

Leonardo Gomes Kretzer

**CLONAGEM, EXPRESSÃO E ANÁLISE DE  
TRANSPORTADORES DE AÇÚCARES EM LINHAGENS  
RECOMBINANTES DE *Saccharomyces cerevisiae***

Trabalho de Conclusão de Curso  
submetido ao Centro de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do Grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Professor Dr. Boris Juan  
Carlos Ugarte Stambuk

Coorientadora: Ma. Marília Knychala

Florianópolis  
2017

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

Kretzer, Leonardo Gomes  
CLONAGEM, EXPRESSÃO E ANÁLISE DE TRANSPORTADORES DE  
AÇÚCARES EM LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Saccharomyces*  
*cerevisiae* / Leonardo Gomes Kretzer ; orientador, Boris  
Juan Carlos Ugarte Stambuk ; coorientadora, Marília  
Knychala . - Florianópolis, SC, 2017.  
64 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Biotecnologia de leveduras.  
3. Etanol de segunda geração. 4. Biocombustível. I. Stambuk  
, Boris Juan Carlos Ugarte. II. Knychala, Marília. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Ciências Biológicas. IV. Título.



Este trabalho é dedicado a todos aqueles que, de alguma forma, foram importantes para mim durante toda a graduação.

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

À minha namorada, Maria Eduarda de Andrade Borges, por seu carinho, paciência, lembretes, amor e dedicação.

Aos meus amigos da vida e da graduação, parceiros em todas as festas, bares, estudos e todo o resto que o ambiente universitário proporciona, que, sem dúvida, são muito importantes para todo o desenvolvimento como pessoa.

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

A todo o pessoal do laboratório que, junto comigo, vibrou com os bons resultados e afogou as mágoas com os experimentos que não queriam funcionar.

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

Um agradecimento mais do que especial à minha co-orientadora, amiga e conselheira, Marília Knychala, por toda sua dedicação em me ensinar as técnicas e macetes necessários para a vida laboratorial, por todos os ótimos conselhos para a vida e por sempre me desculpar quando os erros do IC eram grandes.

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



“Tudo que temos que decidir é o que fazer com  
tempo que nos é dado”.

(Gandalf, em “A Sociedade do Anel”)





## RESUMO

O etanol de 2ª geração (2G) é uma alternativa energética que diminui os impactos ambientais gerados pela utilização dos combustíveis fósseis. A fermentação da xilose, que é o segundo principal açúcar constituinte da biomassa lignocelulósica, é necessária para que se estabeleça uma produção industrial eficiente de etanol 2G. Entretanto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que é o organismo melhor adaptado para as condições industriais, não é capaz de utilizar esse, sendo necessária a utilização de uma cepa recombinante que possua as enzimas necessárias para a metabolização da xilose, como a xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilucinaase. O primeiro passo na via de metabolização é a internalização do açúcar, que se dá por meio de transportadores, que são proteínas integrais de membrana. Vários organismos da biodiversidade brasileira metabolizam a xilose de forma eficiente, sendo uma possível fonte de transportadores de xilose. Foram identificados, por análise de similaridade com sequências depositadas no banco de dados (NCBI), três possíveis transportadores deste açúcar: *FRS1* de *Spathaspora passalidarum*, e *SUT4* e *SUT6*, ambos de *Spathaspora arborariae*, todos apresentando similaridade com outros transportadores de xilose já conhecidos. Assim, esse trabalho teve como objetivo a construção de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* contendo esses transportadores de açúcares e posterior análise dos perfis de crescimento e fermentação das mesmas. Uma vez construídas as linhagens recombinantes (DLGK1-*SUT4*, DLGK1-*SUT6*, DLGK1-*FRS1* e DLGK1-GPD), foi analisado o perfil de crescimento das mesmas sobre diferentes fontes de carbono (maltose, glicose, xilose, frutose e galactose). Também foram realizados experimentos de fermentação em batelada, na presença de glicose, xilose ou em co-fermentação desses dois açúcares, simulando condições industriais. Tanto nos ensaios de crescimento quanto nos ensaios de fermentação foram mensurados o consumo dos açúcares, a produção de etanol e outros metabólitos da fermentação (glicerol e xilitol). Como resultado, obteve-se duas cepas (DLGK1-*SUT4* e DLGK1-*SUT6*) capazes de consumir glicose. A linhagem com o transportador *SUT4* também apresentou capacidade de consumir xilose, porém, o consumo foi baixo e a linhagem apresentou fenótipo de floculação, indicando uma condição de estresse. O baixo consumo de xilose pela cepa contendo o gene *SUT4* pode ser devido a esse transportador estar sendo removido da membrana plasmática através de endocitose mediada por ubiquitinação. A cepa contendo o gene *FRS1* não apresentou características fenotípicas que

indiquem que esse gene é um transportador de açúcar funcional em *S. cerevisiae*.

**Palavras-chave:** Álcool; 2G; etanol de segunda geração; *Spathaspora arborariae*; *Spathaspora passalidarum*; biotecnologia; fermentação; levedura; xilose.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Imagem esquemática ilustrando tanto a organização estrutural da biomassa lignocelulósica quanto a estrutura bioquímica da celulose (polímeros de glicose, azul) e hemicelulose (polímeros contendo glicose, xilose – verde, e arabinose – vermelho). As percentagens dos constituintes estão indicadas (valores aproximados)..... 23
- Figura 2:** Figura esquemática de uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* que possui a via para metabolização de xilose, iniciando com a internalização desse açúcar (através de um transportador), passando pela metabolização através das enzimas Xilose Redutase (XR), Xilitol Desidrogenase (XDH) e Xilucinase (XK), entrando na Via das Pentoses Fosfato (PPP) e posteriormente na glicólise, culminando com a produção de etanol a partir da via fermentativa. .... 25
- Figura 3:** Alinhamento das sequências das proteínas FRS1, SUT4 e SUT6. O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa IBIVU Server-PRALINE (<http://www.ibi.vu.nl/>). As posições dos 12 segmentos transmembrana estão destacadas em cinza. Os traços indicam realinhamentos para maximizar a similaridade entre as sequências. Os motivos PESPR estão destacados em azul. Os resíduos de lisina das porções N e C terminais estão destacados em vermelho. O motivo YOUNG está destacado em alaranjado. .... 40
- Figura 4:** Árvore filogenética do tipo máxima parcimônia, montada com o software MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/>). Para tal, utilizou-se o alinhamento de sequências no formato FASTA, realizado pelo programa ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). As sequências contidas na árvore são dos três genes estudados no presente trabalho, de genes presentes no banco de dados que possuem maior similaridade aos genes selecionados e com os principais transportadores de xilose já caracterizados..... 41
- Figura 5:** Em (A) e (B) estão ilustrados os plasmídeos p426-GPD (<https://www.addgene.org/>) e pPGK (KANG et al., 1990), respectivamente, que são os vetores de clonagem que foram utilizados no presente trabalho. No plasmídeo pPGK foi inserido o gene FRS1, enquanto que no p426-GPD foram inseridos os genes SUT4 e SUT6. . 42
- Figura 6:** Representação dos genes que foram analisados no presente trabalho, com seus respectivos tamanhos..... 42

**Figura 7:** Confirmação da inserção dos genes SUT4 e SUT6 nos plasmídeos p426-GPD. Para tal, se fez o tratamento dos plasmídeos com as enzimas de restrição XhoI e BamHI. .... 43

**Figura 8:** Imagens das eletroforeses das PCRs de confirmação da inserção de cada um dos genes – (A) SUT4, (B) SUT6 e (C) FRS1 - em seus respectivos plasmídeos e, logo a baixo estão ilustradas as regiões amplificadas por PCR, juntamente com o tamanho esperado de cada um dos amplicons..... 44

**Figura 9:** Ensaio de crescimento em meio SC, sem uracila, contendo maltose, das linhagens GPD (controle), e as linhagens contendo FRS1, SUT4 e SUT6. Em A, está representado o crescimento de cada uma das linhagens, sendo que nesses ensaios a DO (600 nm) inicial foi de 0,1. Em B e C, estão representadas as curvas de consumo de maltose e produção de etanol, respectivamente. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos..... 45

**Figura 10:** Ensaio de crescimento em meio SC, sem uracila, contendo frutose, das linhagens GPD (controle), e as linhagens com FRS1, SUT4 e SUT6. Em A, está representado o crescimento de cada uma das linhagens, sendo que nesses ensaios a DO (600 nm) inicial foi de 0,1. Em B, estão representadas as curvas de consumo de frutose. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos..... 46

**Figura 11:** Ensaio de crescimento em meio SC, sem uracila, contendo galactose, das linhagens GPD (controle), e as linhagens com FRS1, SUT4 e SUT6. Em A, está representado o crescimento de cada uma das linhagens, sendo que nesses ensaios a DO (600 nm) inicial foi de 0,1. Em B, estão representadas as curvas de consumo de galactose. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos. .... 46

**Figura 12:** Ensaio de crescimento em meio SC, sem uracila, contendo glicose, das linhagens GPD (controle), e as linhagens com FRS1, SUT4 e SUT6. Em A, está representado o crescimento de cada uma das linhagens, sendo que nesses ensaios a DO (600 nm) inicial foi de 0,1. Em B e C, estão representadas as curvas de consumo de glicose e produção de etanol, respectivamente. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos..... 47

**Figura 13:** Ensaio de crescimento em meio SC, sem uracila, contendo xilose, das linhagens GPD (controle), e as linhagens com FRS1, SUT4 e SUT6. Em A, está representado o crescimento de cada uma das linhagens,

sendo que nesses ensaios a DO (600 nm) inicial foi de 0,1. Em B, estão representadas as curvas de consumo de xilose. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos. .... 48

**Figura 14:** Ensaio de fermentação em meio SC, sem uracila, contendo (A) glicose, (B) xilose e (C) glicose mais xilose, da linhagem GPD (controle). Em cada uma das partes da figura (A, B e C), estão representadas as curvas de consumo do(s) açúcar(es) e produção de etanol. Todas as concentrações estão em g/L. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos. .... 50

**Figura 15:** Ensaio de fermentação em meio SC, sem uracila, contendo (A) glicose, (B) xilose e (C) glicose mais xilose, da linhagem com FRS1. Em cada uma das partes da figura (A, B e C), estão representadas as curvas de consumo do(s) açúcar(es) e produção de etanol. Todas as concentrações estão em g/L. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos. .... 51

**Figura 16:** Ensaio de fermentação em meio SC, sem uracila, contendo (A) glicose, (B) xilose e (C) glicose e xilose, da linhagem com SUT4. Em cada uma das partes da figura (A, B e C), estão representadas as curvas de consumo do(s) açúcar(es) e produção de etanol. Todas as concentrações estão em g/L. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos. .... 52

**Figura 17:** Ensaio de fermentação em meio SC, sem uracila, contendo (A) glicose, (B) xilose e (C) glicose e xilose, da linhagem com SUT6. Em cada uma das partes da figura (A, B e C), estão representadas as curvas de consumo do(s) açúcar(es) e produção de etanol. Todas as concentrações estão em g/L. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos. .... 53



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Linhagens de leveduras utilizadas no presente trabalho.....	30
<b>Tabela 2:</b> Iniciadores utilizados para clonagem neste trabalho. ....	31
<b>Tabela 3:</b> Plasmídeos utilizados para clonagem dos genes.....	31
<b>Tabela 4:</b> Iniciadores utilizados para confirmação da correta construção dos plasmídeos.....	33





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância

DO – Densidade óptica

HPLC – *High-performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alto desempenho)

2G – Etanol de segunda geração

PPP – Via das pentoses fosfato

XR – Xilose redutase

XDH – Xilitol desidrogenase

XK – Xilucina

NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina (em estado reduzido)

