

Marília Marques Knychala

**TRANSPORTE E FERMENTAÇÃO DE XILOSE, CELOBIOSE E
XILOBIOSE POR LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae*
RECOMBINANTES**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia e Biociências.
Orientador: Prof. Dr. Boris U. Stambuk.

Florianópolis
2017

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

Knychala, Marília

Transporte e fermentação de xilose, celobiose e xilobiose por leveduras *saccharomyces cerevisiae* recombinantes / Marília Knychala ; orientador, Boris Ugarte Stambuk, 2017.

164 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

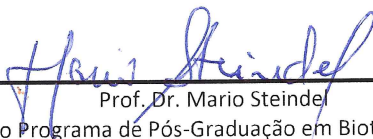
1. Biotecnologia e Biociências. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. xilose. 4. xilobiose. 5. celobiose. I. Ugarte Stambuk, Boris. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

**“Transporte e fermentação de xilose, celobiose e xilobiose por leveduras
Saccharomyces cerevisiae recombinantes”**

Por

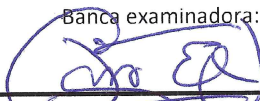
Marília Marques Knychala

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (25/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof. Dr. Mario Steindel
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

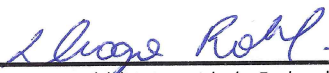
Banca examinadora:



Dr. Boris Juan C. Ugarte Stambuk (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador



Dr. Carlos Peres Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Diogo Robl (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.ª Ayla Sant Ant da Silva (Instituto Nacional de Tecnologia/MCTI-RJ)

Florianópolis, 19 de dezembro de 2017.

Este trabalho é dedicado ao meu amado esposo Marcos e aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Prof. Dr. Boris Satambuk, pela oportunidade em fazer parte do grupo de pesquisa LBMBL e por todo aprendizado adquirido durante esses anos de trabalho e dedicação à pesquisa.

Agradeço também ao Dr. Francisco Gúrio, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, bem como à todos os colegas do LNEG (Laboratório Nacional de Energia e Geologia- Lisboa, Portugal), em especial ao amigo e co-orientador Dr. César Fonseca e à amiga Dra. Maria José Leandro, pelos ensinamentos que foram além das bancadas do laboratório.

Aos amigos Eduardo Zanella e Angela Santos, pela parceria, solidariedade e disposição em ajudar sempre que fosse preciso e, também, a todos os colegas do laboratório: Bruna Souza, Cristina Rios, Theo Brascher, Wallace Pereira, Daniele Kuns, Eike Hirsch, Gabriela Gubert, Gabriela Karasiak, João Viana e Eduardo Ribeiro, pelos momentos de cumplicidade regados de muita descontração, que tornaram o ambiente trabalho leve e divertido.

Agradeço, em especial, ao amigo e parceiro para todas as horas Leonardo Kretzer, que dividiu comigo muitas alegrias e tristezas nas bancadas e, sobretudo, alguém com quem aprendi muito mais que ensinei. Agradeço também à amiga para toda vida Dra. Adriane Mouro, que foi minha confidente e conselheira durante esta trajetória, me apoiando dentro e fora do laboratório.

Agradeço aos meus pais Idelmar e Oneide e aos meus irmãos Laura, Raphael e Rafaela, pelo apoio e amor incondicional, que são as bases que sustentam meus sonhos e minhas conquistas.

Ao meu esposo, amigo e companheiro Marcos, que me deu suporte durante todos os desafios que encontrei ao longo desses anos, confiando e acreditando em mim quando nem eu mesma acreditava e, acima de tudo, a quem devo todo mérito deste trabalho, sem ele eu nunca teria conseguido.

Agradeço à minha filha Analu, que foi o sopro de alegria e esperança que me faltava e o que me deu forças para concluir este trabalho.

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biocências, pelo aprendizado. À FAPESC e à CAPES-FCT, pelo apoio financeiro.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância”.
(John F. Kennedy)

RESUMO

Saccharomyces cerevisiae é o organismo mais amplamente utilizado pela indústria de produção de bioetanol, mas não consegue fermentar eficientemente alguns açúcares presentes em hidrolisados da biomassa ligninocelulósica. Uma vez que o limitado transporte de xilose e a inexistência de vias de utilização de xilobiose e celobiose são uns dos principais desafios a serem superados para uma eficiente fermentação destes hidrolisados, neste trabalho identificamos novos transportadores de açúcares e enzimas provenientes de leveduras que naturalmente conseguem utilizar hidrozado de biomassa vegetal, como *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora passalidarum*, *Meyerozyma guilliermondii* e *Candida tropicalis*. Uma linhagem de *S. cerevisiae* *hxt*-nula, sem os principais transportadores de hexose (*hxt1-hxt7* e *gal2*), mas com altas atividades de xilose redutase, xilitol desidrogenase e xilulocinase, foi transformada com plasmídeos de uma biblioteca genômica de *Sc. stipitis* ou, alternativamente, com genes de transportadores de açúcares selecionados a partir dos genomas publicados de *Sp. passalidarum* e *Sp. arborariae*. Cinco genes permitiram fermentação de xilose e glicose pelas linhagens recombinantes: três genes de *S. stipitis* (*SsXUT1*, *SsHXT2.6* e *SsQUP2*), e duas versões truncadas de transportadores provenientes de *Sp. arborariae* e *Sp. passalidarum* (*tSaXUT1* e *tSpXUT1*, respectivamente), sendo que o transportador *tSpXUT1* foi o que permitiu o melhor desempenho fermentativo com xilose de todos os transportadores clonados. Além disso, novos genes para transportadores e enzimas necessárias para o consumo de xilobiose e celobiose também foram expressos em *S. cerevisiae*, incluindo uma enzima intracelular (*SpBGL2*) proveniente de *Sp. passalidarum* com atividade β -glicosidase e β -xilosidase. A co-expressão de genes de transportadores (*MgCBT2* e *CtCBT1*) provenientes de *M. guilliermondii* e *C. tropicalis*, permitiu o consumo de celobiose por *S. cerevisiae*. A combinação do transportador *MgCBT2* com a enzima *SpBGL2* permitiu a eficiente fermentação de celobiose por *S. cerevisiae*, atingindo rendimento máximo de etanol a partir desta fonte de carbono. Portanto, os resultados obtidos ressaltam a importância dos transportadores de açúcares para a eficiente produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica por leveduras *S. cerevisiae* recombinantes.

Palavras-chave: *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora passalidarum*, *Meyerozyma guilliermondii*, xilose, celobiose, xilobiose, β -glicosidase, β -xilosidase, transportadores.heterólogos truncados

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae is the most widely organism used by bioethanol production industry, but it can not ferment efficiently some sugars present in lignocellulosic biomass hydrolysates. Since limited xylose transport and the lack of ways to using xylobiose and celobiose are one of main challenges to be overcome for efficient hydrolysates fermentation, in this work we identify new sugar transporters and enzymes from yeasts that naturally can use plant biomass, such as *Scheffersomyces stipitis*, *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora passalidarum*, *Meyerozyma guilliermondii* and *Candida tropicalis*. A *S. cerevisiae* strain without the major hexose transporters (*hxt1-hxt7* and *gal2*), but with high xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylulokinase activities, was transformed with plasmids from *Sc. stipitis* genomic library or, alternatively, with sugar transporter genes selected from published *Sp. passalidarum* and *Sp. arborariae* genomes. Five genes allowed xylose and glucose fermentation by recombinant strains: three *Sc. stipitis* genes (*SsXUT1*, *SsHXT2.6* and *SsQUP2*), and two truncated transporters versions from *Sp. arborariae* and *Sp. passalidarum* (*tSaXUT1* and *tSpXUT1*, respectively), and *tSpXUT1* transporter was the one that allowed the best xylose fermentation desempenho of all cloned transporters. In addition, new genes for transporters and enzymes required for xylobiose and celobiose consumption were also expressed in *S. cerevisiae*, including an intracellular enzyme (*SpBGL2*) from *Sp. passalidarum* with β -glucosidase and β -xylosidase activity. The co-expression of the transporter genes (*MgCBT2* and *CtCBT1*) from *M. guilliermondii* and *C. tropicalis* with intracellular enzyme, allowed celobiose consumption by *S. cerevisiae*. The combination of *MgCBT2* transporter with *SpBGL2* enzyme, allowed efficient celobiose fermentation by *S. cerevisiae*, achieving maximum yield of ethanol from this carbon source. Therefore, the results obtained highlight sugar transporters importance for efficient bioethanol production from lignocellulosic biomass by recombinant yeasts *S. cerevisiae*.

Key words: *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora passalidarum*, Lignocellulose hydrolysates fermentation, β -glucosidase, β -xylosidase, *Meyerozyma guilliermondii*, Truncated heterologous transporters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da lignocelulose, constituída por celulosas embutidas em uma matriz de hemicelulosas e moléculas de lignina.....	27
Figura 2 – Etapas para disponibilização dos açúcares fermentáveis presente no material lignocelulósico.....	28
Figura 3 – Pré-tratamento de biomassa para produtos finais com valor agregado.....	29
Figura 4 – Figura esquemática da biodegradação de celulose.....	34
Figura 5 – Esquema sobre um sistema hemicelulolítico, descrevendo a degradação de uma hemicelulose.....	35
Figura 6 – Estrutura secundária dos transportadores de açúcares pertencente à família MFS.....	36
Figura 7 – Visão geral das vias de assimilação de xilose em leveduras.....	40
Figura 8 – Esquema da via não oxidativa das pentoses fosfato.....	43
Figura 9 – Modelo de metabolismo de xilose em <i>S. cerevisiae</i> recombinante expressando XI com GRE3(A) e sem o gene GRE3 (B).43	43
Figura 10 – Estratégias para co-fermentação simultânea de celobiose, xilose, xilobiose e glicose, sem repressão pela glicose.....	47
Figura 11 – <i>MTH1</i> é necessário para a formação do complexo <i>RGT1/SSN6-TUP1</i> que leva à repressão da expressão dos genes HXTs.....	51
Figura 12 – Diagrama esquemático entre as três vias de sinalização de glicose na levedura (<i>RGT2/SNF3</i> , <i>SNF1/MGI</i> e cAMP-PKA).....	52
Figura 13 – Cascata das enzimas ubiquitina ligase para conjugação da ubiquitina ao resíduo de lisina (K) alvo.....	54
Figura 14 – Modelo para a endocitose de transportadores mediada por α -arrestina (ARTs).....	54
Figura 15 – Esquema de construção dos plasmídeos recombinantes....	66
Figura 16 – Esquema de verificação da correta inserção do gene no plasmídeo.....	67
Figura 17 – Esquema de truncagem das sequências de transportadores.....	71
Figura 19 – Cinética de transporte de ^{14}C -xilose ou ^{14}C -glicose por linhagens <i>S. cerevisiae</i> recombinantes com os transportadores provenientes de <i>Sc. stipitis</i> (<i>SsXUT1</i> , <i>SsHXT2.6</i> , e <i>SsQUP2</i>).....	75
Figura 20 – Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SaXUT1, DLG-SaRGT2, DLG-SpFRS1, DLG-SpXUT1, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% maltose.....	80

Figura 21 – Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SaXUT1, DLG-SaRGT2, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% de glicose.....	80
Figura 22 – Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagem recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SaXUT1 e ASY3-SaXUT1, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% de xilose.....	82
Figura 23 – Modelo estrutural e <i>docking</i> com glicose ou xilose do transportador <i>MgGET1</i>	83
Figura 24 – Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm da linhagem recombinante de <i>S. cerevisiae</i> DLG-MgGET1, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% maltose ou 2% de glicose.....	83
Figura 25 – Cinética de transporte de ¹⁴ C-xilose ou ¹⁴ C-glicose pela linhagem <i>S. cerevisiae</i> recombinante com o transportador <i>SpXUT1</i> de <i>Sp. passalidarum</i>	84
Figura 26 – Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm da linhagem recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SpXUT1, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% de glicose, inoculada com uma concentração inicial de células de 0,1 ou 0,5 DO _{600nm}	85
Figura 27 – Fermentação em batelada com 10 g/L das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SaXUT1, DLG-SaRGT2, DLG-SpXUT1 e DLG-MgGET1 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% glicose como fonte de carbono.....	86
Figura 28 – Filograma com os possíveis transportadores de xilose clonados neste trabalho (marcados em caixa azul), juntamente com os principais transportadores de xilose e outros açúcares já caracterizados.....	87
Figura 29 – Alinhamento múltiplo entre as sequências dos transportadores <i>SpFRS1</i> , <i>SaXUT1</i> , <i>SpXUT1</i> , <i>SaRGT2</i> , <i>MgGET1</i> , <i>XylE</i> de <i>E. coli</i> e <i>GLUT1</i>	90
Figura 30 – Alinhamento das porções N- e C-terminais dos transportadores selecionados para truncagem.....	96
Figura 31 – Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SpXUT1 e DLG-tSpXUT1, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% de glicose.....	98
Figura 32 – Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SpXUT1 e DLG-tSpXUT1, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% de xilose.....	98
Figura 33 – Fermentação em batelada com 10 g/L das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SpXUT1 e DLG-tSpXUT1, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila), com 2% glicose como fonte de carbono.....	99

Figura 34 – Fermentação em batelada com 10 g/L das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SpXUT1 e DLG-tSpXUT1, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila), com 2% xilose como fonte de carbono.....	99
Figura 35 – Fermentação em batelada com as linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SpXUT1 e DLG-tSpXUT1 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% xilose e 2% glicose como fontes de carbono.....	102
Figura 36 - Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% de glicose.....	103
Figura 37 – Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% de xilose.....	104
Figura 38 – Fermentação em batelada com 10 g/L das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% glicose como fonte de carbono.....	104
Figura 39 – Fermentação em batelada com 10 g/L das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% xilose como fonte de carbono.....	104
Figura 40 – Fermentação em batelada com as linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% xilose e 2% glicose como fontes de carbono.....	105
Figura 41 – Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-MgGET1 e DLG-tMgGET1, em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% de glicose.....	106
Figura 42 – Fermentação em batelada com 10 g/L das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> DLG-MgGET1 e DLG-tMgGET1 em meio sintético <i>dropout</i> (sem uracila) com 2% glicose como fonte de carbono.....	107
Figura 43 – Modelo estrutural da permease <i>AGT1</i>	111
Figura 44 – Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> CENPK-HB, CENPK-B2 e linhagem controle CENPK-GPD.....	116
Figura 45 – Filograma construído com as enzimas clonadas neste trabalho (<i>PAT1</i> e <i>SpBGL2</i> -marcados em caixa azul), juntamente com as principais enzimas intracelulares caracterizadas.....	117

Figura 46 – Crescimento aeróbio sob agitação de 160 rpm, das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> CENPK-B2-CtCBT1 e CENPK-B2-MgCBT2, em meio sintético <i>dropout</i> (sem triptofano e sem uracila) com 2% de celobiose.....	119
Figura 47 – Fermentação em batelada com as linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> CENPK-B2-CtCBT1, CENPK-B2-MgCBT2, CENPK-HB e linhagem controle CENPK-GPD.....	120
Figura 48 – Filograma construído com as sequências <i>MgCBT2</i> e <i>CtCBT1</i> (marcados em caixa azul), juntamente com as sequências dos principais transportadores de celobiose caracterizados em <i>S. cerevisiae</i> até o momento.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de biorrefinarias 2G operando no mundo.....	25
Tabela 2 – Lista de plantas de etanol 2G operando no Brasil.....	25
Tabela 3 – Política atual para biocombustíveis na América do Sul.....	26
Tabela 4 – Potencial de produção de etanol 2G no Brasil (bilhões de litros) por tipo de investimento.....	26
Tabela 5 – Composição da lignocelulose em base seca.....	28
Tabela 6 – Comparação de métodos de pré-tratamentos.....	31
Tabela 7 – Comparação dos desempenhos fermentativos de <i>S. cerevisiae</i> xilose-fermentadoras recombinantes.....	41
Tabela 8 – Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas.....	60
Tabela 9 – Lista dos plasmídeos utilizados e construídos e Iniciadores utilizados.....	64
Tabela 10 – Listagem dos genes selecionados no presente trabalho e seus números de acesso no NCBI.....	65
Tabela 11 – Parâmetros fermentativos com 2% glicose ou 2% xilose como fontes de carbono por leveduras recombinantes expressando transportadores de <i>Sc. stipitis</i>	73
Tabela 12 – Parâmetros fermentativos com 2% de glicose e 2% de xilose como fontes de carbono por leveduras recombinantes expressando transportadores de <i>Sc. stipitis</i>	74
Tabela 13 – Parâmetros cinéticos do transporte de glicose e xilose por cepas de <i>S. cerevisiae</i> expressando os genes provenientes da biblioteca genômica de <i>Sc. stipitis</i>	75
Tabela 14 – Parâmetros cinéticos do transporte de glicose e xilose pela cepa de <i>S. cerevisiae</i> DLG-SpXUT1.....	85
Tabela 15 – Parâmetros fermentativos em batelada com altas densidades celulares, utilizando 2% glicose ou xilose, e 2% glicose mais 2% xilose como fontes de carbono, por leveduras recombinantes.....	102

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	23
1.1 – Etanol de segunda geração no Brasil.....	23
1.2 – Lignocelulose como fonte de açúcares fermentáveis.....	27
1.3 – Disponibilização dos carboidratos presentes no material celulósico e hemicelulósico.....	33
1.4 – Transporte de açúcares e sistemas de transporte em <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	36
1.5 – A utilização de xilose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
1.6 – A utilização direta de celobiose e xilobiose por <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	46
1.7 – Regulação transcricional e pós-traducional de transportadores de açúcares em <i>S. cerevisiae</i>	46
1.8 – Espécies de leveduras fermentadoras de xilose e/ou hidrolisado de biomassa vegetal.....	56
2 – OBJETIVOS.....	58
2.1 – Objetivo Geral.....	58
2.2 – Objetivos Específicos.....	58
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.1 – Leveduras utilizadas e meios de cultura.....	59
3.2 – Condições de crescimento e fermentação em batelada.....	61
3.3 – Quantificação de biomassa celular.....	61
3.4 – Seleção dos genes e construção dos plasmídeos.....	63
3.5 – Transformação de bactérias e leveduras.....	66
3.6 – Análise de fragmentos de DNA em gel de agarose.....	68
3.7 – Ensaio de transporte com ¹⁴ C-D-glicose e ¹⁴ C-D-xilose.....	68
3.8 – Ensaio de Co-transporte.....	69
3.9 – Determinação da atividade enzimática.....	69
3.10 – Truncagem de transportadores.....	70
3.11 – Hidrólise enzimática da xilana.....	71
3.12 – Determinação dos substratos e produtos das fermentações..	71
3.13 – Modelagem e <i>docking</i> molecular.....	71
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1 – Clonagem e caracterização de transportadores de xilose	72
4.2 – Identificação e clonagem de enzimas e transportadores para celobiose e xilobiose.....	108
5 – CONCLUSÕES.....	124
6 – REFERÊNCIAS.....	125

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Etanol de segunda geração no Brasil

O mundo está enfrentando uma redução dos recursos mundiais de combustíveis fósseis como petróleo, gás natural e carvão vegetal. Por outro lado, as necessidades energéticas continuam crescendo progressivamente. Neste sentido, a busca por alternativas sustentáveis para a produção de combustíveis a partir de matérias primas não fósseis tem atraído um interesse considerável em todo o mundo, tanto para enfrentar as necessidades de abastecimento de energia, quanto para dar respostas às questões ambientais (Gupta & Verma, 2015). Vários biocombustíveis têm sido considerados, mas bioetanol permanece como a alternativa amplamente utilizada para a substituição dos combustíveis convencionais por diversas razões, incluindo seu valor de alta octanagem, combustão eficiente e diminuição dos gases de efeito estufa (*greenhouse gas* - GHG) (Jimenez *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2010). Atualmente, o bioetanol de primeira geração (1G) é produzido a partir do amido ou da fração de sacarose de algumas culturas agrícolas comestíveis tais como o milho, cana-de-açúcar, beterraba, entre outros (Sebayang *et al.*, 2016). Segundo o *Department of Energy* (DOE), o etanol produzido a partir de fontes como o milho, por exemplo, pode reduzir as emissões de GHG de 18% a 28% em comparação com a gasolina (Wang, 2007). Brasil e EUA são os maiores produtores de etanol, dominando 85% da produção mundial. Os EUA lideram a produção mundial produzindo cerca 58 bilhões de litros na safra de 2016 (RFA, 2017), seguido pelo Brasil com expectativa de produção na safra 2017/2018 de aproximadamente 26 bilhões de litros de bioetanol (CONAB, 2017). Apesar de ser o segundo líder, o Brasil pode se tornar o principal produtor nesta promissora indústria mundial de etanol, dada a sua capacidade tecnológica nas diferentes etapas da cadeia de combustível, que, aliada a condições climáticas e do solo favoráveis, resulta em custos de produção mais barato (Szklo *et al.* 2007), gastando cerca de US \$ 0,18-0,20 por litro em relação aos EUA (US \$ 0,33 a 0,47 por litro) (Sebayang *et al.*, 2016).

