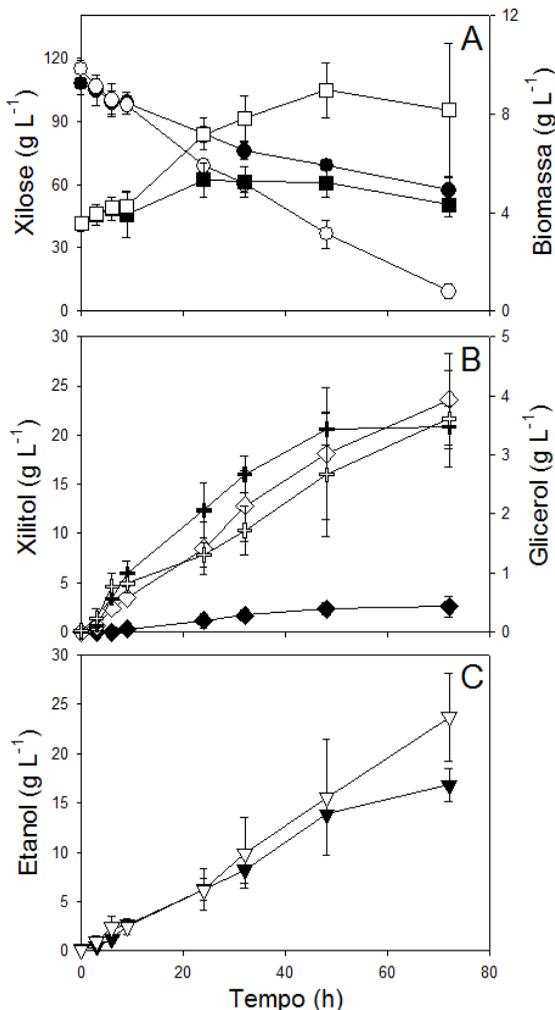
A produção de metabólitos (xilitol, glicerol e etanol) foi significativamente alterada quando realizada a deleção o gene *PHO13*. Nos ensaios com meios contendo 20 g L<sup>-1</sup> de xilose, a linhagem parental produziu ≈ 0,6 g L<sup>-1</sup> de xilitol, 1,4 g L<sup>-1</sup> de glicerol e 3,6 g L<sup>-1</sup> de etanol, enquanto que a linhagem transformada produziu ≈ 3,2 g L<sup>-1</sup> de xilitol, 0,6 g L<sup>-1</sup> de glicerol e 2,6 g L<sup>-1</sup> de etanol (Figura 17). Dessa forma, a linhagem parental atingiu valores maiores de concentração para os metabólitos glicerol e etanol, e o oposto para o xilitol. Nos ensaios com meios contendo 100 g L<sup>-1</sup> de xilose, a linhagem parental produziu ≈ 2,6 g L<sup>-1</sup> de xilitol, 3,5 g L<sup>-1</sup> de glicerol e 17 g L<sup>-1</sup> de etanol, enquanto que a linhagem transformada produziu ≈ 24 g L<sup>-1</sup> de xilitol, 3,6 g L<sup>-1</sup> de glicerol e 24 g L<sup>-1</sup> de etanol (Figura 18).

Para os ensaios de fermentação, os parâmetros fisiológicos estão apresentados na Tabela 7. Os parâmetros avaliados, quando referentes aos ensaios em meios contendo 20 g L<sup>-1</sup> de xilose, não sofrem alterações muito marcantes. Exceto em relação ao fator de conversão de substrato a xilitol, que foi marcadamente superior na linhagem DDA-KB. Para os ensaios com meios contendo 100 g L<sup>-1</sup> de xilose (ocorrência do efeito inibitório), a linhagem DDA-KB apresentou valores de produtividade em biomassa e de produtividade em etanol maiores quando comparada a linhagem parental. Como esperado, o fator de conversão de substrato a xilitol foi maior para a linhagem transformada, seguindo o mesmo perfil da fermentação em 20 g L<sup>-1</sup> de xilose. No entanto, o fator de conversão de substrato a etanol foi uma vez e meia maior na linhagem parental.

Os resultados das fermentações demonstram que a deleção do gene *PHO13* foi responsável por aumentar consideravelmente a produção/excreção de xilitol nos meios com ambas as concentrações de xilose. Em meios com 20 g L<sup>-1</sup> de xilose, o consumo desse, a produção de biomassa e a produção de etanol não foram marcadamente afetados. De fato, a linhagem parental apresentou ligeira vantagem quanto à produção de biomassa e de etanol (Figura 17). Essa vantagem pode ser atribuída, em partes, ao excesso de xilitol produzido (e que posteriormente não foi consumido) pela linhagem transformada. Os



**Figura 17: Fermentação em batelada simples de 20 g L<sup>-1</sup> de xilose pelas linhagens MP-C5 e DDA-KB.** Os cultivos das linhagens MP-C5 (símbolos pretos) e DDA-KB (símbolos brancos), pré-crescidas em 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e ressuspensas numa concentração inicial de 2,5 g L<sup>-1</sup> de células, foram realizados em batelada simples em condições microaeróbicas. (A) A concentração de xilose (círculos) e quantidade de biomassa celular (quadrados), (B) produção de xilitol (losangos) e glicerol (cruzes), e (C) produção de etanol (triângulo invertido) foram determinadas ao longo do tempo.



**Figura 18: Fermentação em batelada simples de 100 g L<sup>-1</sup> de xilose pelas linhagens MP-C5 e DDA-KB.** Os cultivos das linhagens MP-C5 (símbolos pretos) e DDA-KB (símbolos brancos), pré-crescidas em 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e ressuspensas numa concentração inicial de 3,5 g L<sup>-1</sup> de células, foram realizados em batelada simples em condições microaeróbicas. **(A)** A concentração de xilose (círculos) e quantidade de biomassa celular (quadrados), **(B)** produção de xilitol (losangos) e glicerol (cruzes), e **(C)** produção de etanol (triângulo invertido) foram determinadas ao longo do tempo.

**Tabela 7 – Parâmetros fisiológicos das linhagens MP-C5 e DDA-KB em fermentações em batelada simples de xilose.**

<b>Concentração de xilose e linhagem</b>	<b><math>P_{Biomassa}</math></b>	<b><math>P_{Etanol}</math></b>	<b><math>Y_{Xilitol/s}</math></b>	<b><math>Y_{Glicerol/s}</math></b>	<b><math>Y_{Etanol/s}</math></b>	<b><math>Y_{Biomassa/s}</math></b>
20 g L <sup>-1</sup> xilose:						
MP-C5	0,09±0,02	0,09±0,02	0,03±0,01	0,07±0,01	0,16±0,02	0,20±0,05
DDA-KB	0,07±0,02	0,06±0,03	0,17±0,01	0,03±0,01	0,13±0,02	0,18±0,01
100 g L <sup>-1</sup> xilose:						
MP-C5	0,06±0,02	0,23±0,02	0,06±0,01	0,09±0,02	0,36±0,09	0,06±0,01
DDA-KB	0,1±0,03	0,33±0,06	0,22±0,03	0,03±0,01	0,22±0,03	0,06±0,01

**Nota:** <sup>1</sup> Os valores de produtividade estão expresso em g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. <sup>2</sup> Os valores dos fatores de conversão de substrato em produto ou em biomassa estão expresso em g<sub>Produto</sub> (g<sub>Substrato</sub>)<sup>-1</sup> e g<sub>Biomassa</sub> (g<sub>Substrato</sub>)<sup>-1</sup>, respectivamente.

resultados aqui reportados contrastam com os obtidos por Van Vleet, Jeffries e Olsson, (2008), os quais o consumo de xilose, a produção de biomassa e de etanol foram maiores na linhagem *pho13Δ*. Porém, naquele estudo, a linhagem *pho13Δ* apresentou também excessiva excreção de xilitol.

Nos cultivos com meios contendo  $100 \text{ g L}^{-1}$  de xilose, foi possível perceber diferenças maiores entre os dois grupos. O efeito inibitório atribuído às altas concentrações de xilose parece novamente dificultar tanto o consumo da xilose quanto o produção de biomassa celular. A linhagem transformada apresentou um consumo mais apurado de xilose (tanto na quantidade consumida quanto na rapidez, em 72 h de fermentação) e, portanto, era esperada uma maior produção de xilitol (a qual também é incrementada apenas com a deleção do gene *PHO13*, uma vez que nos meios contendo  $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilose, houve diferença na quantidade de produção de xilitol, mas não no consumo de xilose) e de biomassa. Mesmo assim, a linhagem transformada foi capaz de produzir  $6,92 \text{ g L}^{-1}$  de etanol a mais que a linhagem parental (fato esse que pode ser atribuído ao maior consumo de xilose), embora com menor rendimento de conversão (Tabela 7).

Esses resultados são comparáveis àqueles obtidos por Fujitomi e colaboradores (2012), os quais a linhagem *pho13Δ* apresentou maior fator de consumo volumétrico de xilose e maior produção de etanol, indicando um efeito positivo da deleção do gene *PHO13*. As condições experimentais do referido trabalho foram microaeróbias e em meios contendo  $80 \text{ g L}^{-1}$  de xilose. Comparando a excreção de glicerol, que no presente estudo foi similar entre as linhagens, Fujitomi e colaboradores (2012) relatam uma menor excreção desse metabólito na linhagem *pho13Δ*.