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (em estado reduzido)

NAD<sup>+</sup> – Dinucleótido de nicotinamida e adenina (em estado oxidado)

NADP<sup>+</sup> – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (em estado oxidado)

MFS – *Major Facilitator Superfamily*

BLASTp – Basic Local Alignment Search Tool for proteins (ferramenta de busca e alinhamento básico local, para proteínas)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

Meio LB – Meio Lúria-Bertani

Meio SC – Meio sintético

Meio YP – Meio rico



## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>21</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>29</b>
3.1 Seleção dos genes.....	29
3.2 Extração dos DNAs genômicos.....	29
3.3 Amplificação de genes por PCR.....	30
3.4 Construção dos plasmídeos recombinantes.....	32
3.5 Linhagens recombinantes .....	33
3.6 Meios de cultura e condições de crescimento.....	34
3.7 Transformação de bactérias.....	34
3.8 Extração de plasmídeos.....	35
3.9 Transformação de leveduras.....	35
3.10 Ensaio de crescimento e fermentação.....	36
3.11 Determinação do consumo de açúcares e produção de etanol.....	36
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>39</b>
4.1 Seleção e clonagem dos genes.....	39
4.2 Crescimento das linhagens recombinantes.....	44
4.3 Ensaio de fermentação.....	49
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>55</b>
<b>6. Considerações finais.....</b>	<b>57</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>59</b>



## 1. Introdução

Os combustíveis fósseis vêm sendo amplamente utilizados desde a revolução industrial. Apesar de possuir uma elevada eficiência energética, esses combustíveis apresentam várias desvantagens. Dentre essas desvantagens, destacam-se: a característica de serem não-renováveis, prejudicarem o ambiente (desde sua extração até sua utilização como fonte energética), e sua extração/produção ser restrita a alguns países produtores, fazendo com que esses sejam os responsáveis pelo abastecimento de todo o globo (LOVINS *et al.*, 2005). O pequeno número de países responsáveis pela maior parte da produção mundial de petróleo, em conjunto a questões políticas/diplomáticas levou à crise do petróleo da década de 70, em que os preços por barril se elevaram em quatro vezes, provocando uma grave crise econômica (LOVINS *et al.*, 2005).

Dado o grande interesse econômico e dependência energética da nossa sociedade sobre o petróleo, é de elevado o interesse de que se desenvolva outras formas energéticas que supram as necessidades da sociedade. Assim, durante a década de 70, em virtude do programa PROALCOOL, os investimentos nacionais sobre o etanol combustível aumentaram grandemente, fazendo com que nosso país se tornasse hoje o segundo maior produtor mundial desse combustível, atingindo, em 2014, 28,6 bilhões de litros produzidos (BRASIL, 2015).

Toda a produção de etanol brasileira se dá a partir da cana-de-açúcar, um cultivar completamente adaptado às condições climáticas tropicais que vem sendo cultivado no território nacional desde o período colonial. Desde que os investimentos sobre o álcool aumentaram, muitos aspectos da produção desse combustível foram melhorados (MARTINELLI & FILOSO, 2008).

A produção de etanol em larga escala demanda uma grande área de plantio de cana-de-açúcar, gerando uma quantidade imensa de resíduos de produção, no caso, palha e bagaço. Cada tonelada de cana de açúcar produzida gera, em média, 280 Kg de bagaço e 234 Kg de palha e pontas (NOGUEIRA & GARCIA, 2014). A maior parte desses resíduos é queimada para a produção de energia elétrica nas próprias usinas (CORTEZ, 2008; FERNANDES *et al.*, 2012; SOUZA, 2012).

Essa biomassa vegetal (biomassa lignocelulósica) é de grande interesse energético pois, através dela, se pode aumentar em até 50% a produção de etanol brasileiro a partir da cana de açúcar, sem ser

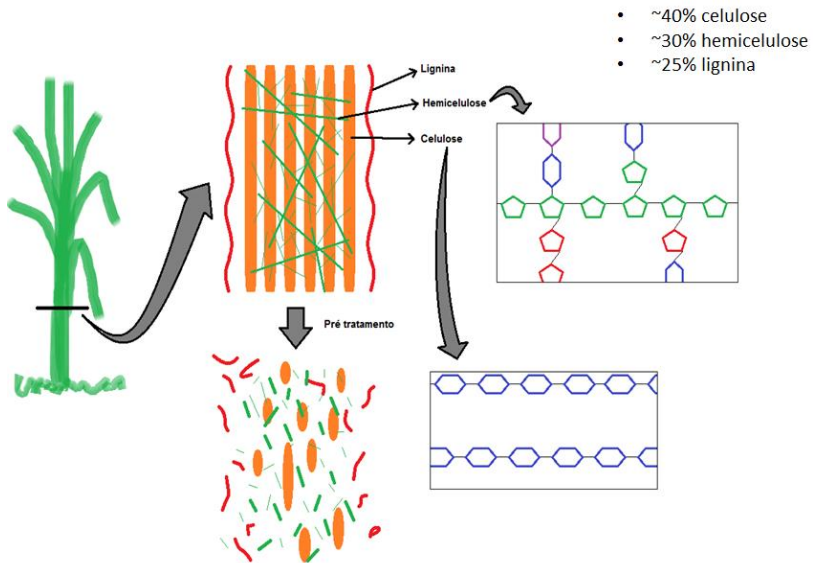
necessário aumentar a área de plantio de cana-de-açúcar. Isso é possível graças ao chamado etanol de segunda geração - 2G (PESSOA Jr. *et al.*, 2005; STAMBUK *et al.*, 2008; MILANEZ *et al.*, 2012).

A utilização de biomassa lignocelulósica como substrato para a fermentação é possível graças à composição bioquímica da biomassa lignocelulósica (Figura 1), que é composta por celulose, hemicelulose e lignina (PEREIRA Jr.; COUTO; ANNA, 2008). A lignina é um polímero heterogêneo de álcoois aromáticos (GUERRIERO *et al.*, 2015) e pode ser queimada para gerar calor e eletricidade para a indústria (HAHN-HÅGERDAL *et al.*, 2006). Já a celulose, que é o maior componente dessa biomassa, é um polissacarídeo complexo formado exclusivamente por monômeros de glicose, unidos por ligações  $\beta(1-4)$ . Este monossacarídeo, por sua vez, é de fácil utilização pela grande maioria dos organismos conhecidos, podendo ser facilmente convertido a etanol pelas leveduras. A hemicelulose é o segundo maior componente dessa biomassa, e é um polímero muito mais heterogêneo, contendo vários tipos de açúcares, sendo a xilose, uma pentose, o mais abundante deles e o segundo açúcar mais abundante no mundo (ficando atrás apenas da glicose). Assim sendo, este açúcar é um dos maiores focos de estudo para a produção de etanol 2G (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005; JEFFRIES, 2006; GÍRIO *et al.*, 2010; SARKAR *et al.*, 2012).

Apesar de serem abundantes, os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica não estão prontamente disponíveis para serem utilizados pelos organismos. Antes que possa ser utilizado pela indústria, a biomassa precisa passar por um pré-tratamento químico, físico, enzimático ou um conjunto desses fatores, de forma que os açúcares que os compõem fiquem disponíveis (HSU, 1996).

As leveduras são fungos unicelulares muito diversos e que vivem em diversos ambientes, como nas cascas de frutas, no solo, nos intestinos de animais, entre outros. De todas as leveduras existentes no mundo, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* é a mais conhecida e amplamente utilizada, sendo empregada a mais de dois mil anos em vários processos alimentícios, como produção de pães, cervejas e vinhos, por exemplo. Essa mesma levedura é utilizada para a produção de etanol nas indústrias (TAMANG & FLEET, 2009). Elas utilizam os açúcares (principalmente hexoses) presentes em grandes quantidades no caldo da cana como substrato energético, fazendo isso em um processo biológico chamado fermentação, que libera como produto tanto gás carbônico quanto etanol (VAN MARIS *et al.*, 2006).

**Figura 1:** Imagem esquemática ilustrando tanto a organização estrutural da biomassa lignocelulósica quanto a estrutura bioquímica da celulose (polímeros de glicose, azul) e hemicelulose (polímeros contendo glicose, xilose – verde, e arabinose – vermelho). As porcentagens dos constituintes estão indicadas (valores aproximados).



Fonte: Este trabalho

*S. cerevisiae* é utilizada pela indústria do álcool por diversos motivos, dentre eles está sua robustez frente às condições industriais, como resistir bem às altas concentrações de etanol, aos baixos níveis de pH, alta pressão osmótica, etc. Além disso, essa espécie também é utilizada por ser uma fermentadora preferencial, utilizando a via fermentativa mesmo na presença de oxigênio (LANDRY *et al.*, 2006; MERICO *et al.*, 2007). Porém, há um problema: *S. cerevisiae* não consegue, naturalmente, metabolizar xilose uma vez que não expressa as enzimas necessárias para metabolização desta e de outras pentoses (BATT *et al.*, 1986; PITKÄNEN *et al.*, 2003).

Na tentativa de melhorar a capacidade fermentativa de pentoses por *S. cerevisiae*, tem-se realizado modificações genéticas específicas que alteram os níveis de expressão de certos genes ou então que introduzem novos genes no organismo alvo. Essa metodologia é chamada de engenharia metabólica (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

As principais estratégias dessas alterações genéticas (Figura 2) visam possibilitar que a xilulose-5-fosfato seja produzida pela célula, permitindo com que a mesma entre na via das pentoses fosfato (PPP). Para tal, tem se desenvolvido linhagens que possuam as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), além de possuir a sobreexpressão do gene que codifica para a enzima xilucinaase (XK), responsáveis pela metabolização inicial da xilose (JEFFRIES, 2006). No entanto, pode ocorrer desbalanço redox causado pela atividade das próprias enzimas responsáveis pela metabolização inicial da xilose, em que a XR possui o NADPH como sendo o principal co-substrato enquanto a XDH utiliza o NAD<sup>+</sup>, dessa forma, causa um desequilíbrio de co-substratos que é prejudicial à célula (JEFFRIES, 2006; VAN VLEET & JEFFRIES, 2008). Finalmente, outras estratégias visam aumentar a quantidade de xilose que é internalizada pela célula, através da identificação e clonagem de proteínas específicas chamadas transportadores (HECTOR *et al.*, 2008).

Os transportadores ou permeases são proteínas integrais de membrana, que possuem doze domínios transmembrana em  $\alpha$ -hélice hidrofóbicos, pertencentes à família de transportadores chamada *Major Facilitator Superfamily* (MFS), que atuam levando o açúcar a favor do gradiente de concentração (difusão facilitada), ou por meio de um transporte ativo, utilizando o co-transporte açúcar-próton (HENDERSON, 1993; WEUSTHUIS *et al.*, 1994; HORÁK, 1997; STAMBUK *et al.*, 2008). A grande maioria dos transportadores possui sequências conservadas e específicas de resíduos de aminoácidos, chamados motivos. Dentre os diversos motivos, o PESPR é presente em praticamente todos os transportadores de açúcares (HENDERSON & MAIDEN, 1990).