O etanol desempenha papel importante na economia brasileira e o uso dele como combustível no Brasil teve início na década de 1970 com o Programa Nacional do Alcool (PROALCOOL), representando uma estratégia do governo brasileiro em resposta à crise mundial do petróleo, com altos preços internacionais e aos baixos preços do açúcar no mercado (Goldemberg, 2006, 2008). A partir daí, a estipulação do

governo de seu uso obrigatório na mistura com a gasolina (atualmente de 27%) juntamente com a introdução, em 2003, da frota de automóveis *flexfuel* no país, impulsionaram ainda mais o sua produção ao longo dos anos (Goldemberg, 2008). Navigant Research (2014), prevê que o consumo global de biocombustíveis no setor de transporte rodoviário passará de 122,6 bilhões de litros por ano (dados de 2013) para mais de 193,41 bilhões de litros por ano em 2022, o que aumentará ainda mais a demanda por biocombustíveis. No entanto, a crescente demanda por etanol de primeira geração requer alta produção de matéria-prima, levando a preocupações com as questões relacionadas a alimentos versus combustível e, principalmente, com aumento do uso da terra e o uso da água para irrigação. Os biocombustíveis de segunda geração (2G) poderiam evitar muitas dessas preocupações, uma vez que depende de fontes biológicas não alimentares como as lignocelulósicas, que incluem palha de milho, bagaço e palha de cana-de-açúcar, palha de trigo, entre outras (Van Maris *et al.*, 2006).

Esses materiais lignocelulósicos são relativamente baratos e estão disponíveis em grandes quantidades. Um dos materiais lignocelulósicos mais utilizados para a produção de etanol de segunda geração é o bagaço de cana-de-açúcar (Ojeda *et al.* 2011, Rabelo *et al.* 2011). De acordo com a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA, 2012), cada tonelada de cana-de-açúcar moída para a fabricação de açúcar e etanol gera, em média, 250 kg de bagaço e 200 kg de palha. Estima-se que a utilização desta biomassa poderia aumentar a produtividade do etanol de primeira geração (1G) em até 50% sem aumentar as áreas de cultivo, considerando que o montante de açúcares encontrados na biomassa da cana de açúcar pode ser recuperado e fermentado com 90% de eficiência (Pessoa *et al.*, 2005; Zanin *et al.*, 2000). Além disto, o etanol produzido a partir da utilização da fração celulósica da biomassa, pode diminuir os GHG em 87% comparado com a gasolina (Wang, 2007). No caso do Brasil, a produção de bioetanol a partir do bagaço e da palha de cana é uma estratégia promissora, uma vez que já possuímos fabricas de etanol e um plantio de cana bem estabelecida no país, produzindo uma grande quantidade destes resíduos lignocelulósicos provenientes dessa produção (Cortez, 2010).

Em meados de 2015, 67 biorrefinarias em todo o mundo produziam etanol 2G, biodiesel ou biocombustível de aviação. Mais de um terço desses (24) estavam operando em escala comercial (Tabela 1). No Brasil, existem quatro biorrefinarias de etanol 2G em operação, três delas estão produzindo em uma escala comercial (Tabela 2), somando uma capacidade de produção de aproximadamente 182 milhões de litros por ano (Nguyen *et al.* 2017; UNCTAD, 2016).

Tabela 1 – Número de biorrefinarias 2G operando no mundo.

Região	Piloto	Demonstração	Comercial	Total
África	5	0	3	8
Ásia-Oceania	6	5	4	15
Europa	7	7	5	19
América do Norte	5	6	9	20
América do Sul	1	1	3	5
Total	24	19	24	67

Fonte: adaptado de Nguyen *et al.* 2017

Tabela 2 – Lista de plantas de etanol 2G operando no Brasil

Nome	Localização	Fonte	Escala	Status
Bioflex (GranBio)	Alagoas	Bagaço, palha	Comercial	Operando desde 2014
Dedini	São Paulo	Bagaço	Demonstração	Operando desde 2002
Iogen	São Paulo	Bagaço	Comercial	Operando desde 2015
Raizen	São Paulo	Bagaço	Comercial	Operando desde 2015

Fonte: adaptado de Nguyen *et al.* 2017

É importante ressaltar que o Brasil é único país da América do Sul a produzir etanol de segunda geração, apesar de vários deles terem estabelecidos mandatos ou metas para o aumento do uso de combustíveis renováveis (Tabela 3). Dado o interesse do Brasil em reduzir as importações de gasolina, espera-se que novos investimentos ocorram em usinas de etanol em médio prazo (UNCTAD, 2016). Milanez e colaboradores (2015) estimaram as perspectivas para a produção de etanol de segunda geração no Brasil até 2025 (Tabela 4). As previsões levam em consideração um cenário em que políticas públicas são implementadas para incentivar a produção e o consumo de etanol de segunda geração. Neste cenário, seria possível adicionar mais 10 bilhões de litros de etanol 2G a cada ano.

Tabela 3 – Política atual para biocombustíveis na América do Sul

País	Utilização atual	Objetivo
Argentina	E5, B10	
Brasil	E27, B7	B10 e E27.5
Colômbia	E8	E10
Chile	E5, B5	E5
Equador	B5	E10
Paraguai	E25, B1	E27.5
Peru	E7.8, B2	
Uruguai	E5, B2	

* Números após "E" referem-se a porcentagem de biocombustível em mistura com gasolina. "B" refere-se ao biodiesel . Fonte: Biofuel Digest (2016)

Tabela 4 – Potencial de produção de etanol 2G no Brasil (bilhões de litros) por tipo de investimento.

Tipo de investimento	Potencial de produção (bilhões de litros)		
	2016-2020	2021-2025	Total
Modernização das usinas existentes para etanol 2G	2.5	2.5	5.0
Expansão das usinas com etanol 2G	0.8	0.8	1.5
Novas usinas com etanol 2G	0.0	3.5	3.5
Total	3.3	6.8	10.0

Fonte: Milanez *et al.*, (2015)

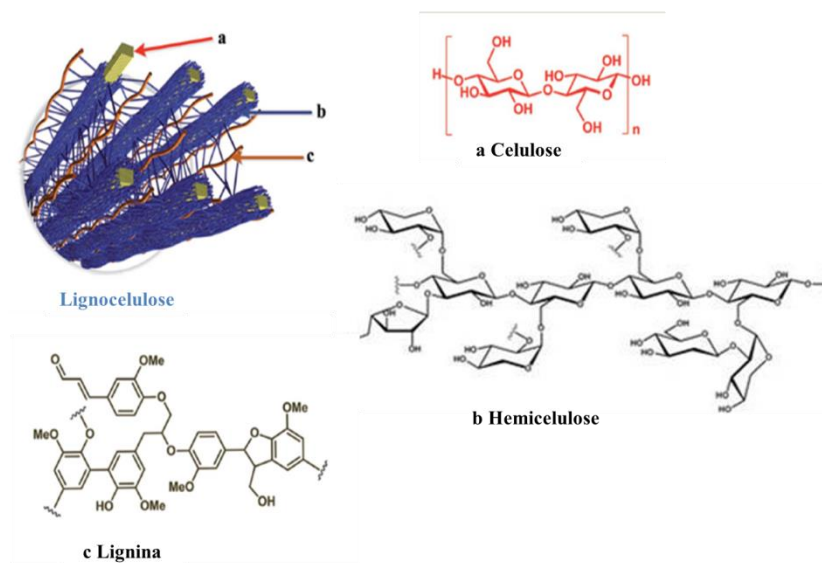
As biorrefinarias de segunda geração estão operando em todas as regiões do mundo, trazendo balanços de energia muito mais favoráveis para a produção de biocombustíveis do que já foram realizados anteriormente. A substituição de uma parcela significativa dos combustíveis fósseis demonstrou ser uma possibilidade realista, no entanto, diante dos baixos preços do petróleo e o apoio político contínuo, investimentos em pesquisa e desenvolvimento serão

necessários para permitir que os biocombustíveis alcancem todo seu potencial.

1.2 - Lignocelulose como fonte de açúcares fermentáveis

A biomassa lignocelulósica é um material renovável que pode ser convertido em biocombustíveis e outros produtos químicos intermediários através de várias rotas de conversão (Liu *et al.*, 2012). Esta é formada por biopolímeros como celulose, hemicelulose e lignina (10-24%) (Putro *et al.*, 2016) (Figura 1).

Figura 1 – Estrutura da lignocelulose, constituída por celuloses embutidas em uma matriz de hemiceluloses e moléculas de lignina



Fonte: Adaptado de Sebayang *et al.* (2016).

Estima-se que cerca de 10-50 bilhões de toneladas de biomassa lignocelulósica sejam produzidas anualmente em todo o mundo e a sua composição é altamente dependente de suas fontes, variando de uma espécie de planta para outra (Tabela 5) (Sánchez & Cardona, 2008).

Tabela 5 - Composição da lignocelulose em base seca.

Materiais lignocelulósicos	Celulose %	Hemicelulose %	Lignina %
Resto de madeiras	40-50	25-35	25-35
Palha de milho	45	35	15
Palha de trigo	30	50	15
Bagaço de cana-de-açúcar	42	25	20

Fonte: Sharma *et al.* (2017).

A celulose é um homopolissacarídeo linear não ramificado, composto por resíduos de D-glicose, unidos por ligações $\beta(1-4)$ (Pérez *et al.*, 2002). Na natureza a celulose forma uma estrutura parcialmente cristalina na qual as cadeias individuais formam um rearranjo compacto e estabilizado por ligações de hidrogênio, proporcionando resistência mecânica e estabilidade química às plantas (Faulon *et al.*, 1994). A celulose é um componente estrutural importante das paredes celulares das plantas, dessa forma, são os biopolímeros naturais mais abundantes encontrados na Terra.

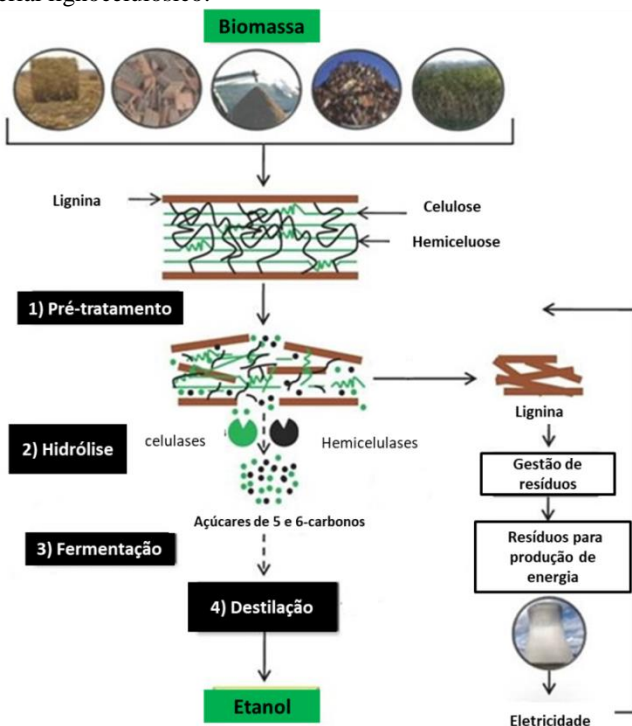
As hemiceluloses são polissacarídeos ramificados e de menor massa molar que a celulose, composta por uma mistura heterogênea de pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e ácidos de açúcares (ácidos 4-O-metilglucurônico, galacturônico e glucurônico) (Joy *et al.*, 2016). O termo hemicelulose é um termo geral. Ele é usado para representar uma família de polissacarídeos, como arabino-xilanos, gluco-mananos, galactanos e outros que são encontrados na parede celular da planta e têm diferentes composições e estruturas dependendo da fonte e do método de extração. O tipo mais comum de polímeros que pertence à família hemicelulose de polissacarídeos é a xilana. Esta é composta por moléculas de xilopiranosil ligadas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ e por unidades de $\alpha(4-O)$ -metil-D-glicuronopiranosil unidas a unidades de anidroxilose. O resultado é uma cadeia polimérica ramificada que é composta principalmente por monômeros de açúcares de cinco carbonos e em menor grau, monômeros de açúcares de seis carbonos (Whistler & Richards, 1970; Zhang *et al.*, 2012).

A lignina é um hetero-biopolímero complexo, amorfo, insolúvel em água, constituído por unidades de fenilpropano juntas por ligações carbono-carbono e aril-éter (Pérez *et al.*, 2002). Esta unidade fenilpropanóide da lignina é o principal gargalo da quebra da biomassa

lignocelulósica, uma vez que fornece para a planta suporte estrutural, impermeabilidade e proteção contra a invasão microbiana, conferindo rigidez à estrutura. (Mussatto, 2016).

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica é realizada por um processo de quatro etapas (Figura 2): (1) pré-tratamento químico, físico ou biológico da biomassa; (2) hidrólise das fibras de celulose da hemicelulose; (3) fermentação; (4) destilação do produto final (Hasunuma e Kondo, 2012).

Figura 2 – Etapas para disponibilização dos açúcares fermentáveis presente no material lignocelulósico.



FONTE: Adaptado de Dashtbam *et al.*, 2009

O pré-tratamento visa reduzir a cristalinidade da lignocelulose a fim de tornar as fibras acessíveis. Existem vários métodos de pré-tratamento como físico, químico, biológico e/ou sua combinação. O objetivo de qualquer método de pré-tratamento é desestruturar a celulose, hemicelulose e lignina de modo que os polímeros estejam

Tabela 6 - Comparação de métodos de pré-tratamentos

Pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens
<p>Pré-tratamento físico: Moagem, corte, irradiação, pré-tratamento ultrassônico</p>	<p>Útil para obter o tamanho de partícula desejado, aumentando a área de superfície. Não é necessário nenhum químico. Eficaz na redução da cristalinidade da celulose, ajuda a hidrólise enzimática.</p>	<p>Custos operacionais elevados; altas chances de depreciação do equipamento; não é adequado para remoção de lignina, demanda energética.</p>
<p>Pré-tratamento químico: Água líquida quente</p>	<p>Nenhum catalisador envolvido; redução do tamanho da matéria-prima pela desestruturação dos componentes lignocelulósicos, principalmente a hemicelulose; hidrata a celulose e torna-a mais acessível às enzimas hidrolíticas; também remove parte da lignina e possui alta recuperação de xilooligossacarídeos.</p>	<p>Alta demanda de água e energia; O pré-tratamento em várias etapas a baixa temperatura e o tempo de permanência prolongado são necessários para recuperar hemicelulose e seus valiosos açúcares</p>
<p>Ácidos HCL, H₂SO₄, HNO₃</p>	<p>Um poderoso agente para remoção de hemiceluloses e lignina; A concentração de ácidos tem seu papel significativo no pré-tratamento; os ácidos diluídos são mais favorecidos no pré-tratamento que removem efetivamente a hemicelulose, maximizam o rendimento de açúcares e podem alterar a estrutura da lignin; alguns ácidos como H₂SO₄ e HCl são baratos.</p>	<p>Os ácidos são corrosivos e é crucial reciclar para reduzir o custo; a formação de produtos de degradação como a furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácidos levulínicos e ácido fórmico formados a partir de celulose e hemicelulose juntamente com ácidos orgânicos da degradação de lignina atuam como inibidores que afetam os estágios subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação; requer alta temperatura e recipientes de reação específicos, o que é dispendioso.</p>
<p>Solvente orgânico Metanol, etanol, etilenoglicol, acetona, ácido oxálico,</p>	<p>Ajuda na remoção de lignina e hemicelulose, melhora a retenção e digestibilidade enzimática da celulose.</p>	<p>Alto custo de solvente e catalisador; maiores chances de impacto ambiental; alguns são inflamáveis.</p>

Alcalina

Hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio, hidróxido de amônio	Importante na remoção de lignina da biomassa e expõe os polissacarídeos, em algum momento também quebra a celulose cristalina; aumenta a superfície e torna a hidrólise mais rápida.	Alto custo operacional, formação de inibidores; geralmente, não é adequado para biomassa lignocelulósica; requer produtos químicos e geralmente tem condições severas
Deslignificação oxidativa Ozônio, oxidação úmida, peróxido de hidrogênio, ácido peracético	Remove hemicelulose e lignina da biomassa; melhorar a retenção e digestibilidade enzimática da celulose; formação muito baixa de compostos inibidores de enzimas.	Alto custo operacional; Os ácidos formados no processo atuam como inibidores na fermentação; partes de hemicelulose são perdidas.
Pré-tratamento físico-químico: Explosão; Explosão a vapor, explosão a fibra de amônia, explosão a CO ₂ , explosão a SO ₂	Baixa utilização de químicos e consumo de energia; ruptura da hemicelulose e lignina; os ácidos ajudam a melhorar a hidrólise; aumenta o acesso da superfície e a digestibilidade enzimática da celulose; adequado para aplicação industrial.	Os produtos de degradação podem inibir processos adicionais; precisa de alta pressão; baixo rendimento, mas alto consumo de energia; chances de perigos químicos.
Pré-tratamento biológico: Bactérias e fungos	Respeito ao meio ambiente, exigência de pouca energia, econômica, sustentável, sem necessidade de químicos, útil na hidrólise de celulose, hemicelulose e lignina.	Processo lento, hidrólise parcial da hemicelulose; chances de perigo para a saúde.