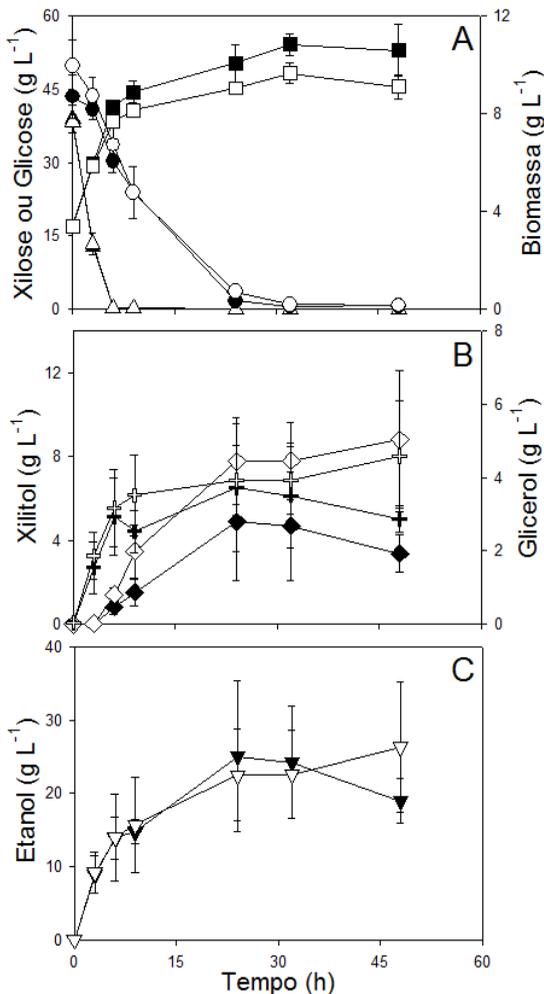
Os ensaios de co-fermentação almejavam avaliar, através do perfil de consumo dos açúcares, bem como o perfil de produção de biomassa celular e de metabólitos, o real efeito da deleção do gene *PHO13* em *S. cerevisiae* cultivadas em meios contendo fonte mista de carbono. Nos ensaios de co-fermentação com meios contendo xilose e glicose, não houve diferenças quanto aos perfis de consumo desses açúcares. A glicose em ambas a linhagens foi consumida em menos de 6 horas de cultivo. Já a xilose levou  $\approx 32$  horas para ser totalmente consumida por ambas as linhagens. Com relação à concentração de biomassa, embora as diferenças não sejam acentuadas, a linhagem parental alcançou  $10,8 \text{ g L}^{-1}$  enquanto que a linhagem transformada atingiu apenas  $9,6 \text{ g L}^{-1}$ . O perfil de crescimento foi similar nos dois grupos, tendo seu valor máximo em 32 horas e depois regredindo

lentamente (Figura 19). Contudo, a produção de metabólitos (xilitol, glicerol e etanol) foi notadamente alterada em função da deleção do gene *PHO13*. A linhagem parental produziu  $\approx 4,8 \text{ g L}^{-1}$  de xilitol,  $3,7 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol e  $24,8 \text{ g L}^{-1}$  de etanol, enquanto que a linhagem transformada aumentou a excreção de metabólitos produzindo  $\approx 8,8 \text{ g L}^{-1}$  de xilitol,  $4,6 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol e  $26,3 \text{ g L}^{-1}$  de etanol (Figura 19).

Os parâmetros fisiológicos dos ensaios de co-fermentação estão apresentados na Tabela 8. Em meios contendo xilose e glicose, os parâmetros avaliados não sofrem alterações evidentes. No entanto, a linhagem parental apresentou valor de produtividade em etanol superior ao apresentado pela linhagem transformada. Já em relação ao fator de conversão de xilose a xilitol, essa foi ligeiramente maior para linhagem transformada.

Em ensaios de co-fermentação de xilose e glicose ( $6,7 \text{ g L}^{-1}$  cada açúcar em condições microaeróbias), Shen e colaboradores (2012) obtiveram duas fases distintas. A primeira ocorre somente o consumo da glicose (até seu completo esgotamento), e a segunda ocorre o consumo a xilose. Esse estudo reportou que a deleção do gene *PHO13* não afeta o crescimento e o consumo em glicose (1ª fase). Contudo, durante a fase de consumo da xilose a linhagem *pho13Δ* (XR, XDH e XK) demonstrou maior fator de produção de xilitol e acetato e menor fator de produção de glicerol e etanol (SHEN et al., 2012). Da mesma forma, Van Vleet, Jeffries e Olsson (2008) obtiveram distintas fases em um ensaio de co-fermentação de glicose e xilose ( $10 \text{ g L}^{-1}$  de cada açúcar em condições microaeróbias). Na primeira fase, foi consumida a glicose e produzido etanol. Os fatores de crescimento e de consumo de glicose foram equiparáveis entre a linhagem parental e a *pho13Δ*. Contudo, essa última teve maior rendimento de acetato e menor rendimento de glicerol. Na segunda fase houve o consumo da xilose e de etanol simultaneamente. Nesse ponto, os fatores de crescimento e de consumo de xilose foram maiores na linhagem *pho13Δ*. Na terceira fase houve o co-consumo de xilose e glicerol, sendo os fatores e os rendimentos dos produtos bastante similares para ambas as linhagens (VAN VLEET, JEFFRIES, OLSSON, 2008).

Diferentemente dos dois estudos acima reportados, houve neste trabalho um co-consumo de xilose e glicose simultaneamente, embora muito mais acelerado para hexose (esgotada em menos de 6 horas). A deleção do gene *PHO13* foi responsável novamente por um maior rendimento de xilitol. Além disso, a linhagem *pho13Δ* apresentou maior



**Figura 19: Co-fermentação em batelada simples pelas linhagens MP-C5 e DDA-KB em meio contendo 40 g L<sup>-1</sup> de xilose e de glicose.** Os cultivos das linhagens MP-C5 (símbolos pretos) e DDA-KB (símbolos brancos), pré-crescidas em 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e ressuspensas numa concentração inicial de 3,4 g L<sup>-1</sup> de células, foram realizados em batelada simples em condições microaeróbicas. (A) A concentração de xilose (círculos) e glicose (triângulos), e a quantidade de biomassa celular (quadrados), (B) produção de xilitol (losangos) e glicerol (cruzes), e (C) produção de etanol (triângulo invertido) foram determinados ao longo do tempo.

**Tabela 8 – Parâmetros fisiológicos das linhagens MP-C5 e DDA-KB em co-fermentações em batelada simples de xilose e glicose ou sacarose.**

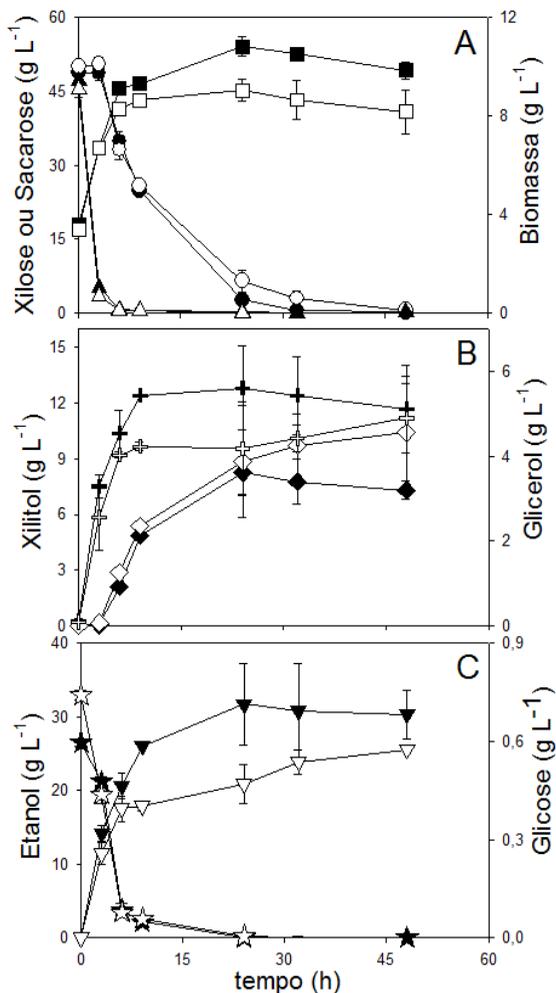
Concentração de açúcares e Linhagem	$P_{Biomassa}$	$P_{Etanol}$	$Y_{Xilitol/Xilose}$	$Y_{Glicerol/s}$	$Y_{Etanol/s}$	$Y_{Biomassa/s}$
40 g L <sup>-1</sup> xilose e glicose:						
MP-C5 <sup>a</sup>	0,18±0,04	1,01±0,47	0,12±0,08	0,05±0,02	0,32±0,13	0,09±0,003
DDA-KB <sup>a</sup>	0,20±0,01	0,65±0,32	0,19±0,06	0,06±0,02	0,30±0,09	0,08±0,005
40 g L <sup>-1</sup> xilose e sacarose:						
MP-C5 <sup>b</sup>	0,30±0,013	1,32±0,23	0,18±0,02	0,07±0,006	0,34±0,05	0,08±0,002
DDA-KB <sup>b</sup>	0,23±0,014	0,56±0,04	0,22±0,05	0,05±0,003	0,28±0,02	0,06±0,002

**Nota:** <sup>1</sup> Os valores de produtividade estão expresso em g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. <sup>2</sup> Os valores dos fatores de conversão de substrato em produto ou em biomassa estão expresso em  $g_{Produto} (g_{Substrato})^{-1}$  e  $g_{Biomassa} (g_{Substrato})^{-1}$ , respectivamente. <sup>3</sup>Substrato compreende o somatório da concentração dos açúcares presentes no meio (xilose + glicose ou xilose + sacarose). A exceção a  $Y_{Xilitol/Xilose}$ , onde o substrato é apenas a xilose e os seus valores estão expressos em  $g_{Xilitol} (g_{Xilose})^{-1}$ .

produção de glicerol, contrapondo os ensaios anteriores (do presente trabalho), onde a produção de glicerol havia sido sempre menor. Já a produção de etanol, embora os valores absolutos sejam bastante semelhantes, a linhagem parental atingiu sua produção máxima de etanol em apenas 24 horas (maior produtividade), enquanto que a linhagem transformada demorou 48 horas para alcançar a máxima produção.