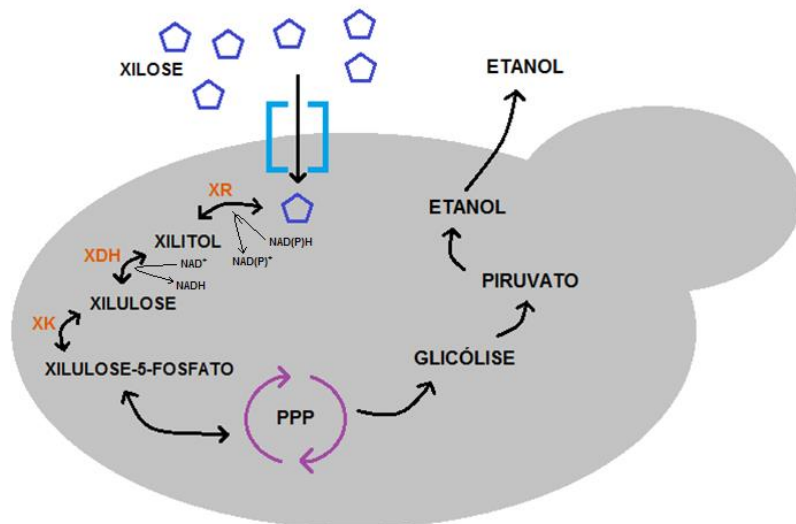
A quantidade de xilose que adentra a célula permanece sendo o passo limitante para a produção de etanol 2G de forma eficiente, pois todos os transportadores já estudados que possuem atividade sobre esta fonte de carbono são ineficientes ou inespecíficos (DU *et al.*, 2010; RUNQUIST; HAHN-HAGERDAL; RADSTROM, 2010; FERREIRA *et al.*, 2013; YOUNG *et al.*, 2014).

*S. cerevisiae* não possui transportadores específicos para xilose (LEE *et al.*, 2002; SUBTIL & BOLES, 2012), transportando essa pentose devido à ação inespecífica de diversos transportadores de hexoses (*HXT1-HXT17* e *GAL2*) que têm uma especificidade maior a glicose à xilose (GONÇALVES *et al.*, 2014). Porém, são várias as espécies de fungos que se utilizam da biomassa lignocelulósica como substrato para crescimento e nutrição. Sendo assim, muitos pesquisadores têm buscado nesses



organismos alguns transportadores que possuam grande afinidade por xilose, porém, nenhum dos transportadores encontrados se mostrou muito eficiente para o transporte dessa pentose (WEIERSTALL; HOLLENBERG; BOLES, 1999; KATAHIRA *et al.*, 2008; LEANDRO; SPENCER-MARTINS; GONCALVES, *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2013; RUNQUIST; HAHN-HAGERDAL; RADSTROM, 2010; YOUNG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015), de forma que ainda é necessário encontrar um transportador que seja específico para xilose e que possua alta eficiência de transporte.

**Figura 2:** Figura esquemática de uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* que possui a via para metabolização de xilose, iniciando com a internalização desse açúcar (através de um transportador), passando pela metabolização através das enzimas Xilose Redutase (XR), Xilitol Desidrogenase (XDH) e Xilucinaze (XK), entrando na Via das Pentoses Fosfato (PPP) e posteriormente na glicólise, culminando com a produção de etanol a partir da via fermentativa.



Fonte: Este trabalho

Recentemente, duas novas espécies de leveduras capazes de utilizar xilose foram isoladas, *Spathaspora passalidarum* e *Spathaspora arborariae*. A primeira foi isolada de intestinos de besouros que se alimentam de madeira (NGUYEN *et al.*, 2006), enquanto a segunda foi

isolada de madeira em decomposição (CADETE *et al.*, 2009). Ambas as espécies pertencem à biodiversidade brasileira e apresentaram capacidade de produzir etanol a partir de xilose (CADETE *et al.*, 2012, 2013; DA CUNHA-PEREIRA *et al.*, 2011; NGUYEN *et al.*, 2006). Além disso, ambas as espécies tiveram seus genomas sequenciados (LOBO *et al.*, 2014; WOHLBACH *et al.*, 2011) e alguns de seus genes apresentaram grande similaridade com transportadores de xilose. Assim sendo, é possível que alguns deles codifiquem para possíveis transportadores eficientes de xilose, o que pode melhorar a produção de etanol 2G.

## 2. Objetivos

**2.1 Objetivo geral:** Melhorar a eficiência da fermentação de xilose e produção de etanol de segunda geração através da construção de cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* que possuam transportadores de açúcares oriundos de leveduras da biodiversidade brasileira.

### 2.2 Objetivos específicos:

-Construir plasmídeos contendo transportadores de açúcares das leveduras *S. passalidarum* e *S. arborariae*, clonando-os em *Escherichia coli*, e expressá-los em *S. cerevisiae* recombinante sem transportadores de hexoses (*hxt*-null), que expressa os genes de metabolização da xilose;

-Analisar o perfil de crescimento e fermentação de açúcares pelas leveduras *S. cerevisiae* recombinantes contendo diferentes transportadores.



### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Seleção dos genes

Após os genomas das espécies *S. arborariae* e *S. passalidarum* terem sido sequenciados (LOBO *et al.*, 2014; WOHLBACH *et al.*, 2011), foram identificados genes que possivelmente codificam para transportadores de açúcares. Assim, foi feita uma busca no banco de dados do site NCBI, através da ferramenta BLASTp (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), procurando-se no genoma dessas duas leveduras genes com homologia a transportadores de xilose já conhecidos. A partir daí, 3 genes foram selecionados (denominados *SUT4*, *SUT6* e *FRS1*), sob o critério de pertencerem a superfamília MFS. Análises adicionais utilizando ferramentas de bioinformática como TMpred ([http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)) foram utilizadas para identificar a presença dos 12 segmentos transmembrana, presente em todos os transportadores de açúcares.

Além disso, foi utilizado o software ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para fazer o alinhamento das sequências, utilizando sequências no formato FASTA. O software MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/>), foi utilizado para fazer uma árvore filogenética, do tipo “máxima parcimônia”. Para tal, utilizou-se o alinhamento dos genes selecionados em conjunto com genes presentes no banco de dados que possuem maior similaridade aos genes selecionados e com os principais transportadores de xilose já caracterizados. Com isso buscou-se agrupar os transportadores selecionados de acordo com suas similaridades, e assim nomear adequadamente cada um dos genes. Em seguida, se desenhou iniciadores para amplificação desses três genes através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (ou PCR, *Polymerase Chain Reaction*).

#### 3.2 Extração dos DNAs genômicos

As extrações dos DNAs genômicos das linhagens UFMG-HMD-16.2, de *S. passalidarum* e UFMG-HM19.1A<sup>T</sup>, de *S. arborariae* (Tabela 1), foram realizadas com o kit da *ZIMO RESEARCH* (YeaStar™ Genomic DNA Kit). As extrações foram armazenadas a -20 °C.

**Tabela 1:** Linhagens de leveduras utilizadas no presente trabalho.

<b>Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>:</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Referência</b>
DLG-K1	<i>MATa hxt1Δ::HIS::hxt4Δ hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6 hxt5::LEU2 hxt7::HIS3 gal2Δ ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC2 AUR1::pAUR-KKXDHXR</i>	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2014
DLG-GPD	DLG-K1 + p426-GPD	Este trabalho
DLG-SUT4	DLG-K1 + p426-GPD-SUT4	Este trabalho
DLG-SUT6	DLG-K1 + p426-GPD-SUT6	Este trabalho
DLG-FRS1	DLG-K1 + pPGK-FRS1	Este trabalho
<b>Linhagens de <i>Spathaspora</i>:</b>	<b>Descrição</b>	<b>Referência</b>
<i>S. passalidarum</i> UFMG-HMD-16.2	Isolada de madeira em decomposição; RR, Brasil	CADETE <i>et al.</i> , 2012
<i>S. arborariae</i> UFMG-HM19.1A <sup>T</sup>	Isolada de madeira em decomposição; MG, Brasil	CADETE <i>et al.</i> , 2009

Fonte: Este trabalho

### 3.3 Amplificação de genes por PCR

As linhagens UFMG-HMD-16.2, de *S. passalidarum* (CADETE *et al.*, 2012), e UFMG-HM19.1A<sup>T</sup>, de *S. arborariae* (CADETE *et al.*, 2009), são as linhagens das quais o DNA genômico foram obtidos. A partir dos DNAs genômicos, os genes de interesse foram amplificados por PCR utilizando-se iniciadores sintetizados comercialmente, listados na Tabela 2.

Para o gene *SUT4*, foi utilizado o iniciador pPGK-T2-F e o p426-SUT2-R, enquanto para o gene *SUT6*, se utilizou o iniciador pPGK-T6-F e o p426-SUT6-R, em ambos os casos, os iniciadores possuem regiões de complementariedade com seus respectivos genes e também possuem sítios de restrição para as enzimas *BamHI* (iniciadores *forward*) e *XhoI* (iniciadores *reverse*), usados para a clonagem nos vetores p426-GPD (Tabela 3). Já para o gene *FRS1*, foram utilizados os iniciadores pPGK\_FRS\_F e tPGK\_FRS\_R, que anelam nas regiões inicial e final do

gene, respectivamente, e, ao mesmo tempo, possuem regiões que anelam nas regiões promotoras e terminadoras do vetor pPGK (Tabela 3). Foi utilizada a enzima de alta eficiência *Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)*. Se utilizou eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídeo para visualização, sob luz UV, dos fragmentos amplificados.

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados para clonagem neste trabalho.

<b>Iniciadores para clonagem:</b>	<b>Sequência (5' – 3')<sup>a</sup></b>	<b>Enzima de restrição</b>
pPGK-T2-F	<b>AGATCGGAATTCAAGCTTGGATCCATG</b> <b>CACGGAGGTTTCAGATAGTAA</b>	BamHI
p426-SUT2-R	<b>GCCCTCGAGGTCGACCCCGGGGGCTT</b> <b>AATCAGCATCAGCAACCTTTTC</b>	XhoI
pPGK-T6-F	<b>AGATCGGAATTCAAGCTTGGATCCATG</b> <b>TTCAAATTCCTAGAGCAAATA</b>	BamHI
p426-SUT6-R	<b>GCGCTCGAGGTCGACCCCGGGGGCTT</b> <b>ACTTTTGTTTTTTCTCTTGTTCTTG</b>	XhoI
pPGK_FRS_F	<b>TCGGAATTCAAGCTTGGATCCATGTCAG</b> <b>GTACAATTAGCCCAAC</b>	
tPGK_FRS_R	<b>CACCACCAGTAGAGACATGGGCTATTTA</b> <b>GTAAAAATCTCTTCAT</b>	

<sup>a</sup>Nas sequências dos iniciadores, estão destacados em negrito os sítios das enzimas de restrição utilizadas, sublinhado, estão as regiões em que os iniciadores se anelam nos respectivos genes e, em itálico, estão as regiões em que os iniciadores se anelam nos plasmídeos.

Fonte: Este trabalho

**Tabela 3:** Plasmídeos utilizados para clonagem dos genes.

<b>Gene(s) clonados</b>	<b>Plasmídeos</b>	<b>Característica</b>	<b>Referência</b>
<i>FRS1</i>	pPGK	<i>URA3</i> PGK1p-PGK1t	KANG <i>et al.</i> , 1990
<i>SUT4</i> e <i>SUT6</i>	P426-GPD	<i>URA3</i> GPDp-CYCt	ATCC <sup>®</sup> 87361TM

Fonte: Este trabalho

### 3.4 Construção dos plasmídeos recombinantes

Os fragmentos dos genes (*SUT4* e *SUT6*) amplificados por PCR e os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI* pela incubação em banho-maria a 37°C por um período de 4 horas. Em seguida, cada um dos fragmentos amplificados, juntamente com os plasmídeos p426-GPD pré-tratados, foram incubados a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) por 10 min, na presença de T4 DNA ligase (New England Biolabs). Após a incubação, o produto da ligação foi transformado em *E. coli* DH5 $\alpha$ , que possui alta suscetibilidade para transformação e clonagem, apresentando o seguinte genótipo: F'/*endA1hsdR17* (rK-mK+) *glnV44 thi-1 recA1 gyrA* (NaIr) *relA1* $\Delta$  (*lacZYA-argF*) U169 *deoR*  $\Phi$ 80*dlac*  $\Delta$  (*LacZ*) M15 (MESELSON & YUAN, 1968).