Fonte: Adaptado de Sharma *et al.* (2017)

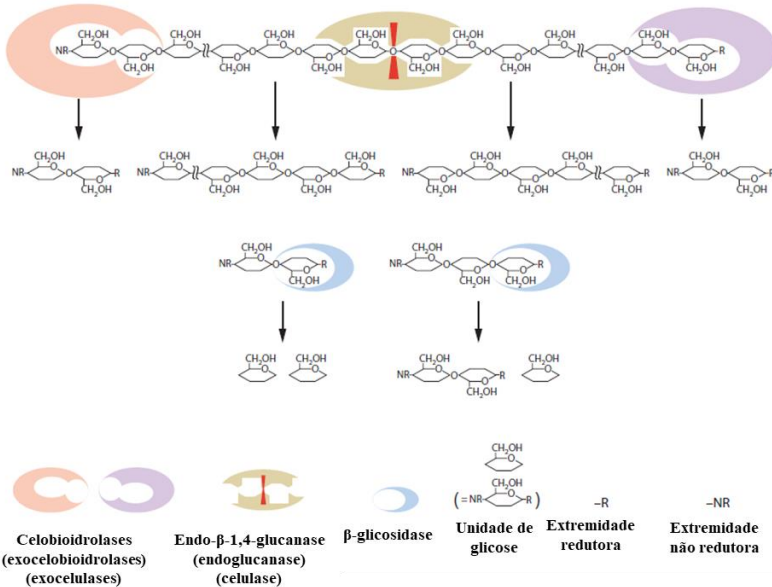
1.3 - Disponibilização dos carboidratos presentes no material celulósico e hemicelulósico

Para que os açúcares fermentáveis presentes na biomassa vegetal estejam disponíveis para a fermentação, é necessária a etapa da hidrólise enzimática, que acontece pela ação sinérgica de uma gama de enzimas como as celulases, hemicelulases.

As enzimas responsáveis pela sacarificação da celulose são as celulases. As celulases são um subgrupo de glicosil hidrolases (GH) (EC 3.2.1.x) que catalisam a clivagem específica das ligações $\beta(1-4)$ da celulose (Henrissat *et al*, 1997). O mecanismo mais aceito para a hidrólise completa da estrutura da celulose envolve um complexo enzimático atuante, constituído por endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (Figura 4). As endoglucanases pertencem às famílias GH (5-8, 12, 16, 44, 45, 48, 51, 64, 71, 74, 81, 87, 124 e 128) e catalisam a hidrólise em regiões amorfas das ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ intramolecular, acessíveis na cadeia de celulose. As exoglucanases estão relacionadas às famílias GH (5-7 e 48) e catalisam a clivagem das extremidades da cadeia, liberando celobiose ou glicose. Por fim, as β -glicosidases são encontradas nas famílias GH (1, 3, 4, 17, 30 e 116) e finalmente catalisam a hidrólise da celobiose em glicose, eliminando a efeito inibidor da celobiose sobre as endo e exoglucanases (Dashtban *et al*, 2010; Maki *et al*, 2009; Srivastava *et al.*, 2017).

A hidrólise da hemicelulose, assim como na celulose, prossegue pela ação de várias enzimas para liberação dos açúcares simples. As hemicelulases podem ser categorizadas em 29 famílias do grupo GH e 9 famílias do grupo carboidrato esterase (CE). Os grupos GH, hidrolisam as ligações glicosídicas enquanto os CE hidrolisam as ligações éster de grupos de acetato ou ácido ferúlico (Sweeney *et al.*, 2012). A complexidade da estrutura da hemicelulose determina a complexidade enzimática que será necessária para degradá-la. As xilanases são as responsáveis pela hidrólise da espinha dorsal da xilana e a maioria delas podem ser encontrada nas famílias GH5, 7, 8, 10, 11 e 43, mas, de acordo com CAZy (Lombard *et al.*, 2014), podem aparecer em outras famílias como 16, 51, 52, 62. Entretanto, estão em sua maioria nas famílias GH10 (41%) e GH11(55%) (Adelsberger, 2004; Bouraoui *et al.*, 2016; Collins *et al.*, 2005; Biely *et al.*, 1997).

Figura 4 – Figura esquemática da biodegradação de celulose. As celobiohidrolases atuam sobre nas extremidades redutoras e não redutoras das fibras de celulose para liberar de forma processual a celobiose. Endo- β -1,4-glicanases separam aleatoriamente as cadeias de celulose. As β -glicosidases hidrolisam celobiose ou celo-oligômeros em glicose a partir das extremidades redutoras.



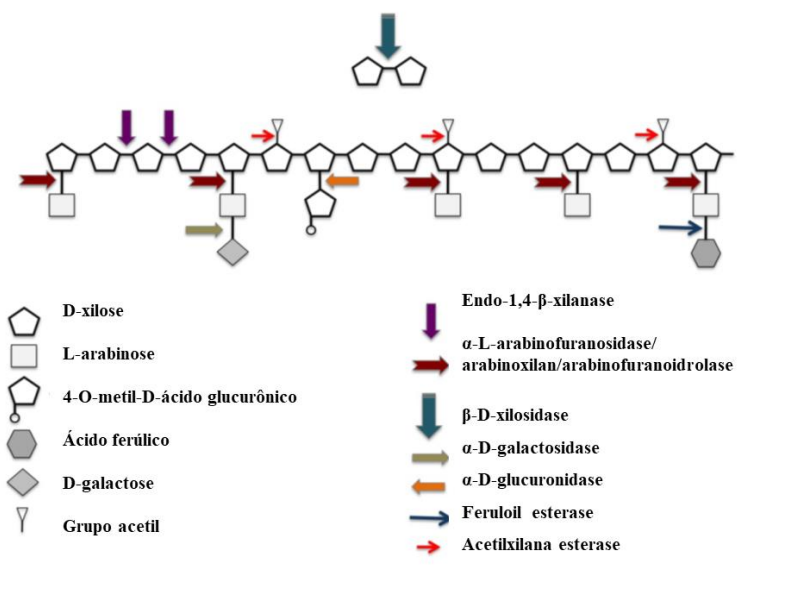
Fonte: Adaptado de Watanabe & Tokuda (2010)

As principais enzimas envolvidas na hidrólise do esqueleto xilana, são endo-1,4- β -xilanases (EC 3.2.1.8) e β -xilosidase (EC 3.2.1.37) (Figura 5). As endo-1,4- β -xilanases cliva as ligações glicosídicas no esqueleto de xilana, provocando uma redução no grau de polimerização do substrato (Li *et al.*, 2000). Inicialmente, os principais produtos de hidrólise são os oligômeros de D-xilopiranosil (XOS), mas em uma fase posterior, moléculas pequenas, tais como mono-, di- e trissacarídeos de β -D-xilopiranosil, podem ser produzidas (Polizeli *et al.*, 2005). As β -xilosidases hidrolisam pequenas moléculas de XOS e xilobioses, liberando resíduos β -D-xilopiranosil da extremidade não redutora. Seu melhor substrato é a xilobiose e sua afinidade por XOS é inversamente proporcional ao seu grau de polimerização (Polizeli *et al.*, 2005).

A conversão da xilana requer ainda a ação de enzimas acessórias como: arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55), que clivam as ligações entre

os resíduos laterais de arabinofuranoses; glucuronidasas (EC 3.2.1.139), que clivam as ligações glicosídicas do tipo α -1,2 entre os ácidos glucurônicos laterais; acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72), que clivam as ligações entre os ácidos acéticos e os C-2 e C-3 dos resíduos de xilose; ácido cumárico esterases e ácido fenólico esterases que clivam as ligações do tipo éster entre ácidos cumáricos e ácidos fenólicos e os resíduos de arabinofuranoses. Todas estas enzimas atuam cooperativamente para converter a xilana em unidades de xilose e outros monossacádeos (Gírio *et al.*, 2010; Sánchez, 2009; Polizeli *et al.*, 2005). Estas são produzidas por fungos, bactérias, leveduras, algas marinhas, protozoários, caracóis, crustáceos, insetos, sementes, entre outros. (Sunna e Antranikian, 1997).

Figura 5 – Esquema sobre um sistema hemicelulolítico, descrevendo a degradação de uma hemicelulose. As setas representam cada enzima ativa para um substrato determinado.



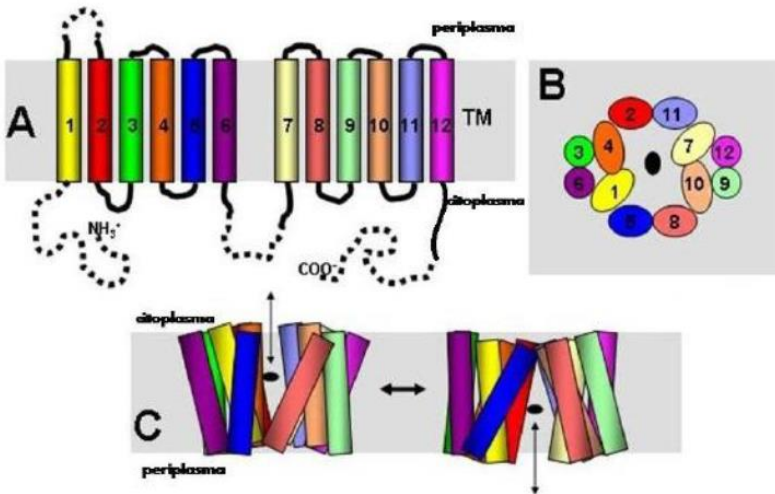
Fonte: Adaptado de de Souza (2013)

Os fungos filamentosos são produtores particularmente interessantes de xilanasas, uma vez que excretam as enzimas no meio e seus níveis de enzimas são muito superiores aos de leveduras e bactérias (Kulkarni *et al.*, 1999).

1.4 - Transporte de açúcares e sistemas de transporte em *S. cerevisiae*

Os transportadores de açúcares são proteínas transmembranas ancoradas na membrana celular (Martin-Galiano e Frishman, 2006) e pertencem à família de transportadores *Major Facilitador Superfamily* (MFS), que é a maior superfamília de transportadores classificados. A MFS é amplamente distribuída em todos os filios e já foram classificados pelo menos 74 famílias (Reddy *et al.*, 2012). Os transportadores caracterizam-se pela presença de 12 segmentos transmembranas em α -hélices hidrofóbicas, conectadas entre si por *loops* hidrofílicos atravessando a membrana em ziguezague, com sequências amino e carboxi-terminal longos e voltados para o citoplasma da célula (Figura 6) (Henderson, 1993; Saier, 2000).

Figura 6 – Estrutura secundária dos transportadores de açúcares pertencente à família MFS. (A) arranjo dos 12 segmentos transmembrana em dois domínios. (B) posição dos 12 segmentos no plano da membrana (substrato representado pela esfera preta). (C) modelo de acesso alternante para o transporte do substrato.



Fonte :adaptado de Abramson *et al.* (2003) e Sorgen *et al.* (2003)

Embora haja diferenças nas sequências primárias das proteínas pertencentes à MFS, elas partilham uma estrutura tridimensional bastante similar (Law; Moloney & Wang, 2009). Assim, acredita-se que todos os membros de MFS compartilham estruturas preservadas, mas

com diferentes sequências de aminoácidos (Vardy *et al.*, 2004) e com diferentes especificidade pelo substrato que é resultante da variação no conjunto de resíduos presentes nos domínios de translocação e de ligação do substrato (Kasahara e Kasahara, 2010; Madej *et al.*, 2013).

Os transportadores podem captar os açúcares através de dois diferentes sistemas: difusão facilitada, sem gasto de energia e a favor do gradiente de concentração, ou por transporte ativo, com gasto de energia e contra o gradiente de concentração. Estes transportadores ativos, transportam juntamente com o açúcar um ou mais prótons através da membrana, esse co-transporte pode ser na mesma direção do açúcar (simporte) ou em direção contrária do açúcar (antiporte) (Baldwin, 2000; Lagunas, 1993; Kotyk, 1997). Além disso, os transportadores podem ser classificados conforme sua afinidade pelo substrato: baixa, moderada ou alta afinidade. Transportadores de baixa afinidade apresentam elevado K_m e geralmente são expressos quando o açúcar está presente em altas concentrações. Já os de alta afinidade são expressos em meios com pouco açúcar e são reprimidos e inativados por altas concentrações de açúcares (Bisson e Fraenkel 1983a, 1983b; Du Preez *et al.*, 2000; McClellan & Bisson, 1988).

Em *S. cerevisiae* existem os 2 tipos de transporte de açúcares: difusão facilitada e transporte ativo do tipo simporte. O transporte por difusão facilitada acontece através dos transportadores da família dos *HXTs*, esta família compreende 20 genes envolvidos no transporte de hexoses (*HXT1-HXT17*, *GAL2*, *SNF3*, *RGT2*). O *GAL2* é um transportador para galactose que é expresso apenas na presença desse açúcar, enquanto os genes *HXT1-7* codificam as principais permeases responsáveis pelo transporte de glicose, frutose e manose. Os genes *SNF3* e o *RGT2* codificam proteínas que atuam como sensores de glicose extracelular e estão envolvidos na regulação dos outros genes *HXTs*. O *SNF3* sinaliza baixos níveis de glicose, sendo requerido para indução de genes que codificam transportadores de hexoses de alta afinidade, enquanto que o *RGT2* funciona como sensor de altos níveis glicose, sendo requerido na indução da expressão dos genes de transportadores *HXTs* de baixa afinidade. Eles possuem uma longa calda C-terminal citoplasmática, ausente nos transportadores de glicose, que é relacionada à transmissão de sinal induzindo a maquinaria de transcrição (Gancedo, 2008; Johnston & Kin, 2005; Laguna, 1993; Ozcan & Johnston, 1999; Santangelo, 2006; Wieckorke *et al.*, 1999).

Já o sistema de transporte ativo do tipo simporte acontece através dos transportadores da família *MAL*, que transporta maltose com alta afinidade e inclui o transportador *AGT1* que, diferente dos demais

transportadores *MAL*, possui alta afinidade para sacarose e baixa afinidade para maltose e maltotriose (Elbing *et al.*, 2004; Laguna, 1993; Michels e Needleman, 1984; Van Der Rest, 1995). Para que uma cepa de *S. cerevisiae* seja capaz de utilizar maltose é necessário a presença de pelo menos um dos cinco *loci MAL* existente nessa levedura. Esses *loci MAL* são constituídos por três genes necessários para o metabolismo da maltose: Transportador de maltose (*MALx1*) (x representa o lócus); maltase (*MALx2*) e a proteína reguladora (*MALx3*) que induz a expressão dos genes *MAL* na presença de maltose (Needleman, 1991; Novak *et al.*, 2004). Esta organização em cluster dos genes *MAL* é fortemente reprimida na presença de glicose (Hu *et al.*, 1995; Kim & Michels, 1988; Wang & Needleman, 1996)

A regulação dos transportadores em *S. cerevisiae*, bem como a repressão catabólica causada por glicose, será melhor abordada no item 1.7 deste trabalho.

1.5 - A utilização de xilose por *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é o organismo mais utilizado para a produção de bioetanol, por possuir várias vantagens frente a outros micro-organismos como: tolerância a altas concentrações de etanol, baixo pH, elevada pressão osmótica e também por ser um micro-organismo preferencialmente fermentativo, possuindo excelentes capacidades fermentativas (Auesukaree *et al.*, 2009; Knoshaug *et al.*, 2009; Crabtree, 1929). Porém, esta não é capaz de nativamente metabolizar a xilose.

A assimilação de xilose requer a isomerização de xilose em xilulose e posterior fosforilação de xilulose em xilulose-5-fosfato, que é um metabolito de entrada para a via das pentoses fosfato (PPP). Os micro-organismos fermentadores de xilose utilizam duas vias distintas: a via oxirredutase e a via da isomerase, para conversão de xilose em xilulose (Figura 7). As leveduras fermentadoras de xilose empregam a via oxirredutase composta por duas reações enzimáticas da xilose redutase (XR, EC 1.1.1.30) e xilitol desidrogenase (XDH, EC 1.1.1.9), que convertem a xilose em xilulose via xilitol. As cepas fermentadoras de xilose assimilam xilose principalmente em condições aeróbicas. A XR pode ter atividade tanto com cofator NADPH como NADH, liberando NADP⁺ ou NAD⁺, respectivamente (Lee, 1998). Já a enzima xilitol desidrogenase, utiliza como substrato estritamente NAD⁺, liberando NADH. Esta estrita especificidade da enzima xilitol desidrogenase é um fator limitante na fermentação da xilose, pois causa

um desbalanço de cofatores, resultando em um acúmulo de xilitol e perda do rendimento de etanol (Rizzi, *et al.*, 1989). Por outro lado, a via da isomerase consiste em uma reação enzimática da xilose isomerase (XI, EC 5.3.1.5). XI catalisa várias inter conversões de aldoses e cetoses incluindo xilose e xilulose sem requerimento de cofactor. E por fim, a xilulokinase (XK, EC 2.7.1.17) catalisa a fosforilação de xilulose para xilulose-5-fosfato, um intermediário da via não-oxidativa das PPP (Figura 7).