O consumo preferencial de glicose sobre a xilose no ensaio de co-fermentação pode ser atribuído, entre outras coisas, a falta de um transportador específico para a xilose expresso na linhagem estudada. A xilose pode ser conduzida para o meio intracelular por transportadores não-específicos de hexoses, tais como o Gal2 e os Hxt. O sistema de alta afinidade ( $K_m$  glicose  $\approx$  1,5 mM e  $K_m$  xilose  $\approx$  137-190 mM) é reprimido na presença de glicose, enquanto que o sistema de baixa afinidade ( $K_m$  glicose  $\approx$  20-35 mM e  $K_m$  xilose  $\approx$  1,5 M) é expresso constitutivamente (BISSON, 1988; KÖTTER, CIRIACY, 1993). A repressão do sistema de alta afinidade (Gal2 e Hxt7) pela glicose pode ser a principal causa a inibição do consumo de xilose no início da co-fermentação (HO, CHEN, BRAINARD, 1998). Além disso, os transportadores Hxt apresentam reduzida afinidade com a xilose (KÖTTER, CIRIACY, 1993), tendo a glicose uma afinidade de 10 a 100 vezes superior (SALOHEIMO et al., 2007). Os valores de  $K_m$  (apresentados acima) indicam que o transporte de xilose através desses transportadores é significativamente menos eficiente quando comparado ao transporte da glicose (KÖTTER, CIRIACY, 1993). À medida que a concentração de glicose diminui, a afinidade dos transportadores pela xilose é aumentada (LEE et al., 2002). No entanto, na etapa final da fermentação, quando a concentração de xilose é baixa, o seu fator de consumo vai sendo reduzida (HO, CHEN, BRAINARD, 1998; JOJIMA et al., 2010). A expressão heteróloga de transportadores específicos de xilose poderia ser uma estratégia para transpor essa inibição e induzir um melhor consumo de glicose e xilose simultaneamente.

Nos ensaios de co-fermentação com meios contendo xilose e sacarose, também não houve diferenças quanto aos perfis de consumo de xilose e sacarose entre as linhagens. A sacarose foi consumida em menos de 6 horas de cultivo. Já a xilose levou  $\approx$  32 horas para ser quase que totalmente consumida (Figura 20). Porém, devido às limitações da técnica de dosagem da xilose (dosagem através da diferença entre a concentração de açúcares redutores e a concentração de glicose – item 3.3.3) é provável que uma pequena porcentagem da dosagem de xilose



**Figura 20: Co-fermentação em batelada simples pelas linhagens MP-C5 e DDA-KB em meio contendo 40 g L<sup>-1</sup> de xilose e de sacarose.** Os cultivos das linhagens MP-C5 (símbolos pretos) e DDA-KB (símbolos brancos), pré-crescidas em 20 g L<sup>-1</sup> de glicose e ressuspensas numa concentração inicial de 3,5 g L<sup>-1</sup> de células, foram realizados em batelada simples em condições microaeróbicas. (A) A concentração de xilose (círculos) e sacarose (triângulos), e a quantidade de biomassa celular (quadrados), (B) produção de xilitol (losangos) e glicerol (cruzes), e (C) produção de etanol (triângulo invertido) e concentração de glicose (estrelas) foram determinados ao longo do tempo.

seja representada por traços de frutose, provenientes da clivagem da sacarose. Esse fato poderia explicar porque o consumo de xilose foi mais acelerado em co-cultivos contendo glicose ( $\approx 24$  h) do que os contendo sacarose ( $\approx 32$  h). O consumo prioritário de sacarose frente a xilose nas seis primeiras horas segue o mesmo princípio explicado para a glicose, uma vez que a sacarose é clivada principalmente no ambiente extracelular (invertase extracelular) e os açúcares resultantes (glicose e frutose) são conduzidos para o interior da celular pelos transportadores supracitados.

Com relação à concentração de biomassa, embora as diferenças não sejam tão acentuadas, a linhagem parental alcançou valores de  $10,8 \text{ g L}^{-1}$  enquanto que a linhagem transformada atingiu apenas  $9 \text{ g L}^{-1}$ . O perfil de crescimento foi similar nos dois grupos, tendo seu valor máximo em 24 horas e depois regredindo lentamente (Figura 20). A produção de metabólitos (xilitol, glicerol e etanol) foi ligeiramente alterada em função a deleção do gene *PHO13*. A linhagem parental produziu  $\approx 8,3 \text{ g L}^{-1}$  de xilitol,  $5,6 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol e  $31,7 \text{ g L}^{-1}$  de etanol, enquanto que a linhagem transformada produziu  $\approx 10,4 \text{ g L}^{-1}$  de xilitol,  $4,9 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol e  $25,6 \text{ g L}^{-1}$  de etanol (Figura 20). Conforme demonstra a Tabela 8, nos ensaios de co-fermentação em meios contendo xilose e sacarose, a linhagem parental apresentou valores de produtividade em biomassa e de produtividade em etanol superiores aos apresentados pela linhagem transformada. O fator de conversão de substrato a etanol também foi ligeiramente superior na linhagem parental. Já o fator de conversão de xilose a xilitol não sofreu alteração marcante, contrapondo os ensaios anteriores, onde a linhagem transformada sempre apresentou valores maiores (exceto Figura 14).

Análise de transcriptoma e proteoma em *S. cerevisiae* indicou que a xilose não é percebida como um açúcar fermentável (JEFFRIES, 2006; SALUSJÄRVI et al., 2008), provavelmente porque a via de sinalização que garante a utilização eficiente das hexoses não reconhece a xilose (LEMAIRE et al., 2004; JOHNSTON, KIM, 2005; SANTANGELO, 2006). A expressão heteróloga das enzimas XR e XDH de *S. stipitis* em *S. cerevisiae* possibilita o crescimento em xilose, porém o xilitol é produzido em grandes quantidades (KÖTTER, CIRIACY, 1993). A especificidade da XR com o cofator NADPH (e em menor grau com o NADH) e da XDH com o cofator  $\text{NAD}^+$  leva a um desequilíbrio no balanço redox em *S. cerevisiae* consumidoras de xilose, as quais somente crescem se o oxigênio estiver disponível. Por essa razão, o metabolismo da xilose é parcialmente regulado pela disponibilidade do oxigênio, o qual afeta tanto os fatores quanto os

rendimentos da produção de etanol (BATT et al., 1986; DU PREEZ, 1994). A extensão da oxigenação determina a divisão do fluxo de carbono entre a produção de etanol (ou outros metabólitos) e a produção de biomassa (DU PREEZ, 1994). Toivari e colaboradores (2001) mostraram que com baixa aeração, os níveis de X5F aumentam na célula. Ao mesmo tempo, como um aumento da aeração, os níveis de ATP detectados na célula decrescem. Esses resultados indicam que o aumento da aeração possibilita o aumento do metabolismo (maior utilização dos metabólitos intermediários e do ATP) nas reações posteriores (*downstream*) à formação da X5F (TOIVARI et al., 2001).

A aeração está intimamente relacionada com o balanço redox intracelular de ambos os sistemas de cofatores (NADH/NAD<sup>+</sup> e NADPH/NADP<sup>+</sup>). Em leveduras consumidoras de xilose, os fatores de formação e consumo de ambos os sistemas de cofatores são balanceados durante o crescimento aeróbico em xilose (NISSEN et al., 2001). Contudo, na ausência de oxigênio como acceptor de elétrons, a fermentação da xilose ocorre mas é geralmente acompanhada (ou mesmo inibida) pelo desequilíbrio no balanço redox entre os cofatores, resultando num acúmulo de NADP<sup>+</sup> e NADH durante as reações de oxidoredução. Em condições anaeróbicas, o NADPH pode ser regenerado via Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (na VPF) ou pelas enzimas Isocitrato Desidrogenase e Aldeído Desidrogenase (ambas dependentes de NADP<sup>+</sup>), minimizando o acúmulo de NADP<sup>+</sup> (BRUINENBERG et al., 1983; BRUINENBERG, VANDIJKEN, SCHEFFERS, 1983; NISSEN et al., 2001). A regeneração do estoque de NADPH pode ser melhorada através da expressão heteróloga da enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase dependente de NADP<sup>+</sup> (E.C. 1.2.1.13) conjuntamente com a deleção do gene *ZWF1*, que codifica a enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase. Essa abordagem resultou em menor excreção de xilitol e maior rendimento de etanol (VERHO et al., 2003).

Contudo, em condições microaeróbicas, quantidades insuficientes de NAD<sup>+</sup> são recicladas para as reações da XDH, resultando numa abundância de NADPH relativa ao NAD<sup>+</sup> para as enzimas XR e XDH, respectivamente. O sistema de transferência de elétrons é incapaz de reoxidar o NADH a NAD<sup>+</sup> por respiração devido aos baixos níveis de oxigênio e a fermentação a etanol não produz rendimento líquido de NAD<sup>+</sup> (ANDERLUND et al., 1999; NISSEN et al., 2001). O acúmulo de NADH ocorre porque *S. cerevisiae* não possui uma transidrogenase capaz de converter NADH em NADPH em resposta a demanda celular (BRUINENBERG et al., 1983). A regeneração de NAD<sup>+</sup> poderia ser realizada através da redução da

diidroxiacetona a glicerol (JEPPSSON et al., 2003a), como demonstrado na Figura 5. Contudo, a formação de glicerol não é considerada ideal uma vez que desvia átomos de carbono que seriam destinados à produção de etanol. A reciclagem incompleta dos cofatores ocorre em condições de reduzida respiração e resulta na inibição da atividade da XDH, sendo que em leveduras consumidoras de xilose isso contribui significativamente para o aumento na produção de xilitol e decréscimo na produção de etanol (DITZELMULLER et al., 1984b; DITZELMULLER et al., 1985; VERDUYN et al., 1985; BATT et al., 1986; BICHO et al., 1988). A introdução da via da XI (via 2, Figura 4) em leveduras provê uma excelente oportunidade de transpor o obstáculo do desequilíbrio redox associado às enzimas XR e XDH. Em comparação, leveduras expressando a via da XI podem teoricamente contornar o desequilíbrio do balanço redox e metabolizar a xilose em condições anaeróbias onde o rendimento de biomassa seria menor e mais carbono da xilose seria canalizado para a produção de etanol.