Dado que o gene *FRS1* foi amplificado com iniciadores contendo regiões idênticas ao promotor e terminador existentes no plasmídeo pPGK (Tabela 2), o processo de inserção do gene no plasmídeo se deu através do processo de recombinação por *Gibson Assembly* (GIBSON *et al.*, 2008). Nesse processo, o gene é construído contendo regiões idênticas ao final da região promotora e inicial da região terminadora do plasmídeo, permitindo que o gene fosse inserido no plasmídeo em uma reação de PCR contendo exonuclease - *T5 exonuclease* (*Epicentre*), DNA polimerase - *Phusion® High Fidelity DNA Polymerase* (*Thermo Scientific*) e DNA ligase - *T4 DNA ligase* (*New England Biolabs*). A reação de PCR ocorre na presença do plasmídeo (previamente hidrolisado na região onde o gene será inserido), então a T5 exonuclease degrada as regiões 5' das moléculas de DNA lineares, permitindo que ocorra o pareamento entre as regiões do gene que são idênticas às do plasmídeo. Em seguida, a DNA polimerase sintetiza novamente as regiões que foram degradadas pela T5 exonuclease e a DNA ligase promove a ligação entre as fitas, obtendo-se então um plasmídeo contendo o gene de interesse.

Para confirmação da correta inserção dos genes em seus respectivos plasmídeos, foram realizadas PCRs de confirmação dos mesmos. Para o gene *SUT4*, utilizou-se os iniciadores p426-SUT2-R, que anela no final do gene, e o GPD-F, que anela no início do promotor do plasmídeo p426-GPD. Para o gene *SUT6*, utilizou-se o iniciador p426-SUT6-R, que anela no final do gene, e o GPD-F, que anela no início do promotor do plasmídeo p426-GPD. Para o gene *FRS1*, utilizou-se os



iniciadores tPGK\_FRS\_R, que anela no final do gene, e o PGKpseq F, que anela no final do promotor do plasmídeo pPGK (Tabela 4).

**Tabela 4:** Iniciadores utilizados para confirmação da correta construção dos plasmídeos.

Iniciadores para confirmação:	Sequência (5' – 3') <sup>a</sup>
p426-SUT2-R	<u>GCCCTCGAGGTCGACCCGGGGGCTTAATCAG</u> <u>CATCAGCAACCTTTTC</u>
GPD-F	<u>GGTACCGAGCTCCGGCCGTCATTATCA</u>
p426-SUT6-R	<u>GCGCTCGAGGTCGACCCGGGGGCTTACTTTT</u> <u>GTTTTTCTCTTGTCTTG</u>
tPGK_FRS_R	<u>CACCACCAGTAGAGACATGGGCTATTTAGTTA</u> <u>AAAATCTCTTCAT</u>
PGKpseq F	<u>CAGATCATCAAGGAAGTAATTATCT</u>

<sup>a</sup>Nas sequências dos iniciadores, estão sublinhadas as regiões em que os iniciadores se anelam nos respectivos genes e plasmídeos.

Fonte: Este trabalho

### 3.5 Linhagens recombinantes

A linhagem de *S. cerevisiae* DLG-K1 (Tabela 1) foi a plataforma para o estudo dos transportadores, pois a mesma apresenta deleção de todos os genes que codificam para os transportadores *HXT*, do *HXT1* ao *HXT7*, e *GAL2* (*hxt*-null), sendo capazes de crescer apenas em meios que contêm maltose como fonte de carbono. Ela também não possui a capacidade de crescer em meios sem uracila, pois não possuem o gene *URA3*. Além disso, essa linhagem possui integrado em seu genoma o plasmídeo pAUR-XKXDHXR, que lhe garante resistência ao antibiótico aureobasidina A e ainda lhe permite sobre-expressar as enzimas responsáveis pela metabolização da xilose: xilose redutase, xilitol desidrogenase, e xilucinaase (GONÇALVES *et al.*, 2014).

Foram utilizados, para clonagem em bactéria e expressão em levedura, os plasmídeos pPGK (KANG *et al.*, 1990), para o gene *FRS1* e p426-GPD, para os genes *SUT4* e *SUT6*. Ambos possuem o gene *URA3*, para seleção em leveduras, e o gene para resistência à ampicilina (*AMP<sup>r</sup>*), para seleção em bactérias. O pPGK possui o promotor e o terminador constitutivo da enzima fosfoglicerato-cinase, enquanto o p426-GPD possui o promotor constitutivo da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e terminador constitutivo do citocromo C.

### 3.6 Meios de cultura e condições de crescimento

O cultivo da linhagem DH5 $\alpha$ , de *E. coli*, se deu em meio LB (Luria-Bertani), que é composto de 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl, com adição de 100 mg/mL de Ampicilina quando necessário. O pH foi ajustado para 7,0 utilizando-se NaOH. Quando necessário o cultivo em meio sólido, se utilizou o mesmo meio, porém, com adição de 20 g/L de bacto-ágar. Tanto nos meios líquidos quanto nos meios sólidos, os crescimentos foram realizados em estufas com temperatura de 37°C, porém, em meio líquido, esse crescimento foi sob agitação de 160 rpm.

O cultivo da linhagem DLG-K1, de *S. cerevisiae*, foi em meio YPM, que contém 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de maltose. Para a preparação de meios sólidos, foi adicionado 20 g/L de bacto-ágar ao meio de cultura. Quando necessário, foi adicionado 0,5 mg/L de Aureobasidina A ao meio.

O cultivo das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* se deu em meio sintético (SC), com 6,7 g/L de bases nitrogenadas sem aminoácidos, 1,92 g/L de suplemento de bases nitrogenadas e aminoácidos sem uracila e 20 g/L de cada um dos açúcares a serem analisados (glicose, maltose, xilose, frutose e galactose). Os meios para o crescimento das leveduras tiveram seus pH ajustados para 5,0 utilizando-se HCl. Tanto nos meios líquidos quanto nos meios sólidos, os crescimentos das leveduras foram realizados em estufas com temperatura de 28°C, porém, em meio líquido, esse crescimento foi sob agitação de 160 rpm.

### 3.7 Transformação de bactérias

Para a transformação da linhagem DH5 $\alpha$  foi utilizado o método de cloreto de cálcio e choque térmico (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). As bactérias tratadas com cloreto de cálcio foram retiradas do ultracongelador a -80°C e incubadas em gelo por 10 minutos para descongelamento. Foram adicionados à solução celular 5  $\mu$ L do DNA desejado. Um controle negativo foi realizado, o qual não possuía DNA. Após 5 minutos, as bactérias foram aquecidas a uma temperatura de 42 °C (por 2 minutos) e em seguida, resfriadas no gelo por mais 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500  $\mu$ L de meio LB, para que cresçam durante 1 hora sob temperatura de 37°C. Em seguida, as células foram transferidas para meio sólido contendo ampicilina.

### 3.8 Extração de plasmídeos

Para a extração dos plasmídeos de bactérias, foi realizado o método “miniprep” (GREEN & SAMBROOK, 2012), para o qual foi inoculado, em meio LB com ampicilina, a bactéria contendo o plasmídeo desejado e crescida, a 37°C e sob agitação de 160 rpm, durante toda a noite (*overnight*). A cultura foi transferida para microtubos e centrifugada à temperatura ambiente, durante 4 minutos a 6000 g. Em seguida, a solução foi ressuspensa em 100 µL de solução GTE (50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) e adicionado 1 µL de RNase (1 mg/mL) e incubada por 5 min em temperatura ambiente. Depois disso, adicionaram-se 200 µL de solução II (0,2 M NaOH e 1% SDS), incubou-se por 5 min no gelo e adicionaram-se 150 µL de 5 M acetato de potássio, e deixou-se por mais 5 min no gelo. Centrifugou-se a solução durante 10 min, a 4°C, por 12000 g e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo, adicionando-se 20 µL de NaCl 3 M e 800 µL de etanol 100%, gelado, e então, se manteve no freezer (-20 °C), por 2 horas. Em seguida, o DNA foi precipitado, centrifugando-se a 12000 g por 20 min, a 4°C, e lavando-se com etanol 70%, gelado. Precipitou-se novamente o DNA, centrifugando-se a 13000 rpm por 5 min, a 4°C. Removeu-se o sobrenadante deixou-se o plasmídeo secar, a temperatura ambiente. Os plasmídeos foram ressuspensos em água destilada e os mesmos foram armazenados a -20 °C.

As extrações de plasmídeos de leveduras foram realizadas com o kit da *ZIMO RESEARCH* (Zymoprep™ Yeast Plasmid Miniprep II) seguindo as instruções do fabricante, e os plasmídeos obtidos foram armazenados a -20°C.

### 3.9 Transformação de leveduras

Para a transformação da linhagem DLG-K1 foi utilizado o método de acetato de lítio (GIETZ & WOODS, 2006). Neste, após as leveduras serem cultivadas em 50 mL de meio YPM, sob as condições descritas anteriormente, e atingirem a fase exponencial, foi feita uma lavagem das células com água destilada, e ressuspensas em 150 µL de 0,1 M de acetato de lítio. Então, alíquotas de 50 µL das células foram transferidas para microtubos, no qual foram adicionados mais 50 µL de 0,1 M LiAc, 5 µL de DNA de esperma de salmão e 30 µL do plasmídeo de interesse. Em seguida, adicionaram-se 340 µL de PLI, composto por 1 mL de 1 M LiAc, 1 mL água destilada e 8 mL de 50% PEG 3350, e incubou-se por 30 min sob agitação (160 rpm) e temperatura de 28°C.

Depois disso, foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de DMSO, e os tubos aquecidos a 42°C por 15 min (em banho-maria), sendo resfriados logo em seguida por 2 min. A solução foi centrifugada por 3 min, a 6000 g e se ressuspenderam-se as células em 200  $\mu\text{L}$  de meio SC, sem uracila, com 20 g/L de maltose. A seguir, as células foram inoculadas em placas contendo meio SC com maltose.

### **3.10 Ensaio de crescimento e fermentação**

Os crescimentos foram realizados com DO inicial de 0,1 (a 600 nm) das células pré-crescidas em meio SC, sem uracila, contendo 20 g/L de maltose, em erlenmeyers de 250 mL, cada um contendo 50 mL de meio SC, sem uracila, e uma fonte de carbono diferente (maltose, glicose, xilose, frutose ou galactose), incubados como descrito anteriormente. Esse ensaio foi realizado durante até 216 horas, e alíquotas dos meios foram retiradas em intervalos predeterminados. Essas alíquotas foram utilizadas para analisar a densidade celular (a 600 nm) e o consumo de açúcares e produção de etanol e outros metabólitos.

Nos experimentos de fermentação, primeiramente foi feito pré crescimentos celulares para que as células estivessem em fase exponencial no início dos experimentos. As células foram crescidas em meio SC, sem uracila, com 20 g/L de maltose, até que atingissem densidade suficiente para serem concentradas a densidades celulares de 10 g/L, simulando condições industriais. Os ensaios fermentativos foram realizados em microaerobiose, em frascos de 20 mL cheios de meio de cultura, agitados utilizando agitadores magnéticos. Os experimentos foram realizados todos com meios SC, sem uracila, variando na fonte de carbono (sempre na concentração de 20 g/L). Alíquotas foram retiradas em intervalos regulares de 2 horas a partir do tempo inicial do experimento. Essas alíquotas foram utilizadas para analisar a densidade celular e o consumo de açúcares e produção de etanol e outros metabólitos.