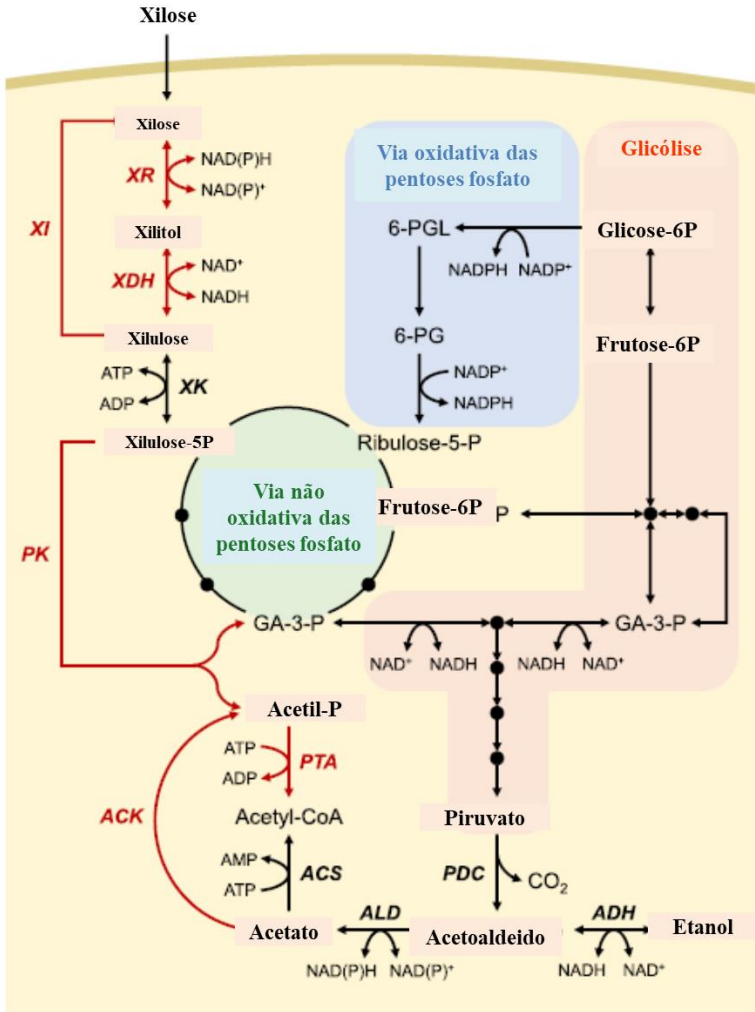
A via PPP é uma via metabólica universal que usa xilulose-5-fosfato como intermediário metabólico. Pode ser dividido em duas fases distintas, uma fase oxidativa e uma fase não oxidativa. As leveduras metabolizam xilulose-5-fosfato através da via não-oxidativa (Figura 7) e formam vários açúcares fosforilados de três, quatro, cinco, seis e sete carbonos que servem como intermediários da glicólise ou precursores de componentes celulares tais como nucleotídeos e aminoácidos (Stincone *et al.*, 2015). A via oxidativa é uma via importante para a regeneração de NADPH que funciona como força motriz para a atividade XR e também como um mecanismo de proteção contra estresses oxidativos (Stincone *et al.*, 2015; Grant *et al.*, 1996) (Figura 7). O Xilulose-5-fosfato também pode ser metabolizado através da ação da fosfocetolase (PK, EC 4.1.2.9) em várias leveduras fermentadoras de xilose, incluindo *Candida tropicalis*, *Rhodotorula graminis* e *Rhodotorula glutinis* (Whitworth *et al.*, 1997), embora a via PK seja mais comum em procariotos (Sánchez *et al.*, 2010). PK cliva xilulose-5-fosfato para formar gliceraldeído-3-fosfato e acetil fosfato. (Figura 7),

Gerar uma cepa de *S. cerevisiae* que utiliza xilose, especialmente em uma mistura de glicose/xilose, tem sido objeto de extensa pesquisa por várias décadas. Duas abordagens são agora utilizadas rotineiramente para viabilizar a utilização de xilose em *S. cerevisiae*: a sobre-expressão de uma xilose isomerase (XI) heteróloga (Brat *et al.*, 2009; Kuyper *et al.*, 2003; Madhavan *et al.*, 2009), ou a sobre-expressão heteróloga de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), juntamente com a sobre-expressão heteróloga ou endógena da xilulocinase (XK) (Jeffries, 2006; Jeffries & Jin, 2004; Kotter *et al.*, 1990).

Embora as duas vias utilizadas apresentem problemas e desafios a serem superados, vários trabalhos têm demonstrado a superação dessas dificuldades (Cadete *et al.*, 2016; dos Santos *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2012; Matsushika *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2012). Apesar de *S. cerevisiae* com a via XR-XDH-XK apresentar maior velocidade de assimilação de xilose e produção de etanol do que *S. cerevisiae* com a via XI (Karhumaa *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2016), o

melhor desempenho fermentativa com maior rendimento de etanol encontrado até agora foi obtido utilizando uma linhagem de *S. cerevisiae* recombinante com XI (Zhou *et al.*, 2012) (Tabela 7)

Figura 7 – Visão geral das vias de assimilação de xilose em leveduras. Os itens vermelhos indicam caminhos metabólicos heterólogos que foram introduzidos em *S. cerevisiae*. 6-PGL (6-fosfoglucono-1,5-lactona), 6-PG (6-fosfogluconato), GA-3-P (gliceraldeído-3-fosfato).



Fonte: Adaptado de Kwak & Jin (2017)

Tabela 7 - Comparação dos desempenhos fermentativos de *S. cerevisiae* xilose-fermentadoras recombinantes.

Cepa	Descrição	Velocidades do consumo de xilose	Velocidades de produção de etanol	Rendimento de etanol	Referência
H131-A3-AL	<i>XI (Piromyces XYLA) SsXYL3, SsTAL1, TKL1, RPE1, RKII</i>	1.866 (g g ⁻¹ h ⁻¹)	0.765 (g g ⁻¹ h ⁻¹)	0.41	Zhou <i>et al.</i> , 2012
SXA-R2P-E	<i>XI (mutant Piromyces XYLA) SsTAL1, Agre3, Δpho13</i>	0.077(g OD ⁻¹ h ⁻¹)	0.033 (g OD ⁻¹ h ⁻¹)	0.452	Li <i>et al.</i> , 2016
SR8	<i>XR-XDH (SsXYL1, SsXYL2) SsXYL3, Δald6, null mutant of pho13</i>	0.129 (g OD ⁻¹ h ⁻¹)	0.046 (g OD ⁻¹ h ⁻¹)	0.378	Li <i>et al.</i> , 2016
TMB 3422	<i>XR-XDH (mutant SsXYL1, SsXYL2) XKS1, TAL1, TKL1, RPE1, RKII, Agre3</i>	0.580 (g g ⁻¹ h ⁻¹)	0.180 (g g ⁻¹ h ⁻¹)	0.34	Cadete <i>et al.</i> , 2016
TMB 3504	<i>XR-XDH (SpXYL1.2, SsXYL2) XKS1, TAL1, TKL1, RPE1, RKII, Agre3</i>	0.760 (g g ⁻¹ h ⁻¹)	0.330 (g g ⁻¹ h ⁻¹)	0.4	Cadete <i>et al.</i> , 2016

Fonte: adaptado de Kwak & Jin, (2017)

Além da otimização das vias XI e XR-XDH-XK, modificações genéticas adicionais para induzir melhoras na fermentação de xilose foram identificadas através de abordagens de engenharia metabólica.

A via não oxidativa das pentoses fosfato foi hipotetizada como uma via limitante em *S. cerevisiae* modificada para fermentação de xilose, uma vez que seus intermediários foram acumulados quando cultivadas em xilose (Johansson *et al.*, 2002; Kötter & Ciriacy, 1993). Para superar a ineficiência desta via, enzimas como *RKII* (ribose-5-fosfato isomerase, EC 5.3.1.6), *RPE1* (ribulose-5-fosfato epimerase, EC 5.1.3.1), *TKL1* (transcetolase, EC 2.2.1.1) e *TAL1* (transaldolase, EC 2.2.1.2) (Figura 8) foram sobre-expressadas. A sobre-expressão dessas enzimas da via PPP não oxidativa levou a melhores velocidades de assimilação da xilose por *S. cerevisiae* que já expressavam a via XR-XDH-XK (Bera *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Walfridsson *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2016) ou a via XI (Karhumaa *et al.*, 2005; Kuyper *et al.*, 2005 (B); Zhou *et al.*, 2012).

O gene *PHO13* foi consistentemente identificado como o gene *knock-out* mais efetivo para melhorar as capacidades de fermentação de xilose de *S. cerevisiae* (Kim *et al.*, 2013; Ni *et al.*, 2007). A deleção do *PHO13* melhorou a velocidade de crescimento celular e a produtividade de etanol de cepas de *S. cerevisiae*, já com XR-XDH-XK ou XI, cultivadas em xilose (Fujitomi *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Van Vleet *et al.*, 2008). Embora as funções fisiológicas da *PHO13* ainda não são totalmente conhecidas, um estudo recente encontrou mudanças significativas nos padrões de transcrição de *S. cerevisiae* após a deleção de *PHO13*, em particular, na via de oxidativa das pentoses fosfato, e em outras vias de regeneração de NADPH e na *TAL1* (Kim *et al.*, 2015). Transaldolase é um gargalo da via não oxidativa das pentoses fosfato, resultando no acúmulo de substrato de sedoheptulose-7-fosfato e sedoheptulose, um metabolito durante a fermentação de xilose em *S. cerevisiae*. Curiosamente, a *PHO13* possui uma promíscua atividade de fosfatase na sedoheptulose-7-fosfato. Assim, a deleção do *PHO13* aumentou significativamente a fermentação de xilose e reduziu a acumulação de sedoheptulose-7-fosfato e sedoheptulose (Figura 8). Essas alterações fenotípicas da cepa deletada do *PHO13* podem ser reproduzidas de forma semelhante por única sobre-expressão do *TAL1* (Xu *et al.*, 2016).

Uma outra estratégia também empregada é a deleção de uma aldose redutase (*GRE3*), responsável por reduzir xilose à xilitol, podendo melhorar ainda mais utilização deste açúcar em linhagens que

cerevisiae, que sobre-expressavam seis enzimas metabólicas chave de xilose (incluindo XI, XKS, *TAL1* e *TKL1*). As mutações acumuladas ao longo do tempo resultaram em cinética de transporte de xilose muito alterada, duplicando V_{max} (de 15,8 para 32 mmol por peso seco por hora) e reduzindo K_m em 25% (de 132 para 99 mmol).

Diante de todas essas melhorias alcançadas com a otimização das vias de utilização da xilose em *S. cerevisiae*, podemos inferir que, atualmente, o transporte deste açúcar é o principal gargalo para sua eficiente utilização, especialmente em cepas metabolicamente otimizadas (Young *et al.*, 2010).

Sabe-se que *S. cerevisiae* não possui transportadores específicos para xilose, dessa forma, cepas de *S. cerevisiae*, modificadas com XR-XHD-XK ou XI, podem consumir xilose apenas através de transportadores de hexose nativos, como *HXT1*, *HXT2*, *HXT4*, *HXT5*, *HXT7* e *GAL2* (Saloheimo *et al.*, 2007; Sedlak & Ho, 2004). No entanto, a não especificidade destes transportadores por xilose – com muito menos afinidade por xilose em relação à glicose – torna o processo ineficiente, um vez que, em meios contendo a mistura glicose /xilose, a xilose será consumida apenas depois do esgotamento da glicose (Ho *et al.*, 1998; Jojima *et al.*, 2010; Kotyk, 1965). Assim, a utilização sequencial desses açúcares passa a ser um gargalo para construir uma levedura xilose-fermentadora, pronta para aplicações industriais.

Neste sentido, duas principais estratégias foram empregadas para superar esta capacidade limitada de transporte de xilose em *S. cerevisiae*: (1) engenharia dos transportadores endógenos e (2) busca por novos transportadores heterólogos de xilose.

Na tentativa de superar esta preferência por glicose à xilose, que acontece nestes transportadores endógenos, alguns trabalhos expressaram de forma constitutiva alguns deles e observaram um aumento na velocidade de transporte desta pentose (Gonçalves *et al.*, 2014; Hamacher *et al.*, 2002). Em outros trabalhos, foram abordados a engenharia evolutiva dos transportadores de hexose *HXT1*, *HXT36* (variante de *HXT3*), *HXT5*, *HXT7*, *HXT11* e *GAL2* para a assimilação da xilose (Farwick *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2015; Nijland *et al.* 2014, 2016). No entanto, apesar de observáveis melhorias na assimilação da xilose, esta continuou sendo consumida apenas depois da depleção da glicose na co-fermentação, mantendo o padrão sequencial de utilização nesta mistura. Em um trabalho recente, a construção de um transportador de hexose quimérico (transportador *HXT11/2*), foi descrito como um eficiente transportador, melhorando a fermentação da linhagem na mistura glicose/xilose mesmo na presença de ácido acético

(Shin *et al.*, 2017). Contudo, a velocidade de assimilação da xilose continuou lenta e só começou depois que a concentração de glicose havia caído quase pela metade.

Os micro-organismos que naturalmente conseguem crescer em material lignocelulósico são considerados boas fontes de genes para buscar transportadores heterólogos de pentoses, para serem empregados em *S. cerevisiae* (Leandro *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2010). Na última década, mais de 80 transportadores heterólogos já foram expressos em *S. cerevisiae*. Dentre estes podemos destacar os transportadores de: (I) *Scheffersomyces stipitis*: *SUT1*, *SUT2*, *XUT1*, *XUT3*, *XUT4*, *Xyp29* (*STL12*), *SUT3*, *QUP2* e *HXT2.6* (de Sales *et al.*, 2015; Du *et al.*, 2010; Jeffries *et al.*, 2007; Weierstall *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2011); (II) Os transportadores de *Candida intermedia*: *GXS1* e *GXF1* (Leandro *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2011); (III) o *At5g59250* de *Arabidopsis thaliana* (Hector *et al.*, 2008); (IV) os transportadores de *Neurospora crassa*: *An29-2* e *An25* (Du *et al.*, 2010); (V) o *xtrD* de *Aspergillus nidulans* (Colabardini *et al.*, 2014); (VI) *MgT05196* de *Meyerozyma guilliermondii* (Wang *et al.*, 2015) e (VII) o *Xylh* de *Debaryomyces hansenii* (Ferreira *et al.*, 2013). Todos os transportadores citados permitiram que cepas de *S. cerevisiae* sem os transportadores *HXTs* transportassem xilose. Por outro lado, mais de 80% dos genes pesquisados anotados como supostos ou conhecidos transportadores de açúcar não eram funcionais em *S. cerevisiae*, provavelmente devido à *misfolding* ou localização imprópria na célula.

Enquanto a maioria destes transportadores funcionais mostraram preferência por glicose sobre a xilose, apenas dois foram caracterizados como transportadores específicos de xilose. Dentre estes, o *An25* e o *Xyp29* se mostraram como facilitadores de xilose, sem atividade de transporte de glicose (Du *et al.*, 2010). O *GXS1* foi o primeiro glicose/xilose H^+ simporte de levedura relatado que poderia transportar xilose contra o gradiente de concentração (Leandro *et al.*, 2006) e, como esperado para este tipo de transportador, tinha uma elevada afinidade para a xilose em comparação com outros transportadores, porém, a atividade de transporte era muito lenta e a afinidade para glicose foi maior do que para a xilose. Além disto, em todos os casos, as atividades de transporte desta pentose por estes transportadores heterólogos eram muito baixos para melhorar drasticamente a produtividade da co-fermentação (Du *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2013; Runquist *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2012). Assim, a maioria dos transportadores heterólogos clonados foram não funcionais, ineficientes, instáveis ou não específicos para xilose.

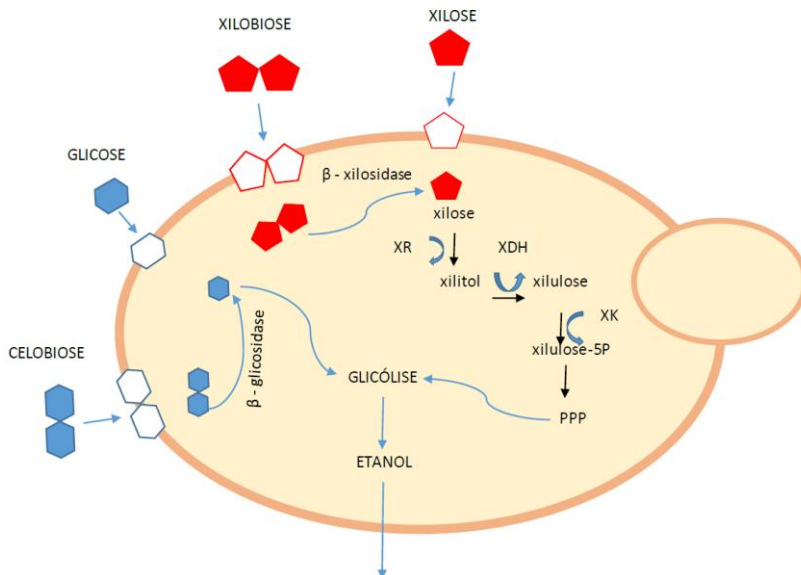
Diante disto, o principal desafio que permanece até o momento, está em encontrar um transportador que combine especificidade e eficiência no transporte de xilose e supere a preferência por glicose quando expresso em *S. cerevisiae*.

1.6 – A utilização direta de celobiose e xilobiose por *Saccharomyces cerevisiae*

Como bem sabemos, a celobiose é um dímero de D-glicose ligadas por uma ligação $\beta(1-4)$ (Mcbride *et al.*, 2005). As β -glicosidases hidrolisam celobiose para produzir duas moléculas de glicose disponíveis para fermentação (Kaplan, 1965). Já a xilobiose é um dissacarídeo de D-xilose, também ligadas por $\beta(1-4)$, formada pela hidrólise da molécula de xilana através da atividade das xilanases e pela atividade da enzima β -xilosidase é possível se obter os monômeros de xiloses para serem fermentados (Whistler & Richards, 1970). Porém, esta digestão enzimática necessária para liberação dos monômeros finais glicose e xilose, elevam os custos do processo diminuído, assim, a viabilidade da produção do etanol 2G.