O glicerol é um subproduto do metabolismo de açúcares (hexoses e pentoses) e a sua produção elevada também contribui para a redução do rendimento de etanol. A formação do glicerol está bastante relacionada ao balanço intracelular de  $NAD^+/NADH$  (BRUINENBERG et al., 1983). O glicerol é sintetizado pela enzima citosólica Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase, a qual é dependente do cofator NADH. Essa enzima apresenta duas isoformas codificadas pelos genes *GPD1* e *GPD2*, sendo o primeiro gene fortemente induzido em condições de estresse osmótico. A formação do NADH, necessário para a produção do glicerol, se dá com a diminuição da redução do acetaldeído a etanol (reduz a produção de etanol) e o aumento da oxidação do acetato (BLOMBERG, ADLER, 1989; ERASMUS, MERWE, VUURE, 2003), conforme apresentado na Figura 5. Em virtude dessas adaptações metabólicas ao estresse osmótico, menos etanol é produzido por cada unidade de açúcar metabolizado.

Trabalhos publicados têm relacionado a deleção do gene *PHO13* com a redução da produção de glicerol (VAN VLEET, JEFFRIES, OLSSON, 2008; SHEN et al., 2012). Nesses casos, o decréscimo na produção de glicerol poderia ser resultado de uma alta atividade da enzima Glicerol Quinase (converte glicerol a glicerol-3-fosfato). As atividades adicionais das enzimas Glicerol-3-fosfato Desidrogenase e Triosefosfato Isomerase são necessárias para converter do glicerol-3-fosfato em gliceraldeído-3-fosfato e destiná-lo para a Via Glicolítica ou Gliconeogênica (VAN VLEET, JEFFRIES, OLSSON, 2008). Outra explicação seria que a alteração na quantidade excretada de

glicerol poderia ser atribuída às diferenças no balanço redox entre as linhagens parental e *pho13Δ*. Nesse caso, a menor produção de glicerol poderia indicar um menor excesso de NADH produzido durante a assimilação da xilose e produção de metabólitos. No entanto, os resultados aqui apresentado (exceto Figura 14), bem como os reportados por Fujitomi e colaboradores (2012), a deleção do *PHO13* aumentou a produção de glicerol o que poderia indicar um aumento no desequilíbrio do balanço redox.

O aumento na excreção de xilitol pela linhagem *pho13Δ* foi um evento recorrente nos cultivos realizados (exceto naquele de crescimento em frasco agitado com meio contendo 20 g L<sup>-1</sup> de xilose). Esse fato pode ser atribuído a uma baixa atividade da enzima XDH, responsável por converter xilitol em xilulose. Recentemente, Kim e colaboradores (2012) demonstraram que o baixo nível de expressão do gene *XYL2* é um dos principais gargalos para uma eficiente metabolização da xilose. Em seus experimentos, foi reportado que uma adicional sobre-expressão do gene *XYL2* (através do controle de um promotor constitutivo forte - *PGK*), em linhagens consumidoras de xilose, foi responsável por reduzir o acúmulo xilitol, além de aumentar o rendimento de etanol. Em resumo, esses pesquisadores apontam que a expressão do gene *XYL2* deve ser relativamente maior do que os genes *XYL1* e *XKS1* (KIM et al., 2012). Dois outros estudos já haviam reportado que a baixa relação XR/XDH resulta no decréscimo no rendimento do xilitol (WALFRIDSSON et al., 1997; ELIASSON et al., 2001). No entanto, outros estudos argumentam que a alta atividade da enzima XR seria responsável pela baixa excreção de xilitol e alto consumo da xilose (JEPPSSON et al., 2003b; KARHUMAA et al., 2007b; MATSUSHIKA, SAWAYAMA, 2008). Mais recentemente, Parachin e colaboradores (2011) propuseram um modelo cinético onde a alta atividade da XK poderia prevenir o acúmulo de xilitol. Esses resultados, às vezes contraditórios, demonstram a complexidade existente na metabolização da xilose.

Para o presente trabalho, Gonçalves (2014) reportou as atividades enzimáticas de *SsXR* (0,34 U [mg proteína]<sup>-1</sup>), *SsXDH* (0,448 U [mg proteína]<sup>-1</sup>) e *ScXK* (0,049 U [mg proteína]<sup>-1</sup>) expressas na linhagem MP-C5. Embora a atividade da XDH seja maior que a da XR, aquela enzima parece ser um fator limitante no metabolismo da xilose (KIM et al., 2012). Em um trabalho posterior, Kim e colaboradores (2013) buscaram avaliar como a expressão relativa dos genes *XYL1* e *XYL2* poderia afetar o fenótipo de fermentação da xilose e se a deleção do gene *PHO13* afetaria de alguma forma esse processo. Para tanto,

foram construídas linhagens *pho13Δ* que expressavam diferentes níveis das enzimas XR e XDH. A deleção do gene *PHO13*, nesse estudo, foi responsável por melhorar o consumo de xilose e os rendimentos de etanol. No entanto, o grau de melhora e o rendimento de xilitol (que foi aumentado) variaram entre as diferentes linhagens dependendo do perfil de expressão das enzimas XR e XDH. Esses dados sugerem que a deleção do *PHO13* alivia a limitação no consumo de xilose em *S. cerevisiae* consumidoras de xilose, porém sem alterar o padrão de fermentação original determinado pelo nível de expressão dos genes *XYL1*, *XYL2* e *XKS1* (KIM et al., 2013). Em outro trabalho, Shen e colaboradores (2012) relataram que a deleção do gene *PHO13* foi responsável por aumentar ligeiramente a atividade das enzimas XR (com ambos os cofatores) e XDH, gerando um efeito positivo no metabolismo.

Kim e colaboradores (2013) relataram ainda que a ação inibitória da Pho13p na utilização da xilose poderia estar relacionada com o efeito tóxico (atraso no crescimento celular) causado devido às altas concentrações de xilose. Embora a deleção do gene *PHO13* tenha significado um queda marcante da fase *lag* quando em fermentações em meios contendo 40 g L<sup>-1</sup> de xilose, o fator de crescimento nessas condições ainda continuou menor quando comparado ao fator de crescimento em meios contendo quantidades menores de açúcar (5 e 10 g L<sup>-1</sup>). Isso demonstra que a toxicidade gerada pela xilose não foi completamente resolvida com a deleção do gene *PHO13*, e que podem existir outras enzimas ou mecanismos envolvidos nesse efeito tóxico (KIM et al., 2013).

Diversos estudos têm apontado que a deleção do gene *GRE3* (codifica a XR endógena de *S. cerevisiae*) está associada com uma menor excreção de xilitol (KUHNS et al., 1995; KUYPER et al., 2005b; KARHUMAA et al., 2007a; PARACHIN et al., 2011) tanto em linhagens que expressam uma XI (TRÄFF et al., 2001; LÖNN et al., 2003; KUYPER et al., 2005b) bem como em linhagens que expressam XR e XDH (TRÄFF-BJERRE et al., 2004). A deleção do gene *GRE3* é ainda de particular importância nas linhagens que expressam a XI, pois o xilitol funciona como um inibidor da atividade dessa enzima (YAMANAKA, 1969). Além disso, outros estudos têm relatado que a produção de xilitol é significativamente menor quando a xilose é co-fermentada com a glicose (MEINANDER, BOELS, HAHN-HÄGREDAL, 1999; ÖHGREN et al., 2006; KARHUMAA et al., 2007b). Nessas condições, a utilização da xilose é aumentada sugerindo que a formação do xilitol não é apenas uma consequência do *pool*

insuficiente de cofator oxidado ( $\text{NAD}^+$ ), mas também em função do fluxo insuficiente da xilose (HOFMEYR, CORNIXH-BOWDEN, 2000). Estudos com a expressão das enzimas XR e/ou XDH com alteração na especificidade dos cofatores com vistas a diminuir/eliminar o desequilíbrio redox (JEPPSSON et al., 2006; WATANABE et al., 2007b; WATANABE et al., 2007c; PETSCHACHER, NIDETZKY, 2008), assim como estudos de engenharia metabólica com o objetivo de desenvolver vias de regeneração dos cofatores para essas enzimas (ROCA, NIELSEN, OLSSON, 2003; VERHO et al., 2003; ZHANG, LIU, DING, 2012;) foram bem sucedidos em alcançar menores rendimentos de xilitol, embora isso não seja diretamente correlacionado com o rendimento de etanol. Portanto, o desequilíbrio no balanço redox pode não ser a principal causa para a ineficiente fermentação da xilose (KIM et al., 2013).