### **3.11 Determinação do consumo de açúcares e produção de etanol**

As determinações de consumo de açúcares e produção de etanol e outros metabólitos (glicerol e xilitol) foram feitas através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, ou HPLC (*High-performance liquid chromatography*), usando o modelo HPLC – Jasco XLC, com detector por índice de refração (RI 2031 plus – Jasco) e coluna para ácidos

orgânicos (Aminex HPX-87H Ion Exclusion Column – Bio-Rad), a fase móvel sendo 5 mM de ácido sulfúrico, com fluxo de 0,6 mL/min, durante 30 min, a 50°C.



## 4. Resultados e discussão

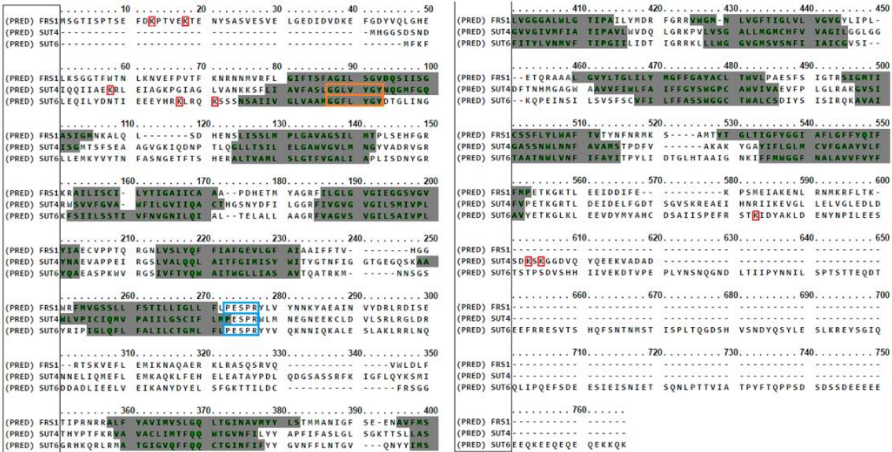
### 4.1 Seleção e clonagem dos genes

A seleção dos genes se deu com base na análise de similaridade com transportadores de açúcares já conhecidos. Todos os três genes apresentaram o motivo conservado PESPR (Figura 3), geralmente presente em transportadores de açúcares (WEIERSTALL; HOLLENBERG; BOLES, 1999). Além disso, os dois genes oriundos de *S. arborariae* (genes *SUT4* e *SUT6*) também apresentam o motivo G-G/F-XXX-G (motivo YOUNG) no primeiro segmento transmembrana, conservado em transportadores de xilose (YOUNG *et al.*, 2014). Nenhum dos genes escolhidos apresentou o códon CUG, que codifica para serina nas espécies *S. passalidarum* e *S. arborariae*, enquanto que em *S. cerevisiae* (como na grande maioria dos eucariotos), esse mesmo códon codifica para leucina (MUHLHAUSEN & KOLLMAR, 2014). Por essas razões, esses genes foram selecionados para o presente trabalho.

Com base no filograma (Figura 4) foi possível um agrupamento dos genes selecionados e, com base nessa análise, o gene oriundo de *S. passalidarum* foi nomeado *FRuctose Simporter 1 (FRS1)*, pois apresenta maior similaridade com um transportador de frutose, do tipo simporte, oriundo de *Scheffersomyces stipitis*. Já os genes oriundos de *S. arborariae*, foram nomeados *SUGar Transporter 4 (SUT4)* e *SUGar Transporter 6 (SUT6)*. Já a numeração “4” e “6” dos respectivos genes se deve à numeração que as sequências dos mesmos receberam no trabalho que fez o sequenciamento da linhagem UFMG-HM19.1A<sup>T</sup>, de *S. arborariae* (LOBO *et al.*, 2014).

Depois de amplificados a partir do DNA genômico de suas respectivas espécies, os genes foram então inseridos nos plasmídeos. Os plasmídeos estão representados na figura 5, com as características descritas na tabela 3. Para confirmação da correta inserção dos genes nos plasmídeos, foi feito tanto tratamentos com enzimas de restrição (Figuras 6 e 7), quanto PCRs utilizando-se iniciadores (Tabela 2) que anelam no final dos genes e nas regiões promotoras dos respectivos plasmídeos (Figura 8). Depois da construção dos plasmídeos, os mesmos foram introduzidos em *E. coli*.

**Figura 3:** Alinhamento das seqüências das proteínas FRS1, SUT4 e SUT6. O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa IBIVU Server-PRALINE (<http://www.ibi.vu.nl/>). As posições dos 12 segmentos transmembrana estão destacadas em cinza. Os traços indicam realinhamentos para maximizar a similaridade entre as seqüências. Os motivos PESPR estão destacados em azul. Os resíduos de lisina das porções N e C terminais estão destacados em vermelho. O motivo YOUNG está destacado em alaranjado.

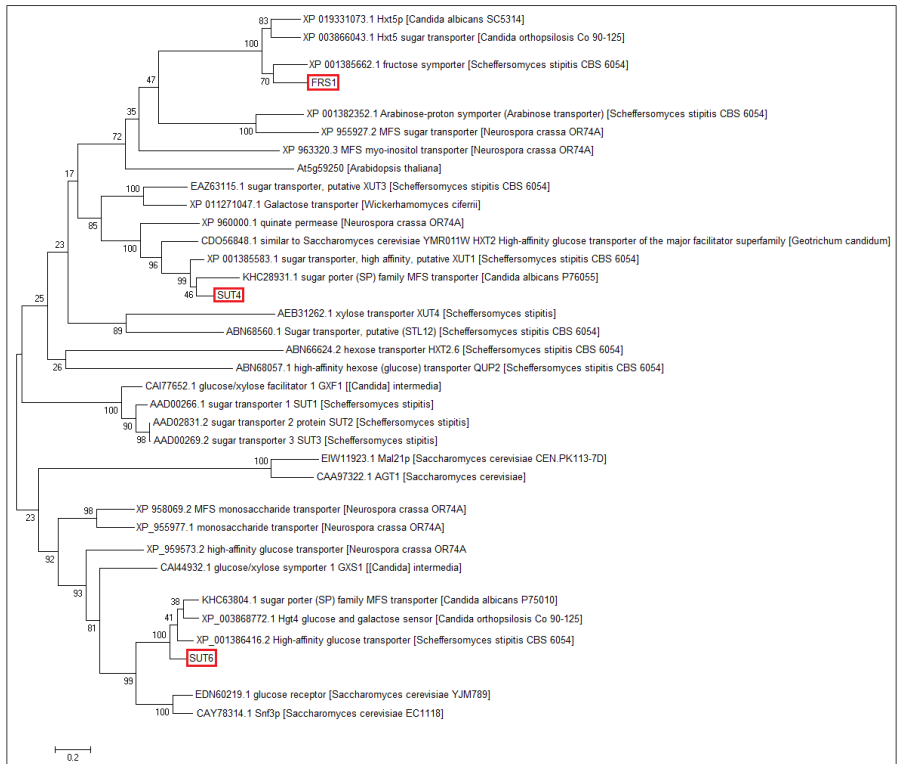


Fonte: Este trabalho

Os plasmídeos foram extraídos das bactérias e inseridos em leveduras da linhagem DLG-K1, surgindo assim quatro novas linhagens recombinantes de *S. cerevisiae*, uma contendo o plasmídeo p426-GPD com o gene *SUT4*, outra com o mesmo plasmídeo, mas com o gene *SUT6* inserido, outra contendo o plasmídeo pPGK com o gene *FRS1* inserido e, como controle negativo, uma linhagem contendo o plasmídeo p426-GPD sem nenhum gene adicionado (plasmídeo vazio). Como todas as linhagens descendem da cepa DLG-K1, elas foram nomeadas DLGK1-SUT4 (SUT4), DLGK1-SUT6 (SUT6), DLGK1-FRS1 (FRS1), DLGK1-GPD (GPD).

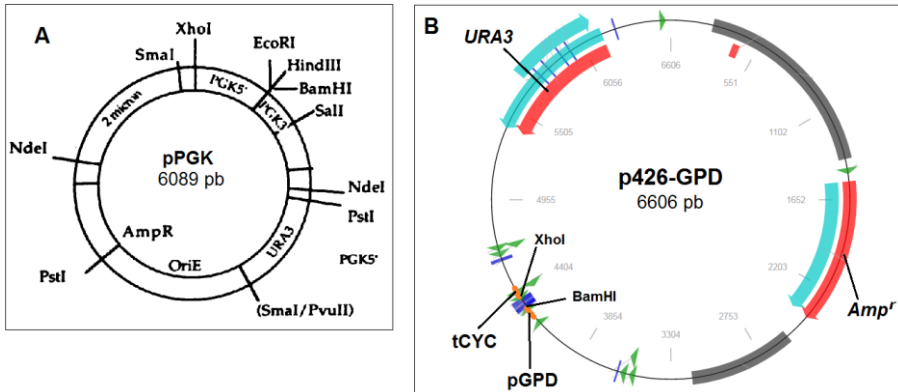


**Figura 4:** Árvore filogenética do tipo máxima parcimônia, montada com o software MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/>). Para tal, utilizou-se o alinhamento de sequências no formato FASTA, realizado pelo programa ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). As sequências contidas na árvore são dos três genes estudados no presente trabalho, de genes presentes no banco de dados que possuem maior similaridade aos genes selecionados e com os principais transportadores de xilose já caracterizados.



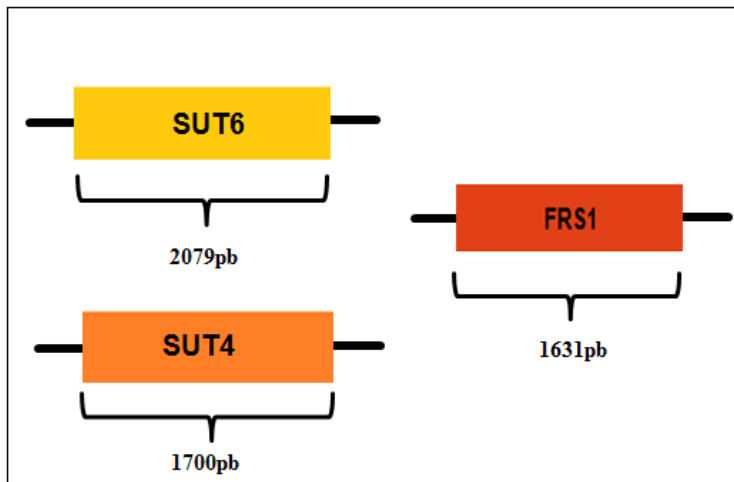
Fonte: Este trabalho

**Figura 5:** Em (A) e (B) estão ilustrados os plasmídeos p426-GPD (<https://www.addgene.org/>) e pPGK (KANG *et al.*, 1990), respectivamente, que são os vetores de clonagem que foram utilizados no presente trabalho. No plasmídeo pPGK foi inserido o gene *FRS1*, enquanto que no p426-GPD foram inseridos os genes *SUT4* e *SUT6*.