Pensando nisto, uma estratégia para contornar esse problema seria a utilização direta dos dissacarídeos celobiose/xilobiose, evitando a última etapa desta digestão, o que tornaria o processo menos caro. Por outro lado, a construção de leveduras capazes de transportar e digerir internamente celobiose/xilobiose surge, também, como uma nova estratégia para superar o desafio da competição pelo transporte entre glicose e xilose eliminando a problemática da utilização sequencial desses açúcares. Para isto, duas estratégias seriam possíveis (Figura 10): O transporte direto de celobiose para dentro da célula para ser hidrolisada intracelularmente, assim, a xilose seria transportada de forma eficiente mesmo por transportadores com preferência por glicose; ou o transporte direto de xilobiose com hidrólise intracelular, eliminando a competição da mesma forma que a proposta anterior. Além disto, estas estratégias aliviarium outros problemas encontrados na co-utilização de glicose e xilose como: (1) a acumulação de glicose no meio extracelular, que causa à inibição da β -glicosidases, que por sua vez resulta na acumulação de celobiose e, portanto, provoca a inibição de celulases; (2) o acumulo de xilose no meio extracelular que inibe a atividade da β -xilosidase impedindo a degradação e consumo da xilobiose (Belinchón & Gacendo, 2003; Freer *et al.*, 1990; Fujii *et al.*, 2011; Ha *et al.*, 2011).

Figura 10 – Estratégias para co-fermentação simultânea de celobiose, xilose, xilobiose e glicose, sem repressão pela glicose. A via de assimilação de celobiose (celodextrina) consiste em um transportador de celodextrina e uma β -glicosidase intracelular. A via de assimilação da xilobiose consiste em um transportador de xilobiose e uma β -xilosidase intracelular, além das enzimas xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulocinase (XKS1).



Fonte: Este trabalho.

Porém, assim como em xilose, a *S. cerevisiae* é incapaz de utilizar diretamente celobiose e xilobiose, por não possuir transportadores e enzimas necessárias para este processo. Duas estratégias têm sido realizadas, para habilitar a utilização de celobiose por levedura industriais: (1) metabolização da celobiose derivada da hidrólise parcial da celulose pela endoglucanase e exoglucanase seguida pela hidrólise extracelular por β -glicosidasas secretadas ou exibidas na superfície do micro-organismo; (2) metabolizar celobiose intracelularmente a partir de hidrólise parcial de celulose usando um transportador e uma β -glicosidase intracelulares (Li *et al.*, 2010; Vinuselvi e Lee, 2011). No entanto, a assimilação da celobiose intracelularmente tem sido considerada como a estratégia mais promissora para superar os gargalos de uma hidrólise extracelular como descritos acima (Ha *et al.*, 2011, Vinuselvi e Lee, 2012, 2011).

Engenheirar o metabolismo intracelular de celobiose (imitando o modelo que é mais encontrado na natureza) em micro-organismos industriais como *Saccharomyces cerevisiae*, têm sido recentemente realizado. Galazka e colaboradores (2010) relataram a expressão funcional dos transportadores de celodextrina (*CDT-1* e *CDT-2*) do fungo *N. crassa* em *S. cerevisiae*, com fermentação de celobiose por co-expressão de *CDT-1* e β -glicosidase intracelular (*GHI-1*) também de *N. crassa*. Depois deste trabalho, vários outros estudos semelhantes foram realizados, buscando otimizar ainda mais a utilização de celobiose por *S. cerevisiae*, porém, a maioria deles utilizaram *CDT-1* de *N. crassa* (Eriksen *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2013a; Nan *et al.*, 2014; Sen *et al.*, 2015).

Por outro lado, poucos trabalhos têm abordado a expressão funcional de transportadores de celodextrina proveniente de outros fungos. Sadie e colaboradores (2011) e Ha e colaboradores (2013b) relataram expressões em *S. cerevisiae* de transportadores funcionais de celodextrinas provenientes de *K. lactis* (*LAC12*) e *Sc. stipitis* (*HXT2.4*), respectivamente, ambas transformantes com observável produção de etanol. Além disso, Bae e colaboradores (2014) compararam vários transportadores de celodextrina provenientes de *N. crassa*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium chrysogenum* e *Thielavia terrestris* e os expressaram funcionalmente em *S. cerevisiae*. Como resultado, a *S. cerevisiae* expressando o transportador de *P. chrysogenum*, bem como a β -glicosidase de *T. terrestris*, apresentaram o melhor desempenho de fermentação de celobiose quando comparado à linhagens de *S. cerevisiae* que expressavam *CDT-1* e β -glicosidase de *N. crassa*.

Embora a maioria dos trabalhos a cima citados, tenham apresentados bons resultados com notáveis utilizações de celobiose, o rendimento de etanol e a eficiência na fermentação com este açúcar não foi elevado o suficiente para tornar este método vantajoso em escala industrial, sendo ainda necessários mais trabalhos para melhorar a utilização direta de celobiose por *S. cerevisiae* (Du *et al.*, 2012).

No caso da xilobiose, alguns transportadores e β -xilosidases já foram identificados em algumas espécies de bactérias (Jiang *et al.*, 2004; Qian *et al.*, 2003; Tsujibo *et al.*, 2004), porém, até o momento, apenas poucos trabalhos demonstraram a utilização direta de xilobiose por *S. cerevisiae*. O primeiro exemplo de utilização direta de xilobiose foi relatado em 2011 por Fujii e colaboradores. Eles demonstraram a expressão de uma β -xilosidase intracelular proveniente de *T. reesei*, numa linhagem de *S. cerevisiae* contendo as enzimas para a metabolização de xilose (XR-XDH), tornando-a apta a hidrolisar xilo-

oligossacarídeos em xilose e produzir etanol. Até o momento, não foram relatados transportadores de xilo-oligossacarídeos em *S. cerevisiae*, mas, segundo os autores, os dados sugerem que *S. cerevisiae* possui um sistema de transporte de xilo-oligossacarídeos, que poderiam estar acontecendo pelos transportadores de maltose *AGT1* e *MALx1*. Estes transportadores, são conhecidos transportadores de sacarose e inicialmente identificados como transportadores mono ou oligossacarídeos. Em um outro trabalho realizado por Li e colaboradores (2015), o conhecido transportador de celodextrinas (*CDT-2*) foi descrito como um eficiente transportador de xilo-oligossacarídeos, permitindo uma melhora na produção de etanol a partir da mistura das frações hemicelulósicas juntamente com glicose e sacarose, quando expresso em *S. cerevisiae* juntamente com β -xilosidases intracelulares (*GH43-2* e *GH43-7*) também provenientes de *N. crassa*. No entanto, a velocidade de consumo de xilo-oligossacarídeos por estas recombinantes, permanecem bastante lenta e, portanto, as linhagens precisariam ser melhoradas para futuras aplicações industriais.

Pensando nisso, um recente trabalho realizado por Zhang e colaboradores (2017) identificou 3 promissores transportadores, ortólogos ao *CDT-1* e *CDT-2*, proveniente de outros fungos, que poderiam ser usados como alvo para explorar a utilização mais rápida de xilo-oligossacarídeos. Destes transportadores, o *ST16* isolado de *Trichoderma virens* foi o que apresentou maior vantagem em relação ao *CDT-2*, incluindo o fato de ser um transportador específico de xilo-oligossacarídeos com boa localização da membrana e que permitiu um crescimento aeróbio mais rápido. Por outro lado, este não melhorou a utilização anaeróbica destes açúcares em comparação com *CDT-2*. Dadas as propriedades superiores deste transportador, foi realizada em seguida uma evolução direcionada mediada por CRISPR-Cas9, na tentativa de melhorar ainda mais a eficiência na utilização de xilodextrinas. No entanto, devido ao crescimento das colônias mutantes também em xilose, não foi possível isolar os transportadores evoluídos apenas para xilo-oligossacarídeos.

Dessa forma, assim como para celobiose, a utilização direta de xilobiose por *S. cerevisiae* ainda necessita de mais trabalhos que possam tornar este processo industrialmente viável.

1.7 – Regulação transcricional e pós-traducional de transportadores de açúcares em *S. cerevisiae*.

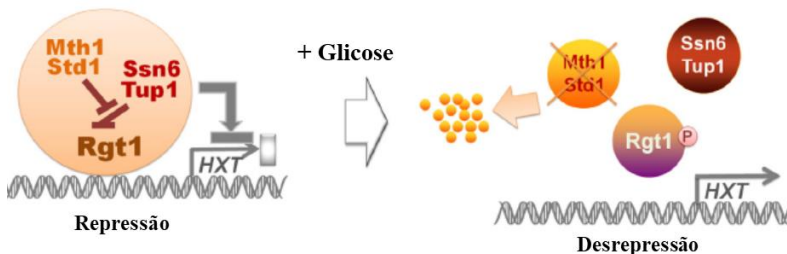
A glicose serve como a principal fonte de carbono e energia em uma infinidade de organismos e micro-organismos (Rolland *et al.*, 2001; Towle *et al.*, 2005). Em *S. cerevisiae* a glicose é a fonte de energia preferida e em função disso, as funções celulares são finamente reguladas por ela (Gancedo, 1998; Carlson, 1999). Leveduras como *S. cerevisiae*, na presença de altas concentrações de glicose, preferem fermentar em vez de oxidar este açúcar, mesmo quando o oxigênio é abundante (Crabtree, 1929; Lagunas, 1979) e como a produção de ATP por fermentação é ineficiente, as células de levedura metabolizam vigorosamente a glicose disponível para atender às demandas de ATP celular (Lagunas, 1986). Eles fazem isso aumentando a absorção de glicose através de transportadores de glicose (*HXTs*) e é por isto que nestas leveduras o transporte de glicose é tão eficiente (Johnston & Kim, 2005; Rolland *et al.*, 2001).

Para lidar com as mudanças na disponibilidade de glicose, *S. cerevisiae* expressa pelo menos seis membros da família transportadora de glicose com diferentes afinidades para a glicose (*HXT1*, 2, 3, 4, 6 e 7) (Boles & Hollenberg, 1997; Reifengerger *et al.*, 1995), assim, as células de leveduras detectam a glicose extracelular em uma ampla faixa de concentração e expressam apenas os transportadores mais adequados para a quantidade de glicose disponível no meio (Gancedo, 2008; Horak, 2013). Dessa forma, transportadores de glicose de baixa afinidade como *HXT1* e *HXT3* (K_m 40-100 mM) são expressos em altas concentrações de glicose e desaparecem da membrana com baixa concentração de glicose; transportadores de glicose de afinidade moderada como *HXT4* e *HXT5* (K_m 10-15 mM) apresentam um comportamento de expressão variado; e os transportadores de alta afinidade como *HXT2* e *HXT7* (K_m 1-3 mM) são estritamente expressos a baixas concentrações de glicose (Kruckeberg, 1996; Reifengerger *et al.*, 1997; Ozcan & Johnston 1999).

A expressão dos vários genes *HXTs* é controlada pelo repressor *RGT1* que, na ausência de glicose recruta *SSN6-TUP1* de forma dependente de *MTH1* formando um complexo repressor que inibe a expressão de genes alvo (*HXTs* e *HXK2*) ao se ligar em suas regiões promotoras (Figura 11). *STD1* é um paralogo de *MTH1*, mas tem pouco efeito na regulação da função *RGT1* (Kim *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 1999; Ozcan *et al.*, 1996; Kim, 2009). Assim, os genes *HXTs* são induzidos por três principais caminhos sinalizados pela presença de glicose (*RGT2/SNF3*, *SNF1/MGI* e cAMP-PKA) que convergem para

inativar o repressor *RGT1* (Figura 12) (Rolland *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2013).

Figura 11 – *MTH1* é necessário para a formação do complexo *RGT1/SSN6-TUP1* que leva à repressão da expressão dos genes *HXTs*. De fato, sua inativação é crítica para absorção e metabolismo de glicose.



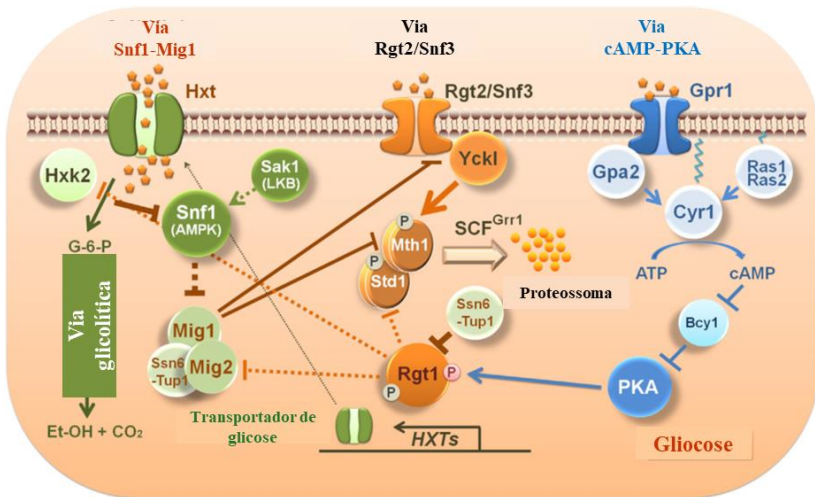
Fonte: Adaptado de Pasula *et al.* (2010)

A via dos sensores *RGT2/SNF3* é ativada por diferentes níveis de glicose, presumivelmente devido às suas diferentes afinidades pela glicose. *RGT2* é ativado por altos níveis de glicose e gera um sinal que estimula a expressão de transportadores de baixa afinidade por glicose. *SNF3* gera um sinal de resposta a baixos níveis de glicose, o que estimula a expressão de transportadores de glicose de alta afinidade. De forma geral, a ligação da glicose aos sensores *RGT2/SNF3*, induz uma mudança na sua conformação, que ativa *YCK1/2* (*Yeast casein kinase 1*), que por sua vez catalisa a fosforilação de *MTH1* e *STD1*. Esta fosforilação marca *MTH1* e *STD1* para ubiquitinação pela ubiquitina proteína ligase (*SCF^{Grr1}*) e subsequente degradação pelo proteasoma, permitindo assim, a expressão dos genes *HXTs* (Figura 12) (Moriya & Johnston, 2004; Pasula *et al.*, 2010).

A via *SNF1/MGI* é ativada através de uma cascata de sinalização iniciada com o transporte da glicose através da membrana plasmática e sua subsequente fosforilação pela hexoquinase (*HXK2*). Com a captação e fosforilação da glicose, o complexo proteína-fosfatase *REG1-GLC7* é ativado e, por sua vez, desfosforila tanto a proteína-quinase *SNF1* quanto o repressor *MGI*. Enquanto estiver fosforilada, a *SNF1* se mantém ativa e fosforila o *MGI*, inativando-o. No entanto, quando desfosforilada, *SNF1* é inativada permitindo a ativação do repressor *MGI*. Um vez ativo, o *MGI* se liga na região reguladora de vários genes, dentre eles o *MTH1*, reprimindo suas expressões. Uma vez não expresso, o *MTH1* não colabora com o complexo *RGT1/SSN6-TUP*,

desbloqueando a repressão dos genes *HXTs*. Por outro lado, a ativação do repressor *MG1* também impede o bloqueio da expressão dos genes *HXTs* ao recrutar o co-repressor *SSN6-TUP* impedindo assim, que ele colabore com o complexo *RGT1* (Figura 12) (Gancedo, 1998; Jiang & Carlson, 1996; Ludin *et al.*, 1998).

Figura 12 - Diagrama esquemático entre as três vias de sinalização de glicose na levedura (*RGT2/SNF3*, *SNF1/MG1* e *cAMP-PKA*).



Fonte: Adaptado de Kim *et al.* (2013)

Outra via de sinalização por glicose é através do receptor Gpr1, uma proteína da membrana plasmática acoplado à proteína Gpa2 que é requerida para a ativação da via da PKA dependente de AMPc (Figura 12) (Gancedo, 2008). Depois de ativa a PKA fosforila o *RGT1*, resultando na dissociação do complexo *RGT1-MTH1-SSN6-TUP1* e, conseqüentemente, reexposição dos promotores *HXTs*. Essa fosforilação do *RGT1* por PKA não ocorre até que o complexo repressor *RGT1-MTH1/STD1-SSN6-TUP1* seja interrompido, sugerindo que os sítios de PKA em *RGT1* estão disponíveis para a fosforilação após a degradação de *MTH1* induzida pela glicose (Jouandot *et al.*, 2011; Kim & Johnston, 2006; Roy *et al.*, 2013). A expressão do gene *SNF3* é reprimida pela via *SNF1-MG1* em níveis elevados de glicose, permitindo que o *SNF3* funcione somente em condições de baixas concentrações de glicose (Kaniak *et al.*, 2004).

Além desta fina regulação dos genes *HXTs*, a glicose também controla a expressão de transportadores de outras fontes de carbono. Tudo isso para garantir que a glicose seja usada em prioridade quando disponível. Assim, quando a glicose está presente no meio, provoca a repressão de muitos genes envolvidos no metabolismo de outros açúcares. No caso da maltose e da galactose, a repressão catabólica é mediada principalmente pela via do repressor *MGI*, que se liga na região promotora desses genes impedindo suas transcrições (Medintz *et al.*, 1996; Horak e Wolf, 1997).

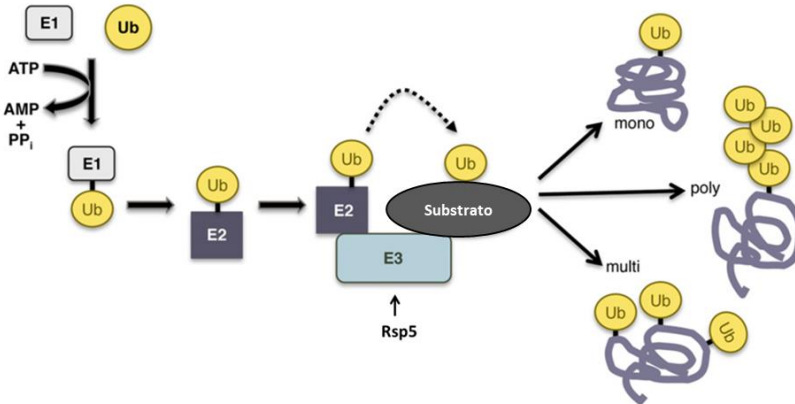
Além de uma regulação transcricional da expressão dos genes de transportadores, existe uma outra via em *S. cerevisiae* que é conectada a essa, onde a glicose também é mediadora através de regulação pós-traducional. Nessa via, os transportadores são removidos da membrana através de uma complexa cascata de sinalizações, onde a ubiquitinação serve como um sinal importante para a endocitose da proteína e, em alguns casos, ela parece atuar de forma redundante com outros sinais (Finley *et al.*, 2012).