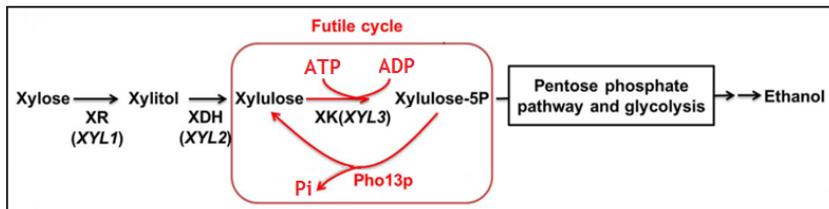
#### 4.2.3 Mecanismo de influência da Pho13p no metabolismo da xilose

Relativamente pouco se conhece sobre a função fisiológica da Pho13p e o exato mecanismo pelo qual a deleção do gene *PHO13* poderia estar afetando o metabolismo da xilose ainda precisa ser elucidado. Uma análise de BLAST da Pho13p identificou 13 proteínas intimamente relacionadas em diversas espécies, como *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Debaromyces hansenii*, etc. Mais de 100 proteínas similares de outros organismos são conhecidas, o que sugere que o *PHO13* é altamente conservado (NI, LAPLAZA, JEFFRIES, 2007). Tuleva e colaboradores (1998) testaram substratos para a atividade de fosfatase da enzima Pho13p e encontraram significativa atividade hidrolítica contra o substrato *p*-nitrofenilfosfato e contra as proteínas caseína e histona II-A fosforiladas. Outros estudos já haviam relatado um possível papel de desfosforilação de histonas para enzimas fosfatase (KANEKO et al., 1989; CHRISTOVA, GALABOVA, 1998;). Esses dados sugerem, então, que a Pho13p poderia estar envolvida na reversão da condição fosforilada de algumas proteínas e que, de alguma forma isso estaria impactando no metabolismo da xilose.

Fujitomi e colaboradores (2012) realizaram um estudo avaliando o perfil de expressão gênica global (análise de DNA *Microarray*) entre linhagens de *S. cerevisiae* consumidoras de xilose com e sem a deleção do gene *PHO13*. Esse estudo demonstrou que a expressão de genes envolvidos na VPF e na Via Glicolítica, incluindo os genes *ZWF1*, *SOL3* e *ADH1*, foi aumentada na linhagem *pho13Δ*. O

gene *ADHI* é responsável pela expressão da enzima que converte acetaldeído em etanol, utilizando o cofator NADH e liberando  $\text{NAD}^+$  (Figura 5). Além disso, outros trabalhos tem relacionado a deleção do gene *PHO13* com o aumento da expressão dos genes *TALI* e *TKL1*, esses ligados as reações não oxidativas da VPF (NI, LAPLAZA, JEFFRIES, 2007; VAN VLEET, JEFFRIES, OLSSON, 2008; FUJITOMI et al., 2012). Em contraste, os genes relacionados com a cadeia respiratória (genes *COX2* e *CYCI*) e com a maquinaria de síntese de ATP mitocondrial (genes *ATP1* e *ATP19*) tiveram seu nível e expressão reduzidos na linhagem *pho13Δ* (FUJITOMI et al., 2012). Esses dados sugerem que a deleção do gene *PHO13* estaria favorecendo o fluxo de carbono através da VPF (reações não oxidativas) e Via Glicolítica e direcionando para a produção de etanol, uma vez que os genes da respiração mitocondrial estão sendo reprimidos. Outros trabalhos sugerem que a habilidade em fermentar xilose está relacionada com as funções mitocondriais devido aos cofatores NADH e NADPH envolvidos no catabolismo e biossíntese de metabólitos (SHI et al., 2002; SALUSJÄRVI et al., 2003; MO, PALSSON, HERRGARD, 2009). Assim, a deleção do gene *PHO13* em *S. cerevisiae* possivelmente confere um efeito positivo não apenas na assimilação da xilose, mas também em diversas outras maquinarias metabólicas celulares (FUJITOMI et al., 2012).

Recentemente suspeitou-se que a Pho13p poderia ter atividade de fosfatase sobre a molécula de X5F, metabólito de entrada na VPF. Para tanto, extratos brutos de linhagens sobre-expressando o gene *PHO13* confirmaram, *in vitro*, a desfosforilação tanto da X5F como do substrato controle *p*-nitrofenilfosfato (KIM et al., 2013). Esse fato sugere que a Pho13p, *in vivo*, juntamente com a sobre-expressão da XK poderia formar um ciclo fútil que levaria a depleção das reservas de ATP e subsequentemente a limitação do metabolismo da xilose (Figura 21). A linhagem *pho13Δ* ainda apresentou atividade de fosfatase sobre a molécula de X5F, embora em níveis menores quando comparada com as linhagens controle e com sobre-expressão do gene *PHO13*. Isso sugere que outras enzimas/fosfatases poderiam estar envolvidas na ocorrência desse ciclo fútil, mas que a deleção do gene *PHO13* aliviaria parte do desperdício de ATP ali previsto (KIM e al., 2013).



**Figura 21: Ciclo fútil decorrente da atividade fosfatase da Pho13p sobre a molécula de xilulose-5-fosfato.** A enzima XK é responsável por converter a xilulose em X5F com o consumo de um ATP. A Pho13p, *in vitro*, é capaz de desfosforilar a X5F regenerando a molécula de xilulose. A ocorrência desse processo *in vivo* resultaria em um gasto de sentido de ATP. Fonte: KIM et al., 2013.



## 5 PRINCIPAIS RESULTADOS E CONCLUSÕES

O presente trabalho buscou avaliar o efeito da deleção dos genes supressores da metabolização da xilose (genes *BUD21* e *PHO13*) em linhagens da levedura *S. cerevisiae*. Os parâmetros avaliados, tais como, o perfil de consumo de xilose e perfis de produção de biomassa e de metabólitos em diferentes condições experimentais de cultivo, permitiram fazer as seguintes ponderações:

- As técnicas de engenharia genômica utilizadas neste trabalho foram eficientes e suficientes para a obtenção de linhagens de *S. cerevisiae* com deleção dos genes de interesse (*BUD21* e *PHO13*).

- As linhagens de laboratório CEN.PK113-7D e CEN.PK2-1C, as quais são incapazes de crescer em xilose, quando tiveram o gene *BUD21* deletado de seu genoma, não se tornaram aptas em consumir xilose. Além disso, outras linhagens laboratoriais *bud21Δ* (YKB2666 e Y01854) também não apresentam crescimento em xilose como fonte de carbono. Esses resultados apontam que o gene *BUD21* não age como supressor na metabolização da xilose, ao menos individualmente.

- A deleção do gene *PHO13* em linhagem industrial de *S. cerevisiae* foi capaz de aliviar o efeito inibitório causado pela alta concentração de xilose, permitindo que a linhagem *pho13Δ / pho13Δ* apresentasse um crescimento celular mais acelerado nos cultivos em placas de Petri. Esse resultado confirma que o referido gene possui influência no metabolismo da xilose.

- O consumo de xilose e o crescimento celular foram marcadamente melhorados na linhagem *pho13Δ / pho13Δ* quando crescidas em condições aeróbias (frascos agitados). Esses resultados novamente apontam para o efeito supressor do gene *PHO13*, mostrando que a sua deleção no genoma de *S. cerevisiae* pode ser uma eficaz estratégia para melhorar o consumo de xilose.

- A deleção do gene *PHO13* esteve normalmente associada com o aumento da produção de xilitol e alterações na produção de glicerol. Em vista disso, o desequilíbrio do balanço redox intracelular decorrente da atividade das enzimas XR e XDH pode estar sendo impactado pela deleção do *PHO13*.

- A deleção do gene *PHO13* resultou numa menor produção de etanol durante fermentações em batelada, contrastando com alguns

resultados reportados na literatura. Esse fato reforça a necessidade de novos estudos. No âmbito do presente estudo, seria importante avaliar se o pré-cultivo em meios contendo xilose ao invés da glicose poderiam estar impactando negativamente a metabolização da xilose, uma vez que a glicose inibe a expressão dos transportadores não específicos responsáveis pela internalização da xilose.

Assim, estudos adicionais são necessários para avaliar a real influência da deleção do gene *PHO13* no metabolismo da xilose.

## 6 REFERÊNCIAS

- ANDERLUND, M.; NISSEN, T.L.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; RYDSTRÖM, J.; HAHN-HÄGERDAL, B.; KIELLAND-BRANDT, M.C. Expression of the *Escherichia coli pntA* and *pntB* Genes, encoding Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase, in *Saccharomyces cerevisiae* and its Effect on product formation during anaerobic glucose fermentation **Applied Environmental Microbiology**, v. 65(6), p. 2333–2340, 1999.
- ANDO, A.; TANAKA, F.; MURATA, Y.; TAKAGI, H.; SHIMA, J. Identification and classification of genes required for tolerance to high-sucrose stress revealed by genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEM. Yeast Research**, v. 6, p. 249–267, 2006.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol - Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, p. 195-200, 2007.
- AMORE, R.; WILHELM, M.; HOLLENBERG, C.P. The fermentation of xylose — an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 30(4), p. 351-357, 1989.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J.V.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1267-1275, 2011.
- AMORIM, H.V. Fermentação alcoólica, Ciências & Tecnologia. Fermentec, Piracicaba, Brasil, 2005.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L. Ethanol production in a petroleum dependent world: the Brazilian experience. **Sugar Journal**, v. 67, p. 11-14, 2005.
- AMORIM, H.V.; BASSO, I.C.; LOPES, M.L. Evolution of ethanol production in Brazil. In: *Distilled Spirits: Tradition and Innovation*, BRYCE, J.H.; STEWART, G.G. (Ed.). Nottingham University Press, p. 143-148, UK, 2004.

ATTFIELD, P.V.; BELL, P.J. Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source. **FEMS yeast research**, v. 6(6), p. 862-868, 2006.

ATTIAS, J.; DURAND, H.; Further characterization of a specific p-nitrophenylphosphatase from baker's yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 321(2), p. 561-568, 1973.

ATTIAS, J.; BONNET, J.L. A specific alkaline p-nitrophenylphosphatase activity from baker's yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 268(2), p. 422-430, 1972.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. Short protocols in molecular biology. 2.ed. New York: Greene Publishing Associates, John Wiley & Sons, 1992. 1512p.

BABRZADEH, F.; JALILI, R.; WANG, C.; SHOKRALLA, S.; PIERCE, S.; ROBINSON-MOSHER, A.; NYREN, P.; SHAFER, R.W.; BASSO, L.C.; DE AMORIM, H.V.; DE OLIVEIRA, A.J.; DAVIS, R.W.; RONAGHI, M.; GHARIZADEH, B.; STAMBUK, B.U. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 287(6), p. 485-494, 2012.