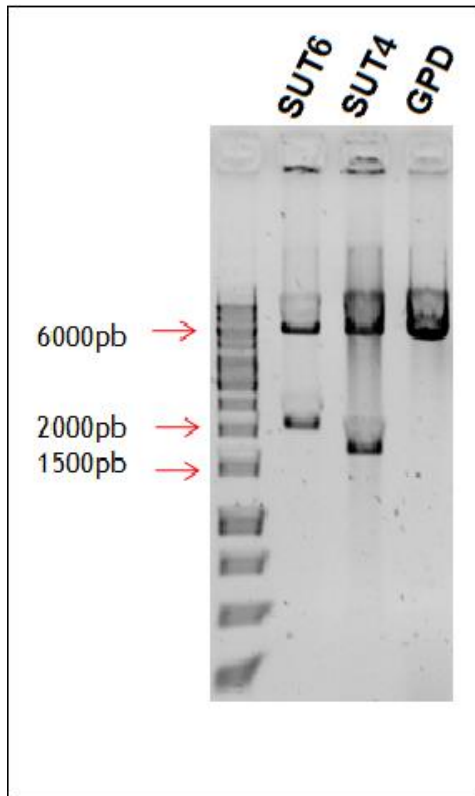
Fonte: Este trabalho

**Figura 6:** Representação dos genes que foram analisados no presente trabalho, com seus respectivos tamanhos.



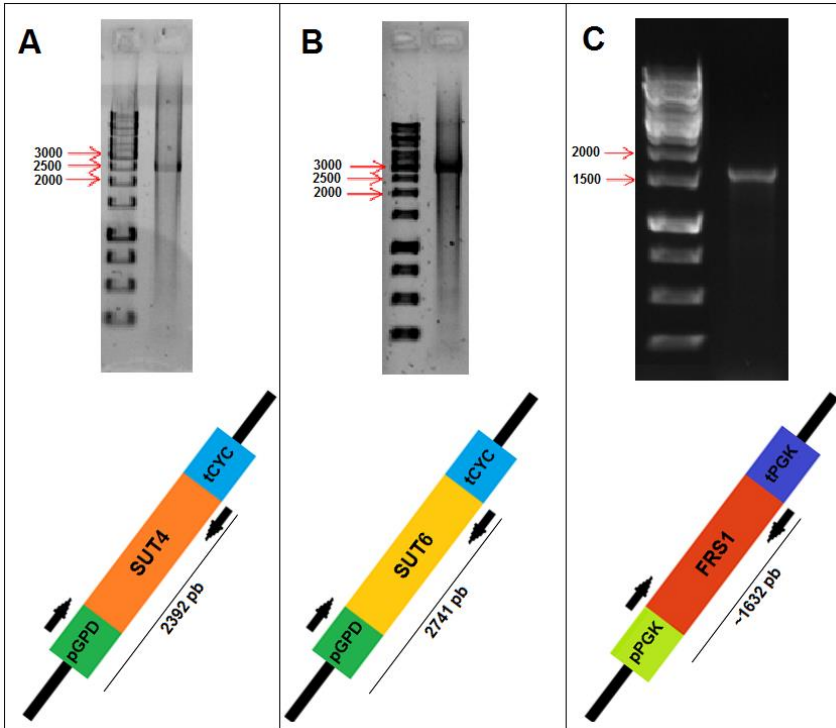
Fonte: Este trabalho

**Figura 7:** Confirmação da inserção dos genes *SUT4* e *SUT6* nos plasmídeos p426-GPD. Para tal, se fez o tratamento dos plasmídeos com as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI*.



Fonte: Este trabalho

**Figura 8:** Imagens das eletroforeses das PCRs de confirmação da inserção de cada um dos genes – (A) *SUT4*, (B) *SUT6* e (C) *FRS1* - em seus respectivos plasmídeos e, logo a baixo estão ilustradas as regiões amplificadas por PCR, juntamente com o tamanho esperado de cada um dos amplicons.



Fonte: Este trabalho

## 4.2 Crescimento das linhagens recombinantes

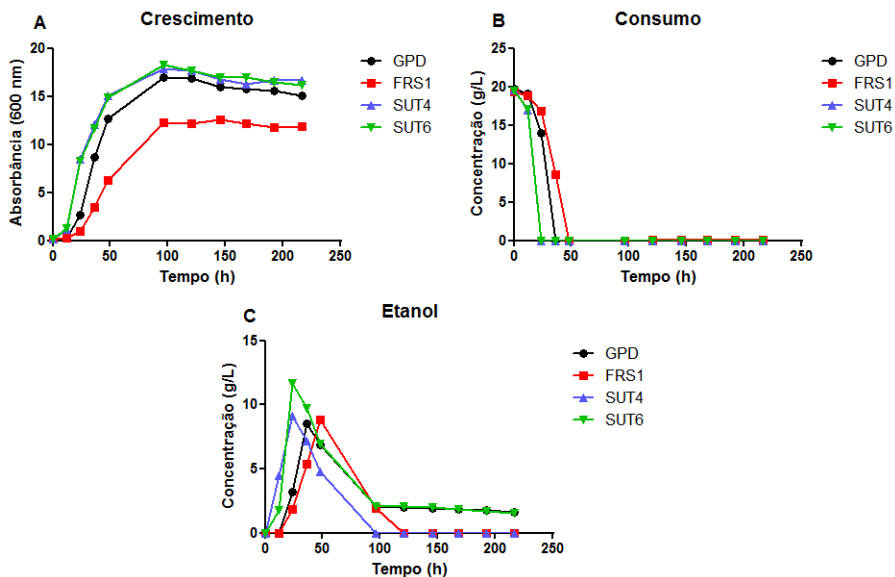
Depois de se obter as linhagens, testou-se a capacidade de crescimento das mesmas em diversas fontes de carbono (maltose, glicose, xilose, frutose e galactose). Como esperado, todas as linhagens mantiveram sua capacidade de consumir e crescer em um meio contendo maltose (Figura 9 A e B). As linhagens com os transportadores *SUT4* e *SUT6* apresentaram uma ligeira melhora na capacidade de crescer neste açúcar, quando comparado com o controle (plasmídeo GPD vazio).

A linhagem com a permease *FRS1*, apesar de não apresentar grande diferença na produção de etanol quando comparada ao controle,

apresentou uma velocidade de crescimento e consumo de maltose ligeiramente menor do que o controle, indicando que, talvez, a expressão desta proteína gera alguma perturbação na célula, afetando o transporte de maltose.

Em relação à produção de etanol (Figura 9 C), a linhagem com *SUT6* produz cerca de 3 g/L a mais em comparação às outras linhagens, que apresentaram praticamente a mesma produção de etanol.

**Figura 9:** Ensaio de crescimento em meio SC, sem uracila, contendo maltose, das linhagens GPD (controle), e as linhagens contendo FRS1, SUT4 e SUT6. Em A, está representado o crescimento de cada uma das linhagens, sendo que nesses ensaios a DO (600 nm) inicial foi de 0,1. Em B e C, estão representadas as curvas de consumo de maltose e produção de etanol, respectivamente. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos.

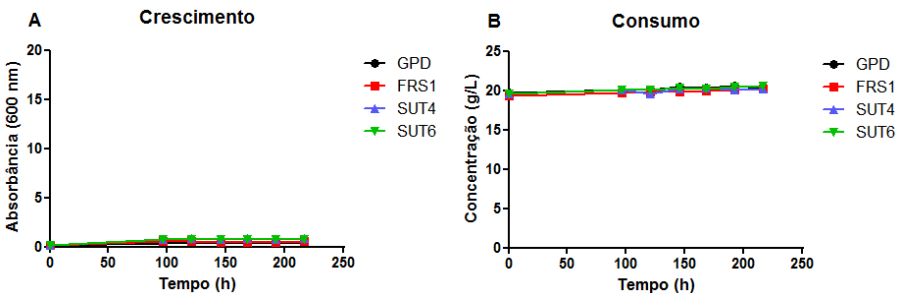


Fonte: Este trabalho

Nenhuma das linhagens recombinantes apresentou, dentre as 216 horas de experimento, capacidade de consumir ou crescer em meios contendo apenas frutose ou galactose como fontes de carbono (Figuras 10 e 11). Isso sugere que nenhum dos genes analisados codificam para transportadores que possuem atividade sobre esses açúcares. Ressalta-se

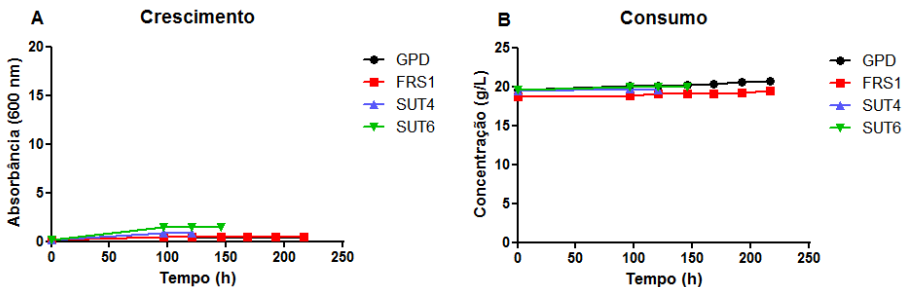
aqui que nem mesmo o gene *FRS1*, que apresentou similaridade com transportadores de frutose, apresentou capacidade de transportar esse açúcar, indicando que, em *S. cerevisiae*, esse transportador não é funcional.

**Figura 10:** Ensaio de crescimento em meio SC, sem uracila, contendo frutose, das linhagens GPD (controle), e as linhagens com FRS1, SUT4 e SUT6. Em A, está representado o crescimento de cada uma das linhagens, sendo que nesses ensaios a DO (600 nm) inicial foi de 0,1. Em B, estão representadas as curvas de consumo de frutose. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos.



Fonte: Este trabalho

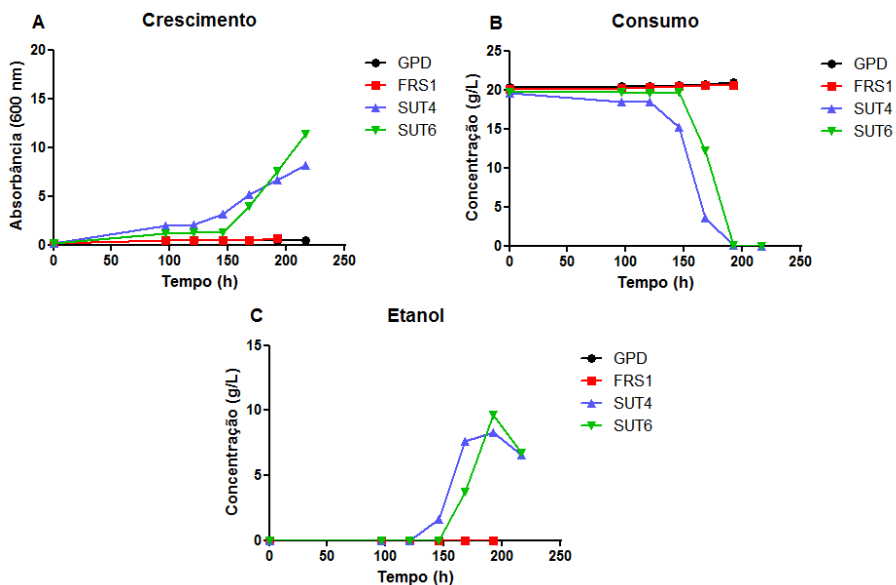
**Figura 11:** Ensaio de crescimento em meio SC, sem uracila, contendo galactose, das linhagens GPD (controle), e as linhagens com FRS1, SUT4 e SUT6. Em A, está representado o crescimento de cada uma das linhagens, sendo que nesses ensaios a DO (600 nm) inicial foi de 0,1. Em B, estão representadas as curvas de consumo de galactose. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos.



Fonte: Este trabalho

As linhagens com as permeases *SUT4* e *SUT6*, por sua vez, foram capazes de crescer em glicose, como observado na figura 12 A e B. Ambas as linhagens apresentaram uma extensa fase *lag*, que dura mais de 100 horas.

**Figura 12:** Ensaio de crescimento em meio SC, sem uracila, contendo glicose, das linhagens GPD (controle), e as linhagens com FRS1, *SUT4* e *SUT6*. Em A, está representado o crescimento de cada uma das linhagens, sendo que nesses ensaios a DO (600 nm) inicial foi de 0,1. Em B e C, estão representadas as curvas de consumo de glicose e produção de etanol, respectivamente. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos.