A conjugação da ubiquitina ao alvo, envolve uma cascata das enzimas ubiquitina ligases E1-E2-E3 (Figura 13) (Snowdon *et al.*, 2012). A ubiquitina é tipicamente ligada à proteína alvo através de uma ligação entre o grupo amino de um substrato de lisina e a parte carboxi-terminal da ubiquitina (Finley *et al.*, 2012). Embora uma única molécula de ubiquitina seja suficiente para promover a endocitose, múltiplas monoubiquitinações, bem como, poliubiquitinações de cadeias curtas, aceleram a velocidade de endocitose em graus que vão depender do substrato (Figura 13) (Galan e Haguenaer-Tsapis, 1997; Springael *et al.*, 1999).

Em *S. cerevisiae*, a ubiquitinação de transportadores de açúcares acontece mediada por uma ubiquitina ligase *RSP5* (E3) (O'Donnell *et al.*, 2015). As *RSP5* catalisam a formação de ligações isopeptídicas entre grupos amino de resíduos de lisina nas proteínas substrato e o grupo carboxil ativado da ubiquitina (Finley *et al.*, 2012). O seu recrutamento acontece – na maioria das proteínas integrais de membrana – através de uma família de proteínas adaptadoras de endocitose chamadas α -arrestinas (também conhecida como ARTs). Em *S. cerevisiae*, esta família é composta por 14 membros, caracterizados por um domínio N-terminal de carga-ligação e uma extensão C-terminal de ligação ao *RSP5* contendo vários motivos PPxY (Figura 14) (Nikko & Pelham 2009). As *RSP5* associam-se à membrana plasmática (MP) através do seu domínio C2 de ligação e contém domínios WW, caracterizados pela presença de dois resíduos de triptofano altamente conservados, que interagem

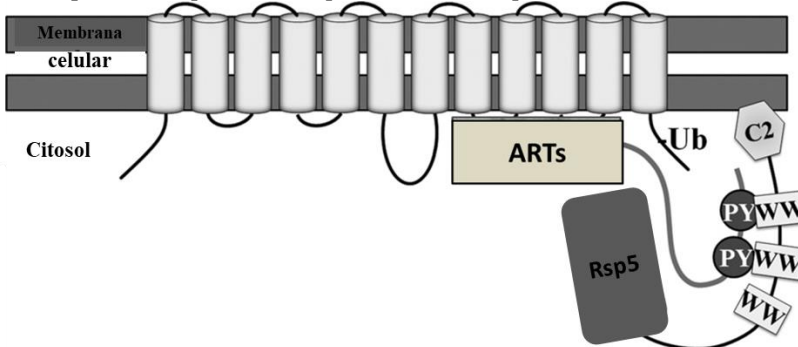
diretamente com os motivos PPxY das ARTs (Figura 14) (Lin *et al.* 2008; Leon and Haguener-Tsapis 2009; Nikko and Pelham 2009).

Figura 13 – Cascata das enzimas ubiquitina ligase para conjugação da ubiquitina ao resíduo de lisina (K) alvo: a ubiquitina é ativada por E1 em um passo dependente de ATP, transferida para o sítio ativo cisteína em uma enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e ligado covalentemente às proteínas do substrato. A seleção do substrato depende de ubiquitina ligases (E3). A conjugação de uma única molécula de ubiquitina gera proteínas monoubiquitadas. Repetidas rodadas de ativação e conjugação de ubiquitinas levam às proteínas multi ou poliubiquitadas.



Fonte: adaptado de Finley *et al.* (2012)

Figura 14 – Modelo para a endocitose de transportadores mediada por α -arrestina (ARTs). As ARTs cooperam para mediar o recrutamento de RSP5 para os transportadores que serão ubiquitinados e subsequentemente endocitados.



Fonte: adaptado de Sen *et al.* (2015)

Vários membros da família de transportadores *HXTs* em *S. cerevisiae* são endocitados após exposição e transporte de glicose extracelular (sob diferentes concentrações deste açúcar), através da sua interação com α -arrestinas específicas e subsequente ubiquitinação por *RSP5* (O'Donnell et. al., 2015; Nikko et al., 2008; Roy et al., 2014).

As modificações de leveduras como *S. cerevisiae*, para melhorar a utilização de pentoses é vital para a produção de etanol hemicelulósico. Embora os transportadores de hexose endógenos (*HXTs*) possam ser manipulados para o transporte específico de pentoses, eles continuam sujeitos à degradação regulada pela glicose (Gonçalves et al., 2014; Hamacher et al., 2002; Nijland et al., 2016). Portanto, na ausência de glicose ou quando a glicose é esgotada do meio, algumas proteínas *HXTs* com alta capacidade de transporte de xilose são rapidamente removidas da membrana citoplasmática e degradadas (Nijland et al., 2014; Roy et al., 2014; Snowdon & van der Merwe, 2012).

Trabalhos recentes têm demonstrado que, transportadores de baixa afinidade como *HXT1*, *HXT36* (variante *HXT3*) e *HXT5*, que normalmente são endocitados da membrana com a depleção da glicose no meio, obtiveram uma melhora em suas permanências na membrana citoplasmática na ausência de glicose, após a substituição de resíduos de lisinas na porção N-terminal do transportador, havendo, como consequência, uma melhora na fermentação de xilose após o esgotamento da glicose e quando as células foram cultivadas em xilose como única fonte de carbono (Nijland et al., 2016; Roy et al., 2014).

Em um outro trabalho, Sen e colaboradores (2016) demonstraram que resíduos de lisinas localizados no domínio C-terminal do transportador de celobiose *CDT-2* de *N. crassa*, são necessárias para uma eficiente endocitose dessa proteína quando clonada em *S. cerevisiae*. Isso foi provado através da construção de uma versão truncada do gene (sem a porção C-terminal da proteína), onde foi possível evidenciar suas localizações quase que exclusivamente na MP, com um consequente aumento do consumo de celobiose e produção de etanol na levedura recombinante, indicando que a endocitose desses transportadores exercem um efeito limitante de velocidade de utilização da celobiose.

Neste sentido, parece que a expressão de transportadores heterólogos em *S. cerevisiae*, também são suscetíveis à degradação por ubiquitinação da mesma maneira que os transportadores endógenos *HXTs*. Assim, essa nova abordagem de engenharia de transportadores em *S. cerevisiae* pode ser interessante, também, para transportadores de xilose heterólogos que vêm sendo expressos nessa levedura.

1.8 - Espécies de leveduras fermentadoras de xilose e/ou hidrolisado de biomassa vegetal

Diferente de *S. cerevisiae*, existem várias leveduras que conseguem naturalmente utilizar açúcares como xilose e os demais oligossacarídeos presentes no hidrolisado lignocelulósico.

Scheffersomyces shehatae foi a primeira levedura fermentadora de xilose identificada, descrita pela primeira vez em 1983 por du Preez e colaboradores. A partir de então, várias outras espécies como: *Candida intermedia*, *Candida jeffriesii*, *Candida shehatae*, *Candida succiphila*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia tannophilus*, *Candida tropicalis*, *Brettanomyces naardenensis*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia segobiensis*, *Pichia stipitis* e *Candida tenuis* também foram descritas como capazes de crescer e fermentar xilose com diferentes graus de rendimento de etanol, sendo que esta última também apresentou boa capacidade fermentativa em celobiose (Hahn-Hagerdal *et al.*, 1994; Jeffries, 1981; Tavares *et al.*, 2000; Ryabova; Chmil & Sibirny, 2003; Stambuk *et al.*, 2003; Toivola *et al.*, 1984).

Estas leveduras foram isoladas de vários locais que geralmente são ricos em açúcares, incluindo exsudados de árvores, intestinos de insetos perfuradores de madeira, além de madeira, frutas em decomposição e resíduos agrícolas ou agroindustriais (Toivola *et al.*, 1984; Nigam *et al.*, 1985; Suh *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2006; Cadete *et al.*, 2009; Lara *et al.*, 2014).

A levedura *Sc. stipitis*, anteriormente conhecida como *Pichia stipitis* (Kurtzman e Suzuki, 2010), é uma das melhores espécies fermentadoras de xilose encontradas na natureza, capaz de produzir altos níveis de etanol a partir deste açúcar (Du Preez *et al.*, 1986, 1989; Nigam, 2001), além disto, é também capaz de fermentar uma ampla variedade de açúcares contidos na biomassa lignocelulósica (Balagurunathan *et al.*, 2012).

Novas espécies do gênero *Spathaspora* foram descritas nos últimos anos. Dentre elas estão as espécies: *Spathaspora passalidarum*, *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora allomyrinae*, *Spathaspora brasiliensis*, *Spathaspora suhii*, *Spathaspora roraimanensis*, *Spathaspora xylofermentans*, que são capazes de produzir etanol a partir de xilose (Nguyen, *et al.*, 2006; Cadete *et al.*, 2009; Cadete *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016), com destaque para as espécies *Sp. passalidarum* e *Sp. arborariae*. A primeira foi isolada do intestino de besouros que se alimentam de madeira (Nguyen *et al.*, 2006) e a segunda foi isolada a

partir da madeira em decomposição de duas diferentes localidades do Brasil (Cadete *et al.*, 2009). Além de suas reconhecidas capacidades de produção de etanol por meio da fermentação de xilose, estas também foram capazes de fermentar hidrolisados lignocelulósicos do bagaço de cana-de-açúcar e da palha de arroz com a vantagem de serem tolerantes a compostos inibidores gerados a partir da hidrólise desta biomassa (Cadete *et al.*, 2012, 2013; Da Cunha-Pereira *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2006). Em recente estudo, Hou e colaboradores (2012), demonstram que a *Sp. passalidarum* foi capaz de converter xilose em etanol em condições anaeróbicas com eficiência superior àquela observada em *Sc. stipitis* (que até então era a melhor espécie fermentadora de xilose encontrada na natureza), com menor acúmulo de xilitol (Du Preez *et al.*, 1986, 1989; Nigam, 2001; Toivola *et al.*, 1984). Além disto, esta também foi capaz de co-fermentar misturas de glicose e xilose e também glicose, xilose e celobiose, além de hidrolisados, em condições de restrição de oxigênio (Long *et al.*, 2012).

Uma outra espécie de levedura, denominada *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* foi isolada de vários ambientes (Capriotti e Ranieri, 1964; De Araujo *et al.*, 1995; Diriye *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 2012; Sibirny, 1996), incluindo madeira em decomposição (Cadete *et al.*, 2012). Esta espécie também é reconhecida por ser boa produtora de etanol a partir de xilose (Matos *et al.*, 2013; Rao *et al.*, 2004; SREENATH e JEFFRIES, 2000) e, recentemente, uma cepa que foi isolada do caldo de cana, apresentou capacidade em fermentar hidrolisado de bagaço de cana (Martini *et al.*, 2016).

Apesar destes micro-organismos não serem robustos o suficiente para suportarem a presença de inibidores de uma fermentação industrial, elas podem fornecer seus genes de enzimas e/ou transportadores para modificar linhagens *S. cerevisiae* industriais, que não possui a capacidade de fermentar todos estes carboidratos presentes na biomassa vegetal (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2007; Wohlbach *et al.*, 2011).

Pensando nisso, o presente trabalho decidiu analisar os genomas de leveduras com reconhecidas capacidades fermentativas em xilose e/ou hidrolisado de biomassa vegetal. As espécies *Sc. stipitis*, *Sp. passalidarum* e *Sp. arborariae*, além de outras linhagens promissoras como *C. tropicalis* e *M. guilliermondii*, foram escolhidas para a busca de genes para possíveis transportadores e/ou enzimas que pudessem contribuir para a construção de uma linhagem de *S. cerevisiae* recombinante, apta a utilizar de forma eficiente e industrialmente viável, açúcares como xilose, xilobiose e celobiose.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral expressar novos transportadores e enzimas que permitam a utilização eficiente dos carboidratos presentes em hidrolisados de biomassa lignocelulósica por *S. cerevisiae*, visando a produção industrial de etanol 2G.

2.2 - Objetivos Específicos

-Identificar e expressar genes para transportadores de açúcares provenientes de leveduras fermentadoras de xilose: uma linhagem de *S. cerevisiae* *hxt*-nula foi utilizada para clonar transportadores de xilose a partir de uma biblioteca genômica de *Sc. stipitis* ou a partir dos genomas sequenciados das leveduras *Sp. passalidarum*; *Sp. arborariae* e *M. guilliermondii*.

-Desenvolver estratégias para otimizar a funcionalidade de transportadores heterólogos em *S. cerevisiae*: além de modelagem e *docking in silico* das proteínas transportadoras, foi avaliada a estratégia de truncagem dos transportadores, removendo resíduos de lisina passíveis de ubiquitinação, para promover uma maior estabilidade dos transportadores na membrana de *S. cerevisiae*.

-Identificar e clonar genes que codificam transportadores e enzimas que possam tornar *S. cerevisiae* apta a utilizar xilobiose e celobiose: foram identificadas e clonadas enzimas com atividade β -glicosidase e β -xilosidase intracelular, além de transportadores de celobiose a partir dos genomas de *Sp. passalidarum*, *M. guilliermondii* e *C. tropicalis*.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Leveduras utilizadas e meios de cultura

Para o presente estudo, foram utilizadas as linhagens de *S. cerevisiae* de laboratório descritas na Tabela 8. A linhagem DLG-K1 é referida como linhagem *hxt-nulo*, por não apresentar os principais transportadores de hexose (*hxt1-hxt7Δ* e *gal2Δ*) e, portanto ser incapaz de crescer em meios contendo glicose ou xilose. Ela possui em seu genoma as enzimas necessárias para o metabolismo de xilose (XR/XDH/XK) e foi escolhida como plataforma para expressão de novos possíveis transportadores de xilose. A linhagem ASY-3 é isogênica à DLG-K1, mas possui o gene *PHO13* deletado de seu genoma (*pho13Δ*). A linhagem CMY1050 é uma cepa deletada dos transportadores da família *MAL* e, portanto, não cresce em maltose e outros α -glicosídeos. Esta foi escolhida para testar possíveis transportadores de xilo-oligossacarídeos. A linhagem CENPK2-1C possui várias marcações auxotróficas e foi escolhida para expressar, ao mesmo tempo, plasmídeos com marcações diferentes.

Para os cultivos foram utilizados meio rico YP (1% de extrato de levedura e 2% de bacto-peptona), meio sintético Drop-out (0,67% de base nitrogenada, acrescido de 0,192% de Drop-out, contendo todos os aminoácidos requeridos e sem a base nitrogenada uracila ou triptofano ou ambos, de acordo com a necessidade – todos da Sigma-Aldrich). A estes meios foram adicionados 2% de maltose, glicose, xilose, frutose ou galactose como fontes de carbono. O pH do meio foi ajustado para 5,0 com HCl ou NaOH. Quando necessário, foram adicionados ao meio 2% de bacto-agar e/ou 0,5 mg/L de Aureobasidin A (Takara Bio, Kyoto, Japan). Os meios foram esterilizados por autoclave a 120 °C por 20 min ou por filtração com membranas de nitrocelulose com 0,22 μ m de porosidade. Os crescimentos foram realizados a 28 °C com agitação orbital de 160 RPM.

A bactéria *Escherichia coli* DH5 α foi usada para propagação dos plasmídeos recombinantes. Para seus cultivos, foram crescidas a 37 °C, em meio Luria Bertani (10% triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio, pH 7,5) suplementado, quando necessário, com ampicilina (100 mg/L) e/ou 1,5% de bacto-agar.

Tabela 8- Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas

Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas		
Cepa	Genótipo	Fonte ou referência
DLGK1	<i>MATa hxt1Δ::HIS::Δhxt4 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
CMY1050	<i>MATa MAL61Δ::HIS3 MAL12 MAL13 GAL leu2 ura3-52 lys2-801 ade 2-101 trp 1-Δ63 his3-200</i>	Medintz <i>et al.</i> , 2000
CENPK2-1C	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8c SUC2</i>	Entian & Kötter, 1998
ASY-3	<i>Isogênica a DLGK1, mas pho13Δ</i>	Dos Santos, 2016
BBY-SsHXT2.6	DLG-K1, pPGK-SsHXT2.6	de Sales <i>et al.</i> , 2015
BBY-SsXUT1	DLG-K1, pPGK-SsXUT1	de Sales <i>et al.</i> , 2015
BBY-SsQUP2	DLG-K1, pPGK-SsQUP2	de Sales <i>et al.</i> , 2015
Linhagens construídas		
DLG-GPD	DLG-K1, p426-GPD	Este trabalho
DLG-SpFRS1	DLG-K1, pPGK-SpFRS1	Este trabalho
DLG-SaRGT2	DLG-K1, p426-GPD-SaRGT2	Este trabalho
DLG-SaXUT1	DLG-K1, p426-GPD-SaXUT1	Este trabalho
DLG-SpXUT1	DLG-K1, pPGK-SpXUT1	Este trabalho
DLG-MgGET1	DLG-K1, p426-GPD-MgGET1	Este trabalho
ASY-SaXUT1	ASY-3, p426-GPD-SaXUT1	Este trabalho
DLG-tSaXUT1	DLGK1, p426-GPD-tSaXUT1	Este trabalho
DLG-tSpXUT1	DLGK1, pPGK-tSpXUT1	Este trabalho
DLG-tMgGET1	DLGK1, p426-GPD-tMgGET1	Este trabalho
DLG-PAT1	DLGK1, p426-GPD-PAT1	Este trabalho
CMY-CtCBT1	CMY1050, p426-GPD-CtCBT1	Este trabalho
CMY-MgCBT2	CMY1050, p426-GPD-MgCBT2	Este trabalho
CMY-HXT2.4	CMY1050, p426-GPD-HXT2.4	Este trabalho
CENPK-GPD	CENPK2-1C, p426-GPD	Este trabalho
CENPK-B2	CENPK2-1C, p424-GPD-SpBGL2	Este trabalho
CENPK-HB	CENPK2-1C, p424-GPD-SpBGL2 e p426-GPD-HXT2.4	Este trabalho
CENPK-B2-MgCBT2	CENPK2-1C, p424-GPD-BGL2 e p426-GPD-MGxb	Este trabalho
CENPK-B2-CtCBT1	CENPK2-1C, p424-GPD-BGL2 e p426-GPD-CTxb	Este trabalho

3.2 - Condições de crescimento e fermentação em batelada

Para os ensaios de crescimento, as leveduras foram pré-crescidas em meio sintético YNB sem uracila e/ou triptofano, contendo 2% de maltose ou glicose, por 36 horas a 28 °C. Foram, então, centrifugadas a 5.000 g por 10 minutos em temperatura de 25 °C e lavadas duas vezes com água destilada estéril. As células foram usadas para inocular 50 mL de meio estéril indicado. A biomassa inicial para os crescimentos foi ajustada para 0,1 ou 0,5 g/L. Os experimentos foram realizados em frascos de 250 mL, contendo 1/5 de seu volume ocupado pelo meio, incubados em *shaker* com agitação rotacional a 160 rpm, a 28 °C por um período de até 300 horas. Os parâmetros de crescimento foram determinados através de coletas de amostras em tempos determinados e medidas em espectrofotômetro Cary 60 UV-VIS (Agilent Technologies) a 600 nm para verificar o aumento de biomassa celular. A seguir, as células foram removidas por centrifugação (5.000 g por 4 min) e os sobrenadantes filtrados (0,45 µm de porosidade) para determinação do consumo de açúcares e produção de metabolitos.