BALAT,M.; BALAT, H.; CAHIDE, ÖZ. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy Combustion Science**,v. 34, p. 551-573, 2008.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; DE OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8(7), p. 1155-1163, 2008.

BATISTA, A.S.; MILETTI, L.C.; STAMBUK, B.U. Sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 26-33, 2004.

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

BICHO, P.A.; RUNNALS, P. L.; CUNNINGHAM, J.D.; LEEH. Induction of Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on Mixed Sugars. **Applied Environmental Microbiology**, v.54(1), p. 50-54, 1988.

BISSON, L. F. High-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is under general glucose repression control. **Journal of Bacteriology**, v. 170(10), p. 4838-4845, 1988.

BLOMBERG, A.; ADLER, L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 171(2), p. 087-1092, 1989.

BOLEN, P.L.; ROTH, K.A.; FREER, S.N.; Affinity purification of aldose reductase and xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 660-664, 1986.

BOTHAST, R.J.; NICHOLS, N.N.; DIEN, B.S. Fermentations with new recombinant organisms. **Biotechnology Progress**, v. 15(5), p. 867-875, 1999.

BRAT, D.; BOLES, E.; WIEDEMANN, B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75(8), p. 2304-2311, 2009.

BRUINENBERG, P.M.; JONKER, R.; VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Utilization of formate as an additional energy source by glucose-limited chemostat cultures of *Candida utilis* CBS 621 and *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066. **Archives of Microbiology**, v. 142(3), p. 302-306, 1985.

BRUINENBERG, P.M.; BOT, PHM-DE.; VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19(4), p. 256-260, 1984.

BRUINENBERG, P.M.; DE BOT, P.H.M.; VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 18(5), p. 287-292, 1983.

BRUINENBERG, P.M.; VAN DIJKEN J.P.; SCHEFFERS, W.A. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 953-964, 1983.

CAMPBELL, M.K. Bioquímica, Artmed Editora, 3<sup>a</sup> ed., Porto Alegre. 2000.

CHANG, S.F.; HO, N.W.Y Cloning the yeast xylulokinase gene for the improvement of xylose fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17(1-3), p. 313-318, 1988.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123(4), p. 413-433, 2006.

CHU, B.C.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 25(5), p. 425-441, 2007.

CLARK, D.W.; TKACZ, J.S.; LAMPEN, J.O. Asparagine-linked carbohydrate does not determine the cellular location of yeast vacuolar nonspecific alkaline phosphatase. **Journal of Bacteriology**, v. 152(2), p. 865-873, 1982.

COELHO, S.T.; GOLDENBERG, J. Alternative transportation fuels: contemporary case studies. **Encyclopedia of Energy**, v. 1, p. 67-80, 2004.

CONAB, 2014 – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em < <http://www.conab.gov.br> >. Acesso em 08/04/2014

CORTEZ, L.A.B.; LORA, E.E.S.; GÓMEZ, E.O. Biomassa para Energia. UNICAMP, Campinas, 2008.

CHRISTOVA, N.; GALABOVA, D. Phosphorylase phosphatase activity in *Saccharomyces cerevisiae* 257. **Zeitschrift für Naturforschung [C]**, v. 53(11-12), p. 951-956, 1998.

DÁRIO, M.G. Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2012

DEMARINI, D.J.; CARLIN, E.M.; LIVI, G.P. Constitutive promoter modules for PCR-based gene modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 18, p. 723-728, 2001.

DENG, X.X.; HO, N.W. Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 24-25, p. 193-199, 1990

DESAI, S.G.; GUERINOT, M.L.; LYND, L.R. Cloning of L-lactate dehydrogenase and elimination of lactic acid production via gene knockout in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65(5), p. 600-605, 2004.

DIEN, B.S.; COTTA, M.A.; JEFFRIES, T.W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63(3), p. 258-266, 2003.

DITZELMÜLLER, G.; KUBICEK, C.P.; WÖHRER, W.; RÖHR, M. Xylose metabolism in *Pachysolen tannophilus*: purification and properties of xylose reductase. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30(11), p. 1330-1336, 1984a.

DITZELMÜLLER, G.; KUBICEK, C.P.; WÖHRER, W.; RÖHR, M. Xylitol dehydrogenase from *Pachysolen tannophilus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 25(3), p. 195-198, 1984b.

DITZELMÜLLER, G.; KUBICEK-PRANZ, E.M.; RÖHR, M.; KUBICEK, C.P. NADPH-specific and NADH-specific xylose reduction is catalyzed by two separate enzymes in *Pachysolen tannophilus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 297-299, 1985.

DONELLA-DEANA, A.; OSTOJIC, S.; PINNA, L.A.; BARBARIC, S. Specific dephosphorylation of phosphopeptides by the yeast alkaline phosphatase encoded by PHO8 gene. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v. 1177(2), p. 221-228, 1993.

DRAGON, F.; GALLAGHER, J.E.; COMPAGNONE-POST, P.A.; MITCHELL, B.M.; PORWANCHER, K.A.; WEHNER, K.A.; WORMSLEY, S.; SETTLAGE, R.E.; SHABANOWITZ, J.; OSHEIM, Y.; BEYER, A.L.; HUNT, D.F.; BASERGA, S.J. A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. **Nature**, v. 417, p. 967–970, 2002.

DU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting d-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16(11), p. 944-956, 1994.

ELIASSON, A.; HOFMEYER, J.-H.S.; PEDLERA, S.; HAHN-HÄGERDAL, B. The xylose reductase/xylitol dehydrogenase/xylulokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzymes and Microbial Technology**, v. 29(4-5), p. 288-297, 2001.

ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. **Applied and environmental microbiology**, v. 66(8), p. 3381-3386, 2000.

ERASMUS, D.J.; VAN DER MERWE, G.K.; VAN VUUREN, H.J. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS Yeast Research**, v. 3(4), p. 375-399, 2003.

ENTIAN, K.D.; KÖTTER, P. Yeast mutant and plasmid collections. **Methods Microbiology**, v. 26, p. 431-449, 1998.

FORD, G.; ELLIS, E.M. Three aldo-keto reductases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemico-biological interactions**, v. 130-132(1-3), p. 685-98, 2001.

FUJITOMI, K.; SANDA, T.; HASUNUMA, T. KONDO, A. Deletion of the *PHO13* gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 161-166, 2012.

GALABOVA, D.; TULEVA, B.; VASILEVA-TONKOVA, E.; CHRISTOVA, N. Purification and properties of alkaline phosphatase with protein phosphatase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. **Zeitschrift für Naturforschung. [C]**, v. 55(7-8), p. 588-593, 2000.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J.J.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74(1), p. 78-88, 2006.

GÁRDONYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B. The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32(2), p. 252–259, 2003.

GIETZ, R.; WOODS, R. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA-polyethylene glycol method. **Methods in Enzymology**, v. 350, p. 87-96, 2002.

GIRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101(13), p. 4775-8000, 2010.

GODOY, A.; AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, A.J. Continuous and batch fermentation processes: Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International Sugar Journal**, v. 110, p. 175-181, 2008.

GOLDEMBERG J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, p. 6, 2008.

GONÇALVES, D.L. Influência dos transportadores de açúcares na fermentação de xilose por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2014.

GORMAN, J.A.; HU, A.S. The separation and partial characterization of L-histidinol phosphatase and an alkaline phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244(6), p. 1645-1650, 1969.

GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 14-146, 2006.

GÜLDENER, U.; HEINISCH, J.; KOEHLER, G.J.; VOSS, D.; HEGEMANN, J.H. A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 30 (6), p. e23, 2002.

GÜLDENER, U.; HECK, S.; FIELDER, T.; BEINHAUER, J.; HEGEMANN, J.H. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 24(13), p. 2519–2524, 1996.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74(5):937-953, 2007.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24 (12), p. 549-556, 2006.

HAHN-HÄGERDAL, B.; WAHLBOM, C.F.; GÁRDONYI, M.; VAN ZYL, W.H.; CORDERO OTERO, R.R.; JÖNSSON, L.J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 73, p. 53-84, 2001

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPSSON, H.; OLSSON, L.; MOHAGHEGHI, A. An interlaboratory comparison of the performance of ethanol-producing micro-organisms in a xylose-rich acid hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41(1), p. 62-72, 1994a.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16(11), p. 933-943, 1994b.

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

HIRASAWA, T.; FURUSAWA, C.; SHIMIZU, H. *Saccharomyces cerevisiae* and DNA microarray analyses: what did we learn from it for a better understanding and exploitation of yeast biotechnology? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 391–400, 2010.

HO, N.W.; CHEN, Z.; BRAINARD, A.P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. **Applied and environmental microbiology**, v. 64(5), p. 1852-1859, 1998.

HO, N.W.Y.; STEVIS, P.; ROSENFELD, S.; HUANG, J.J.; TSAO, G.T.; Expression of the *Escherichia coli* xylose Isomerase gene by a yeast promoter. **Biotechnology and Bioengineering**, p. 245-250, 1983.

HOFMEYR, J.S.; CORNISH-BOWDEN, A. Regulating the cellular economy of supply and demand. **FEBS Letters**, v. 476(1-2), p. 47-51, 2000.

HOLMES, E.W. Coupled enzymatic assay for the determination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, v. 244(1), p. 103-109. 1997.

JACOBSEN, S.E.; WYMAN, C.E. Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41(6), p. 1454-1461, 2002.

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

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

JEFFRIES, T.W.; JIN, Y.S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. **Advances in applied microbiology**, v. 47, p. 221-68, 2000.

JEFFRIES, T.W.; SHI, N.Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 65, p. 117-161, 1999.

JEONG, E.Y.; KIM, I.S.; LEE, H. Identification of lysine-78 as an essential residue in the *Saccharomyces cerevisiae* xylose reductase. **FEMS microbiology letters**, v. 209(2), p. 223-228, 2002.