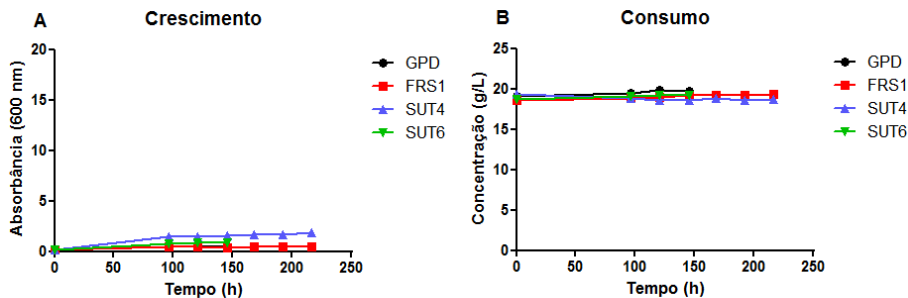


Fonte: Este trabalho

Apesar de apresentar similaridade com os receptores de glicose *Snf3* e *Rgt2* (Figura 4), possuindo uma extensa porção N terminal (Figura 3), o gene *SUT6* apresentou capacidade de transportar este açúcar. Esse resultado é interessante, pois *S. cerevisiae* não possui transportadores que possuem capacidade de transporte, porém, outros pesquisadores já relataram resultados similares aos obtidos no presente trabalho quando trabalhando com transportadores de outras leveduras (STASYK *et al.*, 2008).

A única linhagem que apresentou crescimento em meios contendo xilose foi a linhagem contendo *SUT4* (Figura 13). Essa linhagem apresentou baixo desempenho com esse açúcar, consumindo em torno de 1 g/L, apenas. A avaliação do crescimento da linhagem *SUT4* foi feito por análise de densidade óptica, porém, dado que essa linhagem floculou no meio contendo apenas xilose como fonte de carbono, as análises ópticas não podem ser adotadas como um parâmetro confiável para a mensuração do crescimento celular. A floculação apenas em xilose também é um indicativo de que essas leveduras estavam submetidas a uma condição de estresse quando apenas esse açúcar está disponível durante o crescimento das leveduras (CLARO; RIJSBRACK; SOARES, 2007).

**Figura 13:** Ensaio de crescimento em meio SC, sem uracila, contendo xilose, das linhagens GPD (controle), e as linhagens com FRS1, *SUT4* e *SUT6*. Em A, está representado o crescimento de cada uma das linhagens, sendo que nesses ensaios a DO (600 nm) inicial foi de 0,1. Em B, estão representadas as curvas de consumo de xilose. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos.



Fonte: Este trabalho

Houve produção de glicerol por todas as linhagens, quando as mesmas estavam crescendo em maltose. Além desses casos, a produção de glicerol a partir de glicose, se deu apenas pelas linhagens com *SUT4* e *SUT6*. Independente do açúcar ou da linhagem, a produção desse metabólito secundário não superou os 0,5 g/L em nenhum momento dos crescimentos.

Uma possível explicação sobre o porquê de a linhagem DLGK1-*SUT4*, que possui o transportador que consegue transportar xilose, o ter



feito com uma baixa eficiência é a possibilidade de esse transportador estar sendo removido da membrana plasmática assim que é inserido na mesma. Isso se deve ao processo de endocitose, que é dependente de ubiquitinação e ocorre em uma ampla variedade de transportadores (HORÁK, 2003). O processo de ubiquitinação, em transportadores, ocorre em resíduos de lisina presentes nas regiões voltadas ao citoplasma (HORÁK, 2003). A endocitose ocorre em transportadores que não estão sendo utilizados pela célula (ou cujo funcionamento não é detectado pela mesma). Como a xilose não é um açúcar reconhecido por *S. cerevisiae*, devido à essa levedura não possuir as enzimas necessárias para metabolização desse açúcar (BATT *et al.*, 1986; PITKÄNEN *et al.*, 2003), os transportadores que estão apenas transportando esse açúcar, normalmente são internalizados por esse mecanismo de ubiquitinação (NIJLAND *et al.*, 2016). Desta forma, é provável que o transportador *SUT4* transporte xilose de forma mais eficiente do que o observado neste ensaio, porém, sua remoção da membrana plasmática, em virtude da presença de resíduos de lisina nas porções N e C terminais do transportador (Figura 3), provoca um decréscimo no crescimento dessas leveduras em meios contendo apenas esta fonte de carbono.

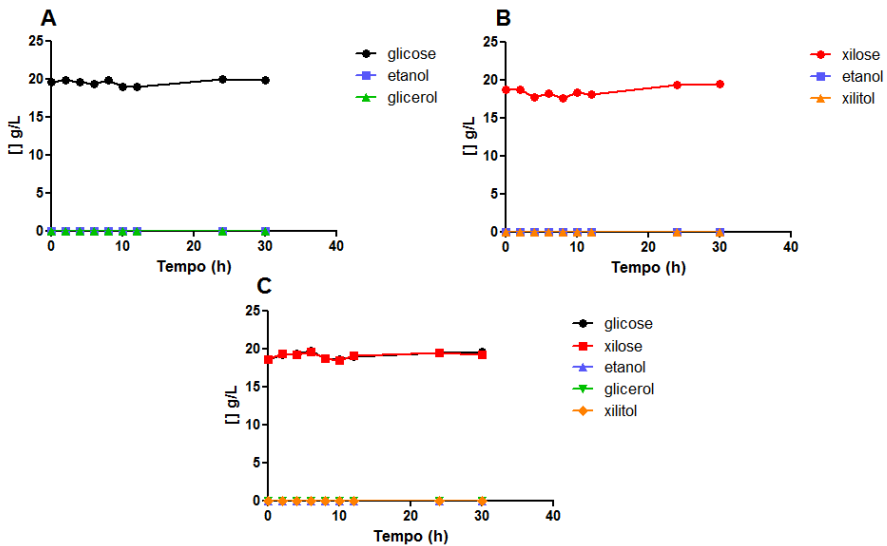
### 4.3 Ensaio de fermentação

Os ensaios de fermentação em batelada foram realizados para simular as condições de fermentação utilizadas atualmente pelas indústrias no Brasil. Portanto, esses experimentos foram realizados em microaerobiose e com altas densidades celulares (ZANIN *et al.*, 2000; SOCCOL *et al.*, 2005). Assim, pôde-se avaliar a atividade das leveduras sob essas condições e mensurar suas atividades sobre os açúcares em um curto período de tempo. Também foi feito uma co-fermentação para se avaliar possíveis diferenças de atividade das leveduras quando na presença de ambos os açúcares (glicose e xilose).

Como o esperado, de acordo com os resultados dos crescimentos, nem a linhagem GPD (controle) nem a que contem a permease FRS1 consumiram nenhum dos açúcares e nem produziram nenhum dos metabólitos secundários analisados durante o experimento (Figuras 14 e 15). A linhagem com *SUT4* apresentou um padrão de consumo de xilose muito parecido com o observado durante o ensaio de crescimento, consumindo uma pequena quantidade desse açúcar, de aproximadamente 2 g/L, tanto em meios contendo apenas xilose quanto em meios contendo tanto xilose e glicose (Figura 16).

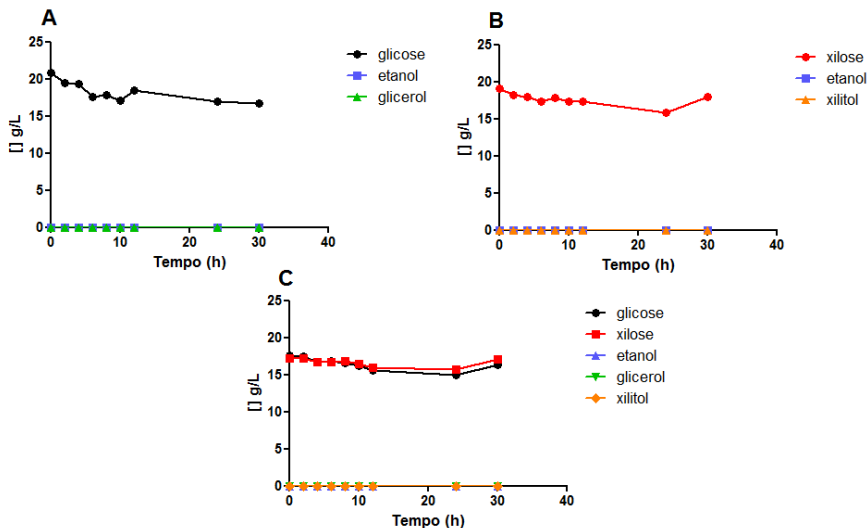
A linhagem com *SUT6* não consumiu xilose, mas depletou toda a glicose de ambos os meios (só glicose, ou glicose mais xilose) por volta das 10 horas do experimento (Figura 17). A produção de etanol também não sofreu nenhuma alteração entre o a fermentação com meio contendo apenas glicose ou em co-fermentação com xilose. Em ambos os meios e em ambas as cepas, a produção de etanol foi de aproximadamente 10 g/L.

**Figura 14:** Ensaio de fermentação em meio SC, sem uracila, contendo (A) glicose, (B) xilose e (C) glicose mais xilose, da linhagem GPD (controle). Em cada uma das partes da figura (A, B e C), estão representadas as curvas de consumo do(s) açúcar(es) e produção de etanol. Todas as concentrações estão em g/L. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos.



Fonte: Este trabalho

**Figura 15:** Ensaio de fermentação em meio SC, sem uracila, contendo (A) glicose, (B) xilose e (C) glicose mais xilose, da linhagem com FRS1. Em cada uma das partes da figura (A, B e C), estão representadas as curvas de consumo do(s) açúcar(es) e produção de etanol. Todas as concentrações estão em g/L. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos.

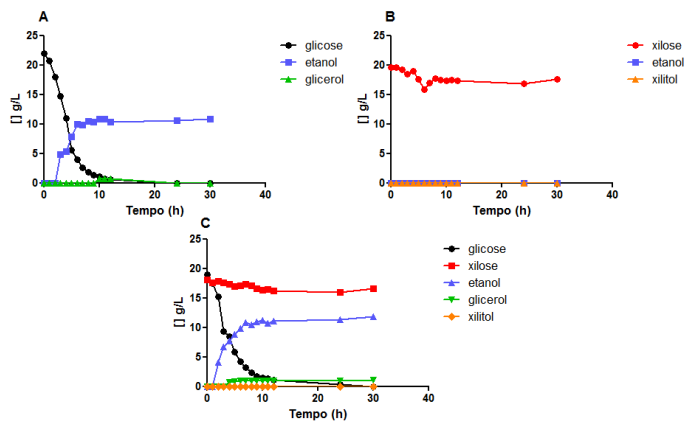


Fonte: Este trabalho

A produção de glicerol não superou a concentração de aproximadamente 1 g/L em nenhum dos casos. Além disso, não houve produção de xilitol por nenhuma das linhagens, como era de se esperar já que não houve significativo consumo de xilose.