Para as fermentações em batelada, as linhagens foram pré-crescidas como descrito anteriormente e cultivadas em 500 mL de meio sintético YNB, sem uracila e/ou triptofano, contendo 2% de maltose ou glicose, conforme descrito anteriormente, até atingir uma concentração de aproximadamente 1g/L de células. Em seguida, as células foram centrifugadas e lavadas 2 vezes com água destilada a 4°C e ajustadas para uma concentração inicial de 10 g/L de células no meio de cultura (YNB contendo marcação auxotrófica necessária), com 20 g/L do carboidrato de interesse, em um volume final de 20 ml, em frascos de 25 mL hermeticamente fechado. Os frascos foram submetidos à agitadores magnéticos a 28 °C por 48 horas ou mais. Em tempos determinados, foram removidos alíquotas de 500 µL, centrifugadas e os sobrenadantes utilizados para determinar o consumo de açúcares e produção de etanol e outros metabólitos. Durante os experimentos, a densidade celular foi monitorada através da medição da absorbância a 600 nm.

3.3 - Quantificação de biomassa celular

A concentração de biomassa celular foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda a 600 nm, empregando a equação 1.

$$C_{\text{celular}} = \text{Abs}_{\text{Amostra}} \cdot D \cdot \text{FC} \quad (1)$$

Onde:

C_{celular} = Concentração de biomassa celular na amostra em g/L;

D = Fator de diluição da amostra;

FC = Fator de conversão da absorbância, para massa seca em g/L.

O Fator de conversão foi calculado pela razão entre a massa seca de células, determinada por análise gravimétrica e a absorbância da cultura, determinada por espectrofotometria, empregando a equação 2.

$$FC = X_{(g/L)} / (Abs_{\text{Amostra}} \cdot D) \quad (2)$$

Onde:

FC = Fator de conversão da absorbância, para massa seca em g/L;

$X_{(g/L)}$ = Peso seco da massa de células em g/L;

Abs_{Amostra} = Absorbância a 600 nm;

D = Fator de diluição da amostra;

Para determinar o peso seco das células, foi feito um pré-cultivo em meio YP com 2% de glicose ou maltose por 24 horas. Em seguida, as células foram re-inoculadas em Erlenmeyers ocupando 1/5 de seu volume com o meio idêntico ao pré-cultivo. Após 12 horas de crescimento, a absorbância das culturas foram determinadas em espectrofotômetro a 600 nm, sendo aceito leituras de 0,03 a 0,25. As amostras foram filtradas em membrana de nitrocelulose com 0,45 μm de porosidade, previamente secas e pesadas. O volume de amostra filtrada foi alterado conforme a concentração de células da cultura, para se obter valores entre 25 e 50 mg de células secas na membrana. As membranas contendo as células foram lavadas 2 vezes com água destilada e secas em estufa a 70 °C por 24h. Após a secagem, a massa de células foi determinada em balança analítica e a concentração em g/L foi calculada de acordo com o volume filtrado, empregando a equação 3.

$$X_{(g/L)} = [(m_{\text{ma}} - m_{\text{m}}) / V] \cdot 1000 \quad (3)$$

Onde:

m_{ma} = Massa, em gramas, da membrana contendo filtro após secagem;

m_{m} = Massa, em gramas, da membrana seca;

V = volume filtrado em mL.

3.4 - Seleção dos genes e construção dos plasmídeos

Para a busca de genes para possíveis transportadores e enzimas de interesse, utilizamos a ferramenta bioinformática BLASTp da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Outras ferramentas on-line também foram usadas para análises adicionais: O alinhamento foi realizado utilizando o programa de bioinformática PRALINE com PSIPRED para estrutura secundária e HMMTOP v2.1 para predição de estrutura transmembrana, depositados no servidor IBIVU (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>) (Pirovano *et al.*, 2008; Pirovano & Heringa, 2010; Simossis *et al.*, 2005). Para a verificação da presença de peptídeo sinal, no caso das enzimas, foi utilizado o programa PHOBIUS/EMBL-EBI, disponível em (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/phobius/>) (Käll *et al.*, 2014). Para a construção dos filogramas, foi utilizado o programa Phylogeny.fr, disponível em (<http://www.phylogeny.fr/>) (Dereeper *et al.*, 2008).

Cada gene foi amplificado a partir do DNA genômico, utilizando a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Para isto, os DNAs genômicos foram extraídos a partir da cepa de *S. cerevisiae* de interesse, utilizando-se o kit YeaStar™ Genomic DNA Kit (Zymo Research). Cada um dos genes foram amplificados utilizando-se os iniciadores (*primers*) listados na Tabela 9, contendo os sítios para as enzimas de restrição utilizadas, e utilizando-se a enzima polimerase Phusion High-Fidelity (Thermo Fisher). Os números de acesso no NCBI de todas as sequências amplificadas estão listadas na Tabela 10.

Os genes amplificados foram clonados nos sítios enzimáticos presentes nos plasmídeos de interesse (como mostra na Figura 15), através de técnicas de digestão e ligação enzimática, utilizando enzimas de restrição e T4 DNA ligase, ambas da New England Biolabs (NEB). Todos os plasmídeos utilizados no presente trabalho foram de múltiplas cópias, para expressão de genes sob o controle de promotores constitutivos como da fosfoglicerato quinase (PGK) ou do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GPD), contendo os genes que completam a auxotrofia da levedura URA3 ou TRP1 (síntese de uracila e triptofano respectivamente), como exposto na Tabela 9. Todos os plasmídeos gerados estão listados na Tabela 9.

Tabela 9 – Lista dos plasmídeos utilizados e construídos e iniciadores utilizados.

Plasmídeo	Descrição	Fonte ou referência
pPGK	URA3 PGK1p-PGK1t	KANG et al.,1990
p426-GPD	URA3 GPDp-CYCt	ATCC® 87361TM
p424-GPD	TRP1 GPDp-CYCt	ATCC® 87357TM
pPGK-SpFRS1	URA3 PGK1p-SpFRS1-PGK1t	Este trabalho
pPGK-SpXUT1	URA3 PGK1p-SpXUT1-PGK1t	Este trabalho
p426-GPD-SaXUT1	URA3 GPDp-SaXUT1-CYCt	Este trabalho
p426-GPD-MgGET1	URA3 GPDp-MgGET1-CYCt	Este trabalho
p426-GPD-SaRGT2	URA3 GPDp-MgGET1-CYCt	Este trabalho
pPGK-tSpXUT1	URA3 PGK1p-tSpXUT1-PGK1t	Este trabalho
p426-GPD-tSaXUt1	URA3 GPDp-tSaXUt1-CYCt	Este trabalho
p426-GPD-tMgGET1	URA3 GPDp-tMgGET1-CYCt	Este trabalho
p426-GPD-HXT2.4	URA3 GPDp-HXT2.4-CYCt	Este trabalho
p426-GPD-AGT1	URA3 GPDp-AGT1-CYCt	Este trabalho
p426-GPD-MGxb	URA3 GPDp-MGbxCYCt	Este trabalho
p426-GPD-CTxb	URA3 GPDp-CTbxCYCt	Este trabalho
p426-GPD-PAT1	URA3 GPDp-PAT1CYCt	Este trabalho
p426-GPD-SpBGL2	URA3 GPDp-SpBGL2-CYCt	Este trabalho
p424-GPD-SpBGL2	TRP1 GPDp-SpBGL2-CYCt	Este trabalho

Primer	Gene amplificado	Sequência 5'- 3'
pPGK-XUT1-F	<i>SpXUT1</i>	AGATCGGAATTC AAGCTT <u>ATGCACGGAGGTT CAGACG</u>
pPGK-XUT1-R		GCCGGATCCGGCTT <u>AAGCACTGTCAGCATCAGC</u>
XUT1t-f	<i>tSpXUT1</i>	GGCGAATTC AAAATGCACGGAGGTT CAGACGG
XUT1t-R		GGCGGATCC AAAAGTCAGAGTCTAATCTCTCCGCC
pPGK-T2-F	<i>SaXUT1</i>	AGATCGGAATTC AAGCTT <u>GGATCCATGCACGGAGGTT CAGATAGTAA</u>
p426-SUT2-R		GCCCTCGAGGTCGACCCCGGGGGCTT <u>AATCAGCATCAGCAACCTTTTC</u>
SUT2t-F	<i>tSaXUT1</i>	GCCGGATCC AAAATGCGTTT <u>AGA AATCGCCGGTAAACC</u>
SUT2t-R		GCCCTCGAGGTCGACATCAGAATCTAAGTCTTCTAATCCA
Mg1-F2	<i>MgGET1</i>	GGATCCCCCGG <u>ATGGTAGCGTCAATCAAATC</u>
Mg1-R		GAATTC <u>AAGCTT TACTTCTTGACCTCCTCTC</u>
tMg1-F	<i>tMgGET1</i>	GGATCCCCCGG <u>ATGGTTGTTGAACAGGAACAACC</u>
tMg1-R		CTCGAGA <u>AAGCTT ACTAATCTCCGAGTGATCAG</u>
pPGK-FRS-F	<i>SpFRS1</i>	TGG <u>GAA TTC</u> AAG CTGGATCCATG TCA GGT ACA ATT AGC CCA AC
FRS-R		CCC <u>AAGCTT</u> GGGCTA TTT AGT TAA AAA TCT CTTCAT

(continua na próxima página)

Tabela 9 – Lista dos plasmídeos utilizados e construídos e iniciadores utilizados. (continuação)

Primer	Gene amplificado	Sequência 5'- 3'
pPGK-T6-F	<i>SaRGT2</i>	AGATCGGAATTCAAGCTT GGATCC <u>ATGTTCAAATTCCTAGAGCAAATA</u>
p426-SUT6-R		GCG CTCGAG GTGCGACCCCGGGGGCT <u>ACTTTTGTGTTTTCTCTTGTTCTTG</u>
Mguil-F	<i>MgCBT2</i>	GGCG GGATCC <u>ATGGTTTCCAATTCGTCCTCATACTGG</u>
Mguil-R		GGCA AGCTT <u>TCA TAC TTT TTC AGC ATG TTC AAG CG</u>
C'Tropic-F	<i>CtCBT1</i>	GGC GAATTC AAATGTCATCCAAAGATAATATCATCATCACTGAAG
C'Tropic-R		GGC CTCGAG GTGCGAC <u>CTA GGC CAA TTT TTC AAC GTG ATC AAC C</u>
AGT1p4x6-F	<i>AGT1</i>	GACA AGCTT <u>ATGAAAAATATCATTTC</u>
AGT1p4x6-R		GAC CTCGAG <u>TTAACATTATCAGCTGC</u>
HXT2.4-F	<i>HXT2.4</i>	GGCGGA TCC AAATGTCCTGACAAACTCACAACATCAAG
HXT2.4-R		GGC CTCGAG <u>GTCGAC ATAATCAGGTATAATTTA TTGACTAAAGCTTAG</u>
BglSp2-F	<i>SpBGL2</i>	GAATTC GTGCGAC <u>ATGACCGTGTCTGATTCGATGTTG</u>
BglSp2-R		CTCGAG GTGCGACCTA <u>ATTACCTTCCAGAAGAACTTTGATC</u>
PAT1-F	<i>PAT1</i>	GAC GAATTC GGATCC <u>ATGGTGTGCGGGCCGAGACG</u>
PAT1-R		GACA AGCTT <u>TTACACCTCGCCACGCAGGTTATCG</u>

Nota: As sequências em negrito indicam sítios para as enzimas usadas e as sequências sublinhadas indicam a região de homologia ao gene.

Tabela 10 – Listagem dos genes selecionados no presente trabalho e seus números de acesso no NCBI.

Açúcar	Gene	Levedura fonte	GeneID/GenBank
Xilose	<i>SaXUT1^a</i>	<i>Spathaspora arborariae</i>	AYLH01000110.1
	<i>SaRGT2^a</i>	<i>Spathaspora arborariae</i>	AYLH01000174.1
	<i>SpXUT1^a</i>	<i>Spathaspora passalidarum</i>	GL996500.1
	<i>SpFRS1^a</i>	<i>Spathaspora passalidarum</i>	XM_007373841.1
	<i>MgGET1^a</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	XM_001485516.1
Xilobiose Celobiose	<i>PAT1^b</i>	<i>Pseudozyma antarctica</i>	XM_014800838.1
	<i>HXT2.4^a</i>	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	NC_009068.1
	<i>AGT1^a</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NM_001181418.3
	<i>MGbx^a</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NW_001809800.1
	<i>CTbx^a</i>	<i>Candida tropicalis</i>	NW_003020058.1
	<i>SpBGL1^b</i>	<i>Spathaspora passalidarum</i>	XM_007377148.1

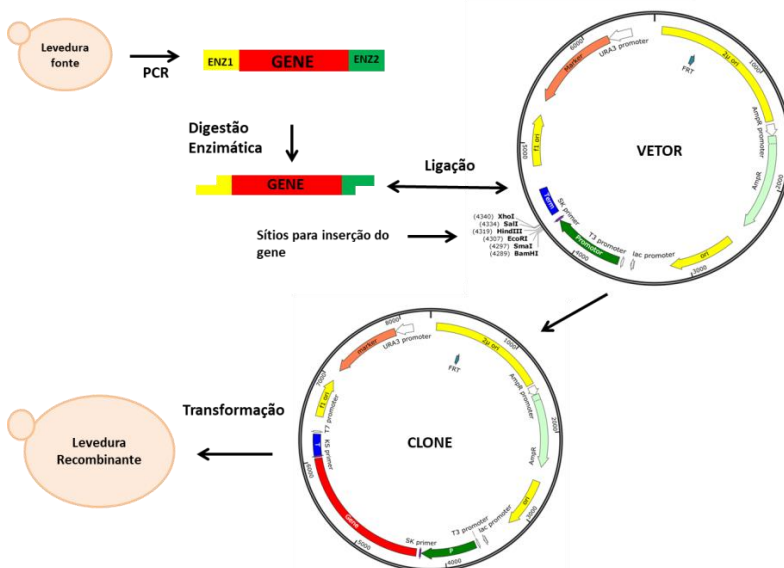
(continua na próxima página)

Tabela 10 – Listagem dos genes selecionados no presente trabalho e seus números de acesso no NCBI. (continuação)

Açúcar	Gene	Levedura fonte	GeneID/GenBank
Xilobiase Celobiase	<i>SpBGL2^b</i>	<i>Spathaspora passalidarum</i>	XM_007375408.1
	<i>SpCBT1^a</i>	<i>Spathaspora passalidarum</i>	XM_007371992.1
	<i>SpCBT2^a</i>	<i>Spathaspora passalidarum</i>	XM_007373407.1

Nota: ^a genes para transportadores, ^b genes para enzimas.

Figura 15 – Esquema de construção dos plasmídeos recombinantes. A partir da levedura fonte de interesse, o gene é amplificado por PCR, gerando um módulo de clonagem que contém os sítios para as enzimas de restrição à montante e jusante ao gene. Após a digestão do módulo e do plasmídeo (vetor), com a mesma combinação de enzimas, é gerado extremidades complementares entre eles que servirá para o perfeito encaixe gene/plasmídeo, dando origem ao plasmídeo clone que será propagado em *E. coli* e posteriormente transformado na levedura.



Fonte: Este trabalho.

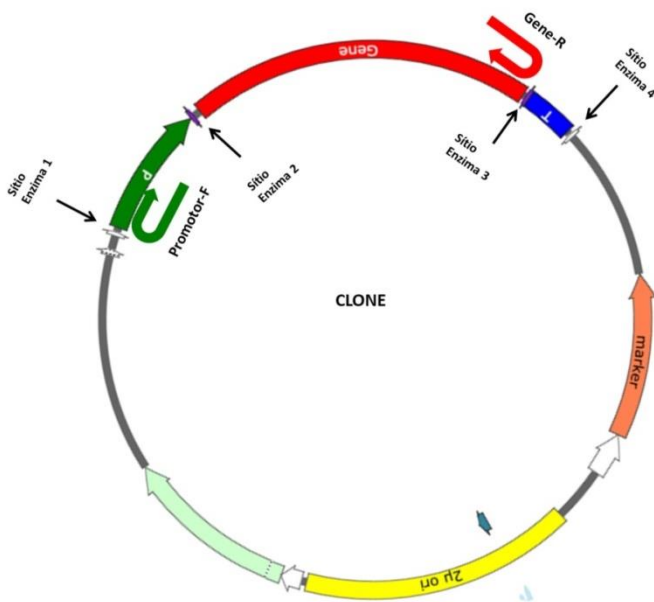
3.5 - Transformação de bactérias e leveduras

Os plasmídeos clones, foram propagados em bactéria *E. coli* DH5 α , através de transformação realizadas pelo método de cloreto de

cálcio ou por eletroporação (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Após a propagação, os plasmídeos foram extraídos da bactéria através de miniprep. Antes da transformação em leveduras, a correta inserção do gene no plasmídeo foi verificada por PCR, utilizando *primers* que se anelavam no promotor e no final do gene, como mostra na Figura 16. Além disso, foram realizadas digestões com várias combinações de enzimas, afim de verificar o correto tamanho do fragmento inserido.

Após a verificação da correta inserção do gene, os plasmídeos foram transformados em *S. cerevisiae* pelo método de acetato de lítio (GIETZ; WOODS, 1992). As linhagens transformantes selecionadas em meio sintético completo sem uracila e/ou sem triptofano, com 2% maltose. Após a seleção das colônias transformantes, os plasmídeos foram extraídos com o kit Yeast Plasmid Miniprep (Zymo Research), para verificações da mesma forma como feita anteriormente (Figura

Figura 16 – Esquema de verificação da correta inserção do gene no plasmídeo. Seta verde e vermelha indicam os pontos de amplificação utilizando os *primers* “forward” e “reverse” respectivamente. Setas pretas indicam pontos de clivagem de enzimas de restrição, para diferentes combinações de verificação.