JEONG, E.Y.; SOPHER, C.; KIM, I.S.; LEE, H. Mutational study of the role of tyrosine-49 in the *Saccharomyces cerevisiae* xylose reductase. **Yeast**, v. 18(11), p. 1081-1089, 2001.

JEPPSSON, M.; BENGTSSON, O.; FRANKE, K.; LEE, H.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher K(M) for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93(4), p. 665-673, 2006.

JEPPSSON, M.; JOHANSSON, B.; JENSEN, P.R.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. The level of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity strongly influences xylose fermentation and inhibitor sensitivity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Yeast**, v. 20(15), p. 1263-1272, 2003a.

JEPPSSON, M.; TRÄFF, K.; JOHANSSON, B.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Effect of enhanced xylose reductase activity on xylose consumption and product distribution in xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v.3(2), p. 167-175, 2003b.

JIN, Y.S.; NI, H.; LAPLAZA, J.M.; JEFFRIES, T.W. Optimal growth and ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* require moderate D-xylulokinase activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69(1), p. 495-503, 2003.

JOHANSSON, B.; CHRISTENSSON, C.; HOBLEY, T.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylulokinase overexpression in two Strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67(9), p. 4249-4255, 2001.

JOHNSTON, M.; KIM, J.H. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 247-52, 2005.

JOJIMA, T.; OMUMASABA, C.A.; INUI, M.; YUKAWA, H. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85(3), p. 471-480, 2010.

KANEKO, Y.; TOH-E, A.; BANOO, I.; OSHIMA, Y. Molecular characterization of a specific p-nitrophenylphosphatase gene, *PHO13*, and its mapping by chromosome fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular & General Genetics**, v. 220(1), p. 133-139, 1989.

KANEKO, Y.; TAMAI, Y.; TOH-E, A.; OSHIMA, Y. Transcriptional and post-transcriptional control of *PHO8* expression by PHO regulatory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5(1), p. 248-252, 1985.

KANEKO, Y.; TOH-E, A.; OSHIMA, Y. Identification of the genetic locus for the structural gene and a new regulatory gene for the synthesis of repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 2(2), p.127-137, 1982.

KARHUMAA, K.; SANCHEZ, R.G.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND M.F. Comparison of the xylose reductase-xylylitol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 6(5), 2007a.

KARHUMAA, K.; FROMANGER, R.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. High activity of xylose reductase and xylylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73(5), p. 1039-1046, 2007b.

KIM, S.R.; SKERKER, J.M.; KANG, W.; LESMANA, A.; WEI, N.; ARKIN, A.P.; JIN, Y.S. Rational and evolutionary engineering approaches uncover a small set of genetic changes efficient for rapid xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 8(2), 2013.

KIM, S.R.; HA, S.J.; KONG, I.I.; JIN, Y.S. High expression of *XYL2* coding for xylitol dehydrogenase is necessary for efficient xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14(4), p. 336-343, 2012.

KOSTRZYNSKA, M.; SOPHER, C.R.; LEE, H. Mutational analysis of the role of the conserved lysine-270 in the *Pichia stipitis* xylose reductase. **FEMS microbiology letters**, v. 159(1), p. 107-112, 1998.

KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38(6), p. 776-783, 1993.

KRUCKEBERG, A.L. The hexose transporter Family of *Saccharomyces cerevisiae*, **Archives of microbiology**, v. 166(5), p. 283-292, 1996.

KUHN, A.; VAN ZYL, C.; VAN TONDER, A.; PRIOR, B. A. Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61(4), p. 1580-1585, 1995.

KUYPER, M.; TOIRKENS, M.J.; DIDERICH, J.A.; WINKLER, A.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS yeast research**, v. 5(10), p. 925-934, 2005a.

KUYPER, M.; HARTOG, M.M.; TOIRKENS, M.J.; ALMERING, M.J.; WINKLER, A.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. **FEMS yeast research**, v. 5(4-5), p. 399-409. 2005b.

KUYPER, M.; WINKLER, A.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. **FEMS yeast research**, v. 4(6), p. 655-664, 2004.

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

LALUCE, C.; SCHENBERG, A.C.; GALLARDO, J.C.; CORADELLO, L.F.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S.R. Advances and developments in strategies to improve strains of *Saccharomyces cerevisiae* and processes to obtain the lignocellulosic ethanol - a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166(8), p. 1908-1926, 2012.

LANGFORD, C.J.; GALLWITZ, D. Evidence for an intron-contained sequence required for the splicing of yeast RNA polymerase II transcripts. **Cell**, v. 33(2), p. 519-527, 1983.

LEE, W.J.; KIM, M.D.; RYU, Y.W.; BISSON, L.; SEO J. H. Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60(1-2), p.186-191, 2002.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.

LEMAIRE, K.; VAN DE VELDE, S.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J.M. Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell**, v. 16(2), p. 293-299, 2004.

LIANG, L.; ZHANG, J.; LIN, Z. Altering coenzyme specificity of *Pichia stipitis* xylose reductase by the semi-rational approach CASTing. **Microbial Cell Factories**, v. 6, p. 36, 2007

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A. et al. (Ed.). **Biotechnologia Industrial**. Editora Blucher, v. 3, p. 1-43, 2001.

LÖNN, A.; TRÄFF-BJERRE, K.L.; CORDERO OTERO, R.R.; VAN ZYL, W.H.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylose isomerase activity influences xylose fermentation with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing mutated *xylA* from *Thermus thermophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32(5), p. 567-573, 2003.

LOPES, M.L. Estudo do polimorfismo cromossômico em *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem PE-2) utilizada no processo industrial de produção de etanol. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, SP, 2000.

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(6), p. 1067-1078, 2009a.

MADHAVAN, A.; TAMALAMPUDI, S.; SRIVASTAVA, A.; FUKUDA, H.; BISARIA, V.S.; KONDO, A. Alcoholic fermentation of xylose and mixed sugars using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose utilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82(6), p. 1037-1047, 2009b.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 545, New York, 1982.

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

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K.; SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production by a recombinant flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain with a genome-integrated NADP<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75(11), p. 3818-3822, 2009b.

MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* requires high activity of xylose reductase and moderate xylulokinase activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106(3), p. 306-309, 2008.

MEINANDER, N.; BOELS, I.; HÄHN-HAGERDAL, B. Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolic engineering *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *XYL1* and *XYL2* from *Pichiastipitis* with and without overexpression of *TAL1*, **Bioresource Technology**, v. 68, p. 79-87, 1999.

METZGER, M.H.; HOLLENBERG, C.P. Isolation and characterization of the *Pichiastipitis* transketolase gene and expression in a xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae* transformant. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42(2-3), p. 319-325, 1994.

MILLAN, J.L.; FISHMAN, W.H. Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 32(1), p. 1-39, 1995.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31(3), p. 426-428, 1959.

MITCHELL, J.K.; FONZI, W.A.; WILKERSON, J.; OPHEIM, D.J. A particulate form of alkaline phosphatase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v. 657(2), p. 482-494, 1981.

MO, M.L.; PALSSON, B.O.; HERRGÅRD, M.J. Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. **BMC Systems Biology**, v. 3, p. 37, 2009.

MOES, C.J.; PRETORIUS, I.S.; VAN ZYL, W.H. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xyLA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 18(3), p. 269-274, 1996.

MOREIRA, J.R.; GOLDENBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, v. 27, p. 227-229, 1999.

NI, H.; LAPLAZA, J.M.; JEFFRIES T.W. Transposon Mutagenesis to Improve the Growth of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* on d-Xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2061-2066, 2007.

NISSEN, T.L.; ANDERLUND, M.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; KIELLAND-BRANDT, M.C. Expression of a cytoplasmic transhydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* results in formation of 2-oxoglutarate due to depletion of the NADPH pool. **Yeast**, v. 18(1), p. 19-32, 2001.

NOVELLO, F.; McLEAN, P. The Pentose Phosphate Pathway of Glucose Metabolism: Measurement of the Non-Oxidative Reactions of the Cycle. **Biochemical Journal**, v. 107, p. 775-791, 1968.

ÖHGREN, K.; BENGTTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. **Journal of Biotechnology**, v. 126(4), p. 488-498, 2006.

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

PARACHIN, N.S.; BERGDAHL, B.; VAN NIEL, E.W.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Kinetic modelling reveals current limitations in the production of ethanol from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 13(5), p. 508-517, 2011.

PEREZ-TORRADO, R.; PANADERO, J.; HERNANDEZ-LOPEZ, M.J.; PRIETO, J.A.; RANDEZ-GIL, F. Global expression studies in baker's yeast reveal target genes for the improvement of industrially-relevant traits: the cases of CAF16 and ORC2. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 56, 2010.

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

PETSCHACHER, B.; NIDETZKY B. Altering the coenzyme preference of xylose reductase to favor utilization of NADH enhances ethanol yield from xylose in a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 7(9), 2008.

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

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

PRÓALCOOL (1975), Decreto 76.593 de 14/11/1975. Disponível em <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1970-1979/decreto-76593-14-novembro-1975-425253-norma-pe.html>>. Acesso em 08/04/2014

PUPPIM DE OLIVEIRA, J.A. The policymaking process for creating competitive assets for the use of biomass energy: the Brazilian alcohol programme. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 6, p. 129-140, 2002.

QUEROL, A.; BOND, U. The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 293, p. 1-10, 2009.

RICHARD, P.; TOIVARI, M.H.; PENTTILÄ, M. The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190(1), p.39-43, 2000.

RISLER, J.K.; KENNY, A.E.; PALUMBO, R.J.; GAMACHE, E.R.; CURCIO, M.J. Host co-factors of the retrovirus-like transposon Tyl1. **Mobile DNA**, v. 3(1), p. 12, 2012.