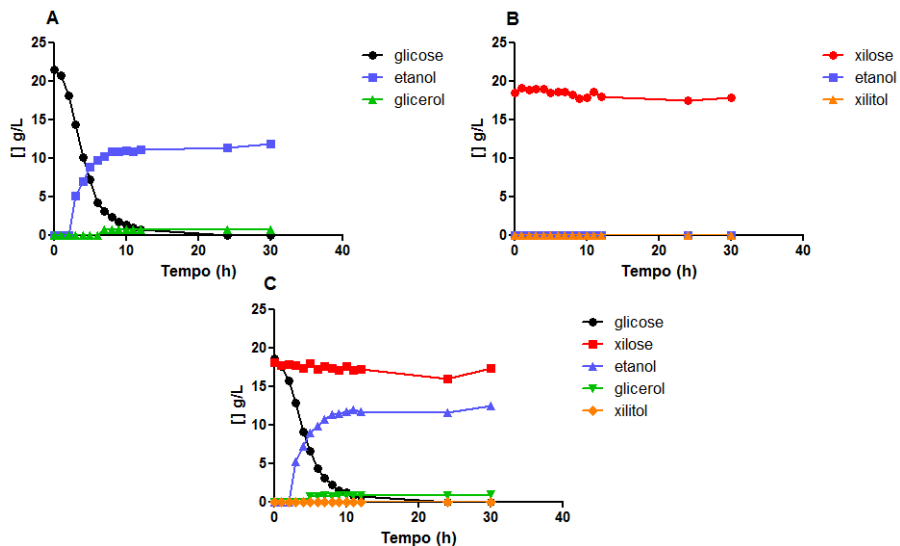
O motivo de não se ter observado um consumo maior de xilose durante a co-fermentação se deve a esse transportador possivelmente apresentar uma preferência muito maior por glicose do que por xilose. Assim, em meios contendo ambos os açúcares, o transportador dá preferência à glicose, fazendo com que o mesmo permaneça na membrana plasmática até a depleção dessa fonte de carbono e, posteriormente, é possivelmente ubiquitinado e posteriormente removido da membrana quando resta apenas xilose no meio (KOTYK, 1967).

**Figura 16:** Ensaio de fermentação em meio SC, sem uracila, contendo (A) glicose, (B) xilose e (C) glicose e xilose, da linhagem com SUT4. Em cada uma das partes da figura (A, B e C), estão representadas as curvas de consumo do(s) açúcar(es) e produção de etanol. Todas as concentrações estão em g/L. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos.



Fonte: Este trabalho

**Figura 17:** Ensaio de fermentação em meio SC, sem uracila, contendo (A) glicose, (B) xilose e (C) glicose e xilose, da linhagem com SUT6. Em cada uma das partes da figura (A, B e C), estão representadas as curvas de consumo do(s) açúcar(es) e produção de etanol. Todas as concentrações estão em g/L. Todos os parâmetros foram analisados conforme descrito em Material e Métodos.



Fonte: Este trabalho



## 5. Conclusões

- As linhagens contendo os transportadores *SUT4* e *SUT6* apresentaram capacidade de crescer em glicose, porém, somente após uma extensiva fase *lag*;
- O crescimento em xilose apresentado pela cepa contendo o gene *SUT4* foi baixo, com consumo de xilose correspondente a aproximadamente 1 g/L. Além disso, essa cepa apresentou fenótipo de flocculação quando crescendo apenas nessa fonte de carbono, indicando que essa é uma condição de estresse para as células;
- Apesar de ter consumido xilose durante a fermentação (aproximadamente 2 g/L), a linhagem contendo o transportador *SUT4* não produziu etanol ou outro metabólito analisado;
- O transportador *SUT6* se mostrou um transportador de glicose apenas, não apresentando atividade sobre nenhum dos outros açúcares testados;
- A cepa contendo o gene *FRS1* não apresentou características fenotípicas que indiquem que esse gene é um transportador de açúcar. Não permitiu que a cepa que o continha consumisse ou crescesse em nenhum dos açúcares testados e, inclusive, dificultou seu crescimento em maltose, indicando que esse gene pode causar alguma alteração celular negativa.





## 6. Perspectivas Futuras

- Como nenhuma das permeases testadas apresentaram resultados significativos sobre a xilose, os transportadores utilizados pelas leveduras *S. passalidarum* e *S. arborariae* podem ser codificados por outros genes que não os analisados no presente trabalho. Dessa forma, mais estudos são necessários na tentativa de se caracterizar algum bom transportador de xilose possivelmente presente nestas espécies;
- É possível que, através de engenharia evolutiva com o transportador *SUT4*, a cepa que o possui consiga utilizar a xilose de forma mais eficiente.
- Para contornar a problemática da endocitose mediada por ubiquitinação, uma alternativa é a remoção dos resíduos de lisina presentes nas extremidades N- e/ou C-terminais dos transportadores, fazendo com que eles permaneçam na membrana.



## REFERÊNCIAS

- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **Fems Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p.719-739, 2005.
- BATT, C. A. *et al.* Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng**, v. 28, n. 4, p.549-553, 1986.
- BRASIL. MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. (Org.). **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis: ano 2014**. Rio de Janeiro: Ministério de Minas e Energia, 57 p., 2015.
- CADETE, R. M. *et al.* *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **Fems Yeast Research**, v. 9, n. 8, p.1338-1342, 2009.
- CADETE, R. M. *et al.* Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **Plos One**, v. 7, n. 8, p.1-11, 2012.
- CADETE, R. M. *et al.* *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel d-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 2, p.421-431, 2013.
- CLARO, F. B.; RIJSBRACK, K.; SOARES, E. V. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p.693-700, 2007.
- CORTEZ, L. A. B. BIOMASSA NO BRASIL E NO MUNDO. **BIOMASSA para energia**. p. 15-30. 2008.
- DA CUNHA-PEREIRA, F. *et al.* Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p.4218-4225, 2011.
- DU, J.; LI, S.; ZHAO, H. Discovery and characterization of novel d-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. **Mol. Biosyst**, v. 6, n. 11, p.2150-2156, 2010.

FERNANDES, D. L. A. *et al.* Second Generation Bioethanol from Lignocellulosics: Processing of Hardwood Sulphite Spent Liquor. **Bioethanol**, p.123-152, 2012.

FERREIRA, D. *et al.* XYLH encodes a xylose/H<sup>+</sup>symporter from the highly related yeast species *Debaryomyces fabryi* and *Debaryomyces hansenii*. **Fems Yeast Research**, v. 13, n. 7, p.585-596, 2013.

GIBSON, D. G. *et al.* Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a *Mycoplasma genitalium* Genome. **Science**, v. 319, n. 5867, p.1215-1220, 2008.

GIETZ, R. D. & WOODS, R. A. Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. **Methods in Molecular Biology**, v. 313, p.107-120, 2006.

GÍRIO, F. M. *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p.4775-4800, 2010.

GONÇALVES, D. L. *et al.* Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 63, p.13-20, 2014.

GREEN, M. R. & SAMBROOK, J. Isolation and Quantification of DNA. In: GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. Cap. 1. p. 11-28. 2012.

GUERRIERO, G. *et al.* Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Eng. Life Sci.**, v. 16, n. 1, p.1-16, 2015.

HAHN-HÄGERDAL, B. *et al.* Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends In Biotechnology**, v. 24, n. 12, p.549-556, 2006.

HECTOR, R. E. *et al.* Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 80, n. 4, p.675-684, 2008.

HENDERSON, P. J. F. & MAIDEN, M. C. J. Homologous Sugar Transport Proteins in *Escherichia coli* and Their Relatives in Both Prokaryotes and Eukaryotes. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 326, n. 1236, p.391-410, 1990.

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

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

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

HSU, T., Pretreatment of biomass. In: WYMAN, C. E., **Handbook on Bioethanol: Production and Utilization**. Washington, DC: Taylor & Francis, 1996. p. 179-195.

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

KANG, Y. S. *et al.* Effects of expression of mammalian G alpha and hybrid mammalian-yeast G alpha proteins on the yeast pheromone response signal transduction pathway. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 6, p.2582-2590, 1990.

KATAHIRA, S. *et al.* Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter Sut1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p.115-119, 2008.

KOTYK, A. Properties of the sugar carrier in baker's yeast. **Folia Microbiologica**, v. 12, n. 2, p.121-131, 1967.

LANDRY, C. R. *et al.* Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 3, p.575-591, 2006.

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

LEE, W.-J. *et al.* Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p.186-191, 2002.

LOBO, F. P. *et al.* Draft Genome Sequence of the D-Xylose-Fermenting Yeast *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1AT. **Genome Announcements**, v. 2, n. 1, p.1-13, 2014.

LOVINS, A. B. *et al.* **Winning the Oil Endgame: Innovation for Profits, Jobs and Security.** Snowmass, Colorado: Rocky Mountain Institute, Cap 1-4. p. 1-122, 2005.

MARTINELLI, L. A. & FILOSO, S. Expansion of Sugarcane Ethanol Production in Brazil: Environmental and Social Challenges. **Ecological Applications**, v. 18, n. 4, p.885-898, 2008.

MERICO, A. *et al.* Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **Febs Journal**, v. 274, n. 4, p.976-989, 2007.

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

MILANEZ, A. Y. *et al.* **O déficit de produção de etanol no Brasil entre 2012 e 2015: determinantes, consequências e sugestões de política.** 35. ed. Bndes Setorial, 25 p. 2012.

MOON, J. *et al.* New genotypes of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* engineered with YXI and heterologous xylose transporters improve xylose utilization and ethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p.247-254, 2013.

MUHLHAUSEN, S. & KOLLMAR, M. Molecular Phylogeny of Sequenced *Saccharomycetes* Reveals Polyphyly of the Alternative Yeast Codon Usage. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 12, p.3222-3237, 2014.

NGUYEN, N. H. *et al.* Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p.1232-1241, 2006.

NOGUEIRA, M. A. F. S. & GARCIA, M. S. Gestão dos Resíduos do Setor Industrial Sucoenergético: Estudo de Caso de Uma Usina no Município de Rio Brillhante, Mato Grosso do Sul. **Reget**, v. 17, n. 17, p.3275-3283, 2014.

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

PEREIRA Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; ANNA, L. M. M. S. **Biomass of Lignocellulosic Composition for Fuel Ethanol Production Within the Context of Biorefinery.** 47 p. 2008.

PESSOA Jr., A. *et al.* Perspectives on Bioenergy and Biotechnology in Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, n. 124, p.59-70, 2005.

PITKÄNEN, J. *et al.* Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metabolic Engineering**, v. 5, n. 1, p.16-31, 2003.

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

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

SARKAR, N. *et al.* Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p.19-27, 2012.

SOCCOL, C. R. *et al.* Brazilian biofuel program: an overview. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, p. 897-904, 2005.

SOUZA, Z. J. Bioeletricidade: o que falta para esta alternativa energética deslanchar. **Revista Mercado Empresarial**, v. 41, n. 7, p.52-54, 2012.

STAMBUK, B. U. *et al.* Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 67, n. 11, p.918-926, 2008.

STASYK, O. G. *et al.* Identification of Hexose Transporter-Like Sensor HXS1 and Functional Hexose Transporter HXT1 in the Methylophilic Yeast *Hansenula polymorpha*. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 4, p.735-746, 2008.

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

TAMANG, J. P. & FLEET, G. H. Yeasts Diversity in Fermented Foods and Beverages. **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**, p.169-198, 2009.

VAN MARIS, A. J. A. *et al.* Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 4, p.391-418, 2006.

VAN VLEET, J. H. & JEFFRIES, T. W.; OLSSON, L. Deleting the para-nitrophenyl phosphatase (pNPPase), *PHO13*, in recombinant *Saccharomyces*

cerevisiae improves growth and ethanol production on d-xylose. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 6, p.360-369, 2008.

WANG, C. *et al.* Cloning and characterization of heterologous transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of important amino acids for xylose utilization. **Metabolic Engineering**, v. 30, p.79-88, 2015.

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

WEUSTHUIS, R. A. *et al.* Chemostat Cultivation as a Tool for Studies on Sugar Transport in Yeasts. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 4, p.616-630, 1994.

WOHLBACH, D. J. *et al.* Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 108, n. 32, p.13212-13217, 2011.

YOUNG, E. *et al.* Functional Survey for Heterologous Sugar Transport Proteins, Using *Saccharomyces cerevisiae* as a Host. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p.3311-3319, 2011.

YOUNG, E. *et al.* Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 111, n. 14, p. 131-136, 2014.

ZANIN, G. M. *et al.* Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 1147-1161, 2000.