RIZZI, M.; HARWART, K.; ERLEMANN, P.; BUI-THANH, N.A.; DELLWEG, H. Purification and properties of the NAD<sup>+</sup>-xylitol-dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67(1), p. 20-24, 1989a.

RIZZI, M.; HARTWART, K.; BUI THANH, N. A.; DELLWEG, H. A kinetic study of the NAD<sup>+</sup> xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. **Journal of Fermentation & Bioengineering**, v. 67(1), p. 25-30, 1989b.

RIZZI, M.; ERLEMANN, P.; BUI-THANH, N.A.; DELLWEG H. Xylose fermentation by yeasts: 4. Purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipites*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 148-154, 1988.

ROCA, C.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Metabolic engineering of ammonium assimilation in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69(8), p. 4732-4736, 2003.

RODRIGUEZ-PEÑA, J.M.; CID, V.J.; ARROYO, J.; NOMBELA, C. The *YGR194c (XKSI)* gene encodes the xylulokinase from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 162(1), p. 155-160, 1998.

RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B.; RÅDSTRÖM P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 5-11, 2010.

*SACCHAROMYCES GENOME DATABASE (SGD)*. Disponível em <<http://www.yeastgenome.org>>. Acesso em 08/04/2014

SALEH, A.A.; WATANABE, S.; ANNALURU, N.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Construction of various mutants of xylose metabolizing enzymes for efficient conversion of biomass to ethanol. **Nucleic Acids Symposium Series (Oxf)**, v. 50, p. 279-280, 2006.

SALOHEIMO, A.; RAUTA, J.; STASYK, O.V.; SIBIRNY, A.A.; PENTTILA, 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.

SALUSJÄRVI, L.; KANKAINEN, M.; SOLIYMANI, R.; PITKÄNEN, J.P.; PENTTILÄ, M.; RUOHONEN, L. Regulation of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 7, p. 18, 2008.

SALUSJÄRVI, L.; POUTANEN, M.; PITKÄNEN, J.P.; KOIVISTOINEN, H.; ARISTIDOU, A.; KALKKINEN, N.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Proteome analysis of recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 20(4), p. 295-314, 2003.

SANJUÁN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and Chemical Composition of Pith and Fibers from Mexican Sugarcane Bagasse. **Holz als Roh- und Werkstoff**, v. 59(6), p. 447-450, 2001.

SANTANGELO, G.M. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70(1), p. 253-282, 2006.

SARTHY, A.V.; MCCONAUGHY, B.L.; LOBO, Z.; SUNDSTROM, J.A.; FURLONG, C.E.; HALL, B.D. Expression of the *Escherichiacoli* xylose isomerase gene in *Saccharomycescerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53(9), p. 1996–2000, 1987.

SEDLAK, M.; HO, N.W. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transposting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* yeast. **Yeast**, v. 21, p. 671-684, 2004.

SENAC, T.; HAHN-HÄGERDAL, B. Intermediary metabolite concentrations in xylulose- and glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56(1), p. 120–126, 1990.

SENE, L.; FELIPE, M.G.; SILVA, S.S.; VITOLO, M. Preliminary kinetic characterization of xylose reductase and xylitol dehydrogenase extracted from *Candida guilliermondii* FTI 20037 cultivated in sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 91-93, p. 671-680, 2001.

SHALLOM, D.; SHALLOM, Y. Microbial hemicellulases. *Current Opinion Microbiology*, v.6(3), p. 219-228, 2003.

SHEN, Y.; CHEN, X.; PENG, B.; CHEN, L.; HOU, J.; BAO, X. An efficient xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained through adaptive evolution and its global transcription profile. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96(4), p. 1079-1091, 2012.

SHI, N.Q.; CRUZ, J.; SHERMAN, F.; JEFFRIES, T.W. SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*. **Yeast**, v. 19(14), p. 1203-1220, 2002.

SKOOG, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylose fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10(2), p. 66-80, 1988.

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

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; COSTA, B.; WOICIECHOWSKI, A.L.; DE CARVALHO, J.C.; MEDEIROS, A.B.P.; FRANCISCO, A.M.; BONOMI, L.J. Brazilian biofuel program: an overview. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 64, p. 897-904, 2005.

SONDEREGGER, M.; JEPPSSON, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; SAUER, U. Molecular basis for anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* on xylose, investigated by global gene expression and metabolic flux analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2307-2317, 2004.

SONDEREGGER, M.; SAUER, U. Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Anaerobic Growth on Xylose. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69(4), p. 1990-1998, 2003.

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

TAKAMIZAWA, K.; UCHIDA, S.; HATSU, M.; SUZUKI, T.; KAWAI, K. Development of a xylitol biosensor composed of xylitol dehydrogenase and diaphorase. **Canadian journal of microbiology**, v. 46(4), p. 350-357, 2000.

TOH-E, A.; NAKAMURA, H.; OSHIMA, Y. A gene controlling the synthesis of non-specific alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 428(1), p. 182-192, 1976.

TOIVARI, M.H.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Endogenous Xylose Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70(6), p. 3681-3686, 2004.

TOIVARI, M.H.; ARISTIDOU, A.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: importance of xylulokinase (XKS1) and oxygen availability. **Metabolic engineering**, v. 3(3), p. 236-249, 2001.

TRÄFF-BJERRE, K.L.; JEPSSON, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Endogenous NADPH-dependent aldose reductase activity influences product formation during xylose consumption in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 21(2), p. 141-150, 2004.

TRÄFF, K.L.; OTERO CORDERO, R.R.; VAN ZYL, W.H.; HAHN-HÄGERDAL, B. Deletion of the GRE3 aldose reductase gene and its influence on xylose metabolism in recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* expressing the xylA and XKS1 genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67(12), p. 5668-5674, 2001.

TULEVA, B.; VASILEVA-TONKOVA, E.; GALEBOVA, D. A specific alkaline phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* with protein phosphatase activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 161(1), p. 139-144, 1998.

UNICA, 2014 – União da Indústria da Cana-de-Açúcar. Disponível em <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em 08/04/2014

USHER, J.; BALDERAS-HERNANDEZ, V.; QUON, P.; GOLD, N.D.; MARTIN, V.J.; MAHADEVAN, R.; BAETZ, K. Chemical and Synthetic Genetic Array Analysis Identifies Genes that Suppress Xylose Utilization and Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **G3**, v. 1(4), p. 247-258, 2011.

VALDES, C. Ethanol demand driving the expansion of Brazil's sugar industry. **Sugar and Sweeteners Outlook**, v. 70, p. 31-18, 2007.

VAN DIJKEN, J.P.; BAUER, J.; BRAMBILLA, L.; DUBOC, P.; FRANCOIS, J.M.; GANCEDO, C.; GIUSEPPIN, M.L.; HEIJNEN, J.J.; HOARE, M.; LANGE, H.C.; MADDEN, E.A.; NIEDERBERGER, P.; NIELSEN, J.; PARROU, J.L.; PETIT, T.; PORRO, D.; REUSS, M.; VAN RIEL, N.; RIZZI, M.; STEENSMA, H.Y.; VERRIPS, C.T.; VINDELØV, J.; PRONK, J.T. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26(9-10), p. 706-714, 2000.

VAN HOOFF, V.; DE BROE, M.E. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 31(3), p. 197-293, 1994.

VAN VLEET, J.H.; JEFFRIES, T.W.; OLSSON, L. Deleting the par-nitrophenyl phosphatase (pNPPase), PHO13, in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* improves growth and ethanol production on D-xylose. **Metabolic Engineering**, v. 10(6), p. 360-369, 2008.

VERDUYN, C.; VAN KLEEF, R.; FRANK, J.; SCHREUDER, H.; VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Biochemical Journal**, v. 226(3), p. 669–677, 1985.

VERHO, R.; LONDESBOROUGH, J.; PENTTILÄ, M.; RICHARD, P. Engineering Redox Cofactor Regeneration for Improved Pentose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69(10), p. 5892-5897, 2003.

WALFRIDSSON, M.; ANDERLUND, M.; BAO, X.; HAHN-HÄGERDAL, B. Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* XYL1 and XYL2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilisation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48(2), p. 218-224, 1997.

WALFRIDSSON, M.; BAO, X.; ANDERLUND, M.; LILIUS, G.; BÜLOW, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62(12), p. 4648-4651, 1996.

WALFRIDSSON, M.; HALLBORN, J.; PENTTILÄ, M.; KERÄNEN, S.; HAHN-HÄGERDAL, 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.

WATANABE, S.; PACK, S.P.; SALEH, A.A.; ANNALURU, N.; KODAKI, T.; MAKINO, K. The positive effect of the decreased NADPH-preferring activity of xylose reductase from *Pichiastipitis* on ethanol production using xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 71(5), p. 1365-1369, 2007a.

WATANABE, S.; ABU SALEH, A.; PACK, S.P.; ANNALURU, N.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing protein-engineered NADH-preferring xylose reductase from *Pichiastipitis*. **Microbiology**, v. 153, p. 3044-3054, 2007b.

WATANABE, S.; SALEH, A.A.; PACK, S.P.; ANNALURU, 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(3), p. 316-319, 2007c.

WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Complete reversal of coenzyme specificity of xylitol dehydrogenase and increase of thermostability by the introduction of structural zinc. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280(11), p. 10340-10349, 2005.

WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17(12), p. 482-487, 1999.

YAMANAKA, K. Inhibition of D-xylose isomerase by pentitols and D-lyxose. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 131(2), p. 502-506, 1969.

YANG, V.W.; JEFFRIES, T.W. Regulation of phosphotransferases in glucose- and xylose-fermenting yeasts. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 63-65, p. 97-108, 1997.

YANG, V.W.; JEFFRIES, T.W. Purification and properties of xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 26(2), p. 197-206, 1990.

ZHANG, G.C.; LIU, J.J.; DING, W.T. Decreased xylitol formation during xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* due to overexpression of water-forming NADH oxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78(4), p. 1081-1086, 2012.