Fonte: Este trabalho.

3.6 - Análise de fragmentos de DNA em gel de agarose

Os fragmentos de DNA gerados por PCR ou digestões enzimáticas foram analisados através de seus perfis de migração em géis de agarose. Para isto, foram submetidos a corridas eletroforéticas empregando géis de agarose 1% (Sigma) em tampão de TBE 0,5 X (Sambrook; Russel, 2001) acrescidos com 2,5 µg/ml de brometo de etídeo. As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando tampão de corrida TBE 0,5 X, a 75-100V por 40 a 60 minutos. Após a corrida, o gel foi analisado e fotografado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System (BioRad). Para as análises dos fragmentos de DNA foram utilizados marcadores de peso molecular de DNA, como referência nas corridas eletroforéticas, de procedência da New England Biolabs (NEB).

3.7 - Ensaio de transporte com ¹⁴C-D-glicose e ¹⁴C-D-xilose

Para esse ensaio, as células foram crescidas até a fase exponencial (OD 600 nm 0,6-1,0), em seguida foram lavadas duas vezes com água destilada gelada e ressuspensas em água até uma concentração final de cerca de 20 mg de massa seca/mL. As velocidades iniciais de absorção foram determinadas usando açúcares marcados com ¹⁴C: D-[U-¹⁴C] xilose e D-[U-¹⁴C] glicose (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). Em tubos Rohren de 5 mL, 20 µL de tampão Tris/citrato 100 mM (pH 5,0) e 20 µL da suspensão celular foram misturados e incubados durante 5 min a 25 °C. A reação foi iniciada com a adição de 10 µL de açúcar radiomarcado (radioatividade específica 102-104 cpm/nmol), em várias concentrações, e foi interrompida após 5 segundos por diluição vigorosa com 5 mL de água destilada à 4 °C. A suspensão resultante foi imediatamente filtrada através de membranas Whatman GF/C (2,5 cm de diâmetro) e o filtro foi lavado duas vezes com 10 mL de água destilada gelada. O filtro foi então transferido para um frasco de cintilação contendo 6 mL de cocktail de líquido de cintilação Wallac OptiPhase 'HiSafe' 2 (Walla, Turku, Finlândia). A radioatividade foi medida em um analisador de cintilação líquida Tri-Carb™ 1600 CA (Packard, Downers Grove, IL, EUA). O ponto de tempo de controle (0 s) foi realizado de forma semelhante, mas a suspensão celular foi diluída com água gelada antes da adição do açúcar marcado. Os parâmetros cinéticos foram estimados por análise de regressão não-linear Michael-Menten usando o software Graphpad Prism 3.0.

3.8 - Ensaio de Co-transporte

A atividade de próton-simporte foi estimada pela determinação das velocidades iniciais de influxo de prótons, provocada pela adição de açúcar à suspensão de células de levedura. A detecção foi realizada, utilizando um eletrodo de pH Crison (Crison, Alella, Espanha) combinado com um medidor de pH/pHM240 (Radiometer-Copenhagen, Lyon, França), conectados a um computador que permitiu que as medições de pH fossem registradas a cada 0,4 segundos. O eletrodo de pH foi imerso em uma câmara com capacidade para 2 mL de água, mantida a 25 ° C e provida com agitação magnética. Na câmara, foram adicionados 1,32 mL de água destilada e 150 µL de suspensão celular com concentração final de cerca de 20 mg de massa seca/mL. O pH foi ajustado para 5,0 usando HCl ou NaOH 1M, até se obter uma linha de base adequada. A solução do açúcar a ser testado (30 µL) em várias concentrações, foi adicionada à suspensão celular aquosa e a subsequente alcalinização do meio foi registrada.

3.9 - Determinação da atividade enzimática

A atividade de hidrólise enzimática foi avaliada utilizando-se células permeabilizadas com tolueno, etanol e triton X-100. E utiliza-se *p*-Nitrofenil β-D-glicopiranosideo (*p*NPβG) ou *p*-Nitrofenil β-D-xilopiranosideo (*p*NPβX) como substrato. Para calcular a atividade de hidrólise, foram quantificados o *p*-Nitrofenol formado, conforme protocolo adaptado de Stambuk e colaboradores (1999): Foram preparadas suspensão celulares a 20 g/L. um volume de 100 µL da suspensão celular foi transferida para um tubo de 1,5 mL, centrifugado por 3 min. a 5000 g e a parte líquida desprezada. As células remanescentes foram ressuspensas em 500 µL de Tampão A (tampão 100 mM MOPS-NaOH pH 6.8) e novamente centrifugado e desprezado a parte líquida. As células foram novamente ressuspensas em 200 µL de Tampão B (20% de glicerol, 1 mM de DTT e tampão MOPS-NaOH pH 6.8) e 12 µL de Solução C (tolueno.A, etanol P.A e triton X-100 10% em água na proporção 1:4:1 – v:v:v) e após homogeneização por 1 min em Vortex, o tubo foi centrifugado por 3 min a 5000 g e novamente desprezada a parte líquida. As células foram novamente ressuspensas em 1 mL de tampão B, centrifugadas e parte líquida desprezada (repetido 2x). Em seguida 1 mL de Tampão A foi adicionado ao tubo para formar uma suspensão de células permeabilizadas. 50 µL dessas células permeabilizadas foram adicionados em 5 tubos (para amostras

em triplicata e controle em duplicata). As células controles foram incubadas em Banho Maria a 100 °C por 10 min. Foi adicionado em cada tubo 950 µL de Tampão Sintético (2 mM de *p*NPβG ou *p*NPβX e tampão MOPS-NaOH pH 6.8). Em seguida, os tubos foram incubados em Banho Maria 30 °C por 30 min e depois incubados a 100 °C por 10 min e rapidamente esfriados em banho de gelo. Os tubos foram centrifugados e 800 µL da parte líquida usado para leitura de absorbância a 400 nm. A atividade foi calculada em função da concentração de *p*-Nitrofenol formado, por minuto e por miligrama de células, através da equação 3.

$$V = [(Abs_{Amostra} - Abs_{Controle}) \cdot 1000] / (t \cdot X \cdot \Delta\epsilon) \quad (3)$$

Onde:

V = atividade de hidrólise em nmoles . mg⁻¹ . min⁻¹

Abs_{Amostra} = Absorbância em 400 nm da amostra

Abs_{Controle} = Absorbância em 400 nm do controle

t = Tempo em minutos de reação

X = Concentração de biomassa em mg, contida em 100 µL

Δε = Coeficiente de absorbância Molar (7,28 mM⁻¹. cm⁻¹ em pH>6,8).

3.10 - Truncagem de transportadores

Para a retirada dos resíduos de lisina (K) nas porções N e C-terminais dos transportadores, primeiramente, as sequências de aminoácidos dos transportadores de interesse foram submetidas a uma análise de predição de sítios de ubiquitinação. Para isto, foi utilizado o programa UbPred (<http://www.ubpred.org/>) (Radivojac *et al.*, 2010). As lisinas consideradas foram aquelas preditas com média e alta confiança. Após a identificação dos sítios, novos *primers* foram desenhados, mudando a posição do códon da metionina para imediatamente depois do último códon de Lisina que seria ubiquitinada (*primer Forward*) na porção N-terminal, e/ou mudando o códon STOP para imediatamente antes do códon da primeira lisina que seria ubiquitinada na porção C-terminal da proteína (*primer Reverse*), como mostrado na Figura 17. Dessa forma, o gene seria novamente amplificado sem essas partes da sequência e novamente clonado em plasmídeo da mesma forma como antes.

Figura 17 – Esquema de truncagem das seqüências de transportadores.



3.11 - Hidrólise enzimática da xilana

Para preparar o hidrolisado, foi adicionado a 2% de xilana (Xylan from beechwood – SIGMA ALDRICH), 350U/g de xilanase de Cellic®HTec2 (NOVOZYMES). Essa suspensão de xilana e enzima foi colocada sob agitação de 140 rpm por 4 horas, a 50 °C. Antes de esterilizar o hidrolisado por filtração em filtro 0,22 µm, este foi fervido por 10 minutos para inativar as enzimas presentes.

3.12 - Determinação dos substratos e produtos das fermentações

As determinações dos açúcares e metabolitos produzidos foram realizadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), equipado com detector de índice de refração (RI-2031Plus, JASCO, Tokyo, Japan) utilizando coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). O HPLC foi operado a 50°C utilizando-se 5 mM de H₂SO₄ como fase móvel com fluxo de 0,6 mL/min e 10 µL de volume de injeção.

3.13 - Modelagem e *docking* molecular

O modelo tridimensional dos transportadores foi gerado usando o servidor SWISS-MODEL (Biasini *et al.*, 2014) (<https://swissmodel.expasy.org/>), com base na estrutura *inward-facing* aberta e *outward-facing* parcialmente ocluída, do transportador *XylE* de *E. coli* (PDB ID: 4QIQ, 4GBY1 respectivamente). A qualidade estrutural do modelo PDB foi verificada pela análise Ramachandran Plot (Lovell *et al.*, 2003). O servidor SWISS-DOCK (<http://www.swissdock.ch/docking>) (Grosdidier *et al.*, 2011) foi utilizado para o *docking* molecular com os açúcares de interesse que estão depositados no ZINC. Para a manipulação da estrutura ligada ao substrato foi utilizado o software MODELLER (Webb & Sali, 2014).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Clonagem e caracterização de transportadores de xilose

Para o estudo da expressão de novos possíveis transportadores de xilose é necessário uma linhagem plataforma que seja capaz de metabolizar essa pentose e que, além disso, a atividade de transporte apresentada pela célula corresponda à atividade do transportador sendo investigado, isto é, que seja da única permease sendo expressa. Com esse objetivo, foi construída a linhagem laboratorial DLG-K1 (Tabela 8) (Gonçalves *et al.*, 2014). Esta linhagem, além de ser derivada da *S. cerevisiae* KY73 (Batista *et al.*, 2004), cujos principais genes de transportadores de açúcares foram deletados (*hxt1Δ-hxt7Δ* e *gal2Δ*), foi transformada com o plasmídeo integrativo pAUR-XKXDHXK (Matsushika *et al.*, 2008) que sobre-expressa os genes que codificam as enzimas xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xilulocinase (XK). A XR e a XDH correspondem aos genes *XYL1* e *XYL2* provenientes de *Sc. stipitis* e a XK corresponde ao gene *XKS1* de *S. cerevisiae*, já que esta levedura apresenta níveis muito baixos dessa enzima (Deng & Ho, 1990; Eliasson *et al.*, 2000). Esta linhagem de levedura foi utilizada para analisar a contribuição dos transportadores *HXTs* nativos (*HXT1*, *HXT2*, *HXT5* e *HXT7*) em fermentações de xilose e xilose/glicose (Gonçalves *et al.*, 2014), e mais recentemente, foi também utilizada para a clonagem, a partir de uma biblioteca genômica de *Sc. stipitis*, de três genes de transportadores (*SsXUT1*, *SsQUP2* e *SsHXT2.6*) que permitem a fermentação de glicose e xilose pelas linhagens de levedura recombinantes (de Sales *et al.*, 2015).

Como pode ser observado na Tabela 11, as linhagens de *S. cerevisiae* BBY-SsHXT2.6, BBY-SsXUT1 e BBY-SsQUP2 consumiram 100% da glicose presente nos meios, enquanto que consumo de xilose pelas mesmas linhagens foi entre 70% e 90%, em 30 horas de fermentação. Moon e colaboradores (2013) também clonaram transportadores de *Sc. stipitis*, e mostraram que as linhagens expressando os transportadores *RGT2*, *XUT7* e *XUT6*, permitiram um consumo médio de 85% de xilose, sendo que a linhagem com maior consumo foi a que expressava o transportador *RGT2*. Por outro lado, no trabalho de Young e colaboradores (2014), a linhagem expressando *RGT2* de *Sc. stipitis* apresentou o crescimento mais rápido em xilose, quando comparado a todos os outros transportadores de *Sc. stipitis* estudados, enquanto que o transportador *XUT3* de *Sc. stipitis* consumiu apenas 50% da xilose em 100 h de fermentação (Young *et al.*, 2012)

As linhagens expressando os transportadores clonados de *Sc. stipitis* apresentaram também diferentes produtos da fermentação, sendo que o transportador *SsXUT1* permitiu a maior produção de etanol (Tabela 11), enquanto que para os outros transportadores o principal produto da fermentação da xilose foi xilitol (*SsQUP2*) ou xilitol e etanol (*SsHXT2.6*). De qualquer forma, os rendimentos de etanol quando apenas xilose estava presente como fonte de carbono (Tabela 11) foram menores nas linhagens expressando os transportadores de *Sc. stipitis*, quando comparado com o rendimento da mesma linhagem expressando o transportador endógeno *HXT7* de *S. cerevisiae* (Gonçalves *et al.*, 2014).

Tabela 11 – Parâmetros fermentativos com 2% glicose ou 2% xilose como fontes de carbono por leveduras recombinantes expressando transportadores de *Sc. stipitis*.

Fonte de carbono e gene:	Consumo do açúcar (%)	V_S (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^a	V_E (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b	$Y_{E/S}$ (g.g ⁻¹) ^c
<u>Glicose:</u>				
<i>SsHXT2.6</i>	100	6.7 ± 0.1	1.76 ± 0.01	0.40 ± 0.01
<i>SsXUT1</i>	100	7.4 ± 0.1	1.62 ± 0.02	0.41 ± 0.01
<i>SsQUP2</i>	100	7.5 ± 0.7	1.48 ± 0.05	0.27 ± 0.03
<u>Xilose:</u>				
<i>SsHXT2.6</i>	90	0.9 ± 0.1	0.60 ± 0.02	0.14 ± 0.01
<i>SsXUT1</i>	90	1.2 ± 0.2	0.55 ± 0.03	0.23 ± 0.02
<i>SsQUP2</i>	70	0.6 ± 0.1	0.15 ± 0.05	0.07 ± 0.02

Nota: ^a consumo máximo volumétrico de açúcar, ^b produção máxima volumétrica de etanol, ^c rendimento da fermentação. Fonte: Adaptado de de Sales *et al.* (2015)

Ao analisar os dados das co-fermentações de glicose e xilose pelas linhagens BBY-*SsHXT2.6*, BBY-*SsXUT1*, BBY-*SsQUP2*, é possível observar que os transportadores expressos nessas linhagens tiveram preferência pela glicose em relação à xilose (Tabela 12), sendo que a presença da glicose inclusive tornou o consumo de xilose mais lento. Essa situação em que linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* preferem captar glicose antes de passarem a consumir xilose é bem conhecida na literatura (Webb e Lee, 1990; Sanchez *et al.*, 2002;

Yablochkova *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2012; Moon *et al.*, 2013). De qualquer forma, os rendimentos de etanol durante as co-fermentações foram semelhantes às obtidas com outros transportadores de *Sc. stipitis* (*RGT2*, *SUT4* e *XUT7*) expressos em *S. cerevisiae* (Moon *et al.*, 2013), e novamente a linhagem que apresentou a maior produção de etanol foi a que expressava o transportador *SsXUT1* (Tabela 12).

Na tentativa de melhor caracterizar estes transportadores provenientes da biblioteca genômica de *Sc. stipitis*, foram também realizadas as cinéticas do transporte de xilose e glicose marcados com carbono radioativo (^{14}C), pelos 3 transportadores clonados (*SsHXT2.6*, *SsXUT1*, *SsQUP2*). Estes ensaios revelaram que, de fato, as três permeases apresentam uma maior afinidade (mas menor V_{\max}) com glicose do que com xilose, enquanto que a V_{\max} com xilose foi maior (Figura 19 e Tabela 13). Além disto, nenhum co-transporte de H^+ (alcalinização do meio) com glicose ou xilose foi observado, assim, podemos afirmar que estes transportadores realizam transporte por difusão facilitada.

Tabela 12 – Parâmetros fermentativos com 2% de glicose e 2% de xilose como fontes de carbono por leveduras recombinantes expressando transportadores de *Sc. stipitis*.

Transportador	Glicose		Xilose		Etanol	
	Consumo (%)	V_S ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) ^a	Consumo (%)	V_S ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) ^a	V_E ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) ^b	$Y_{E/S}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^c
<i>SsHXT2.6</i>	100	6.46 ± 0.3	61	0.59 ± 0.01	1.8 ± 0.02	0.28 ± 0.02
<i>SsXUT1</i>	100	6.26 ± 0.1	80	0.62 ± 0.02	1.53 ± 0	0.30 ± 0.01
<i>SsQUP2</i>	100	6.19 ± 0.2	39	0.34 ± 0.03	1.25 ± 0.04	0.26 ± 0.03

Nota: ^aconsumo máximo volumétrico de açúcar, ^bprodução máxima volumétrica de etanol, ^crendimento da fermentação. Fonte: Adaptado de de Sales *et al.* (2015)

A determinação dos parâmetros cinéticos em uma linhagem de *S. cerevisiae hxt-nulo*, expressando os transportadores *HXT* desta levedura de forma individual, revelaram a presença de basicamente três tipos de transportadores para glicose: permeases de baixa afinidade com K_m variando de 40-100 mM (p.ex. *HXT1* e *HXT3*), expressos na presença de altas concentrações de glicose; transportadores de afinidade moderada com K_m de 10-15 mM (p.ex. *HXT4* e *HXT5*), expressos em altas e baixas concentrações desse açúcar; e os transportadores de alta afinidade com K_m de 1-3 mM (p.ex. *HXT2* e *HXT7*) que são estritamente expressos em

baixas concentrações de glicose (Kruckeberg, 1996; Reifengerger *et al.*, 1997; Ozcan & Johnston 1999). Com base nos dados mostrados na Tabela 13, podemos afirmar que os transportadores clonados de *Sc. stipitis* apresentam uma moderada afinidade para glicose, mas são transportadores de xilose de baixa afinidade.

Figura 19 - Cinética de transporte de ^{14}C -xilose ou ^{14}C -glicose por linhagens *S. cerevisiae* recombinantes com os transportadores provenientes de *Sc. stipitis* (*SsXUT1*, *SsHXT2.6*, e *SsQUP2*). A captação inicial do açúcar por células pre-crescidas em 2% maltose foi determinado nas concentrações indicadas, e os valores representam a média de três ensaios independentes para cada concentração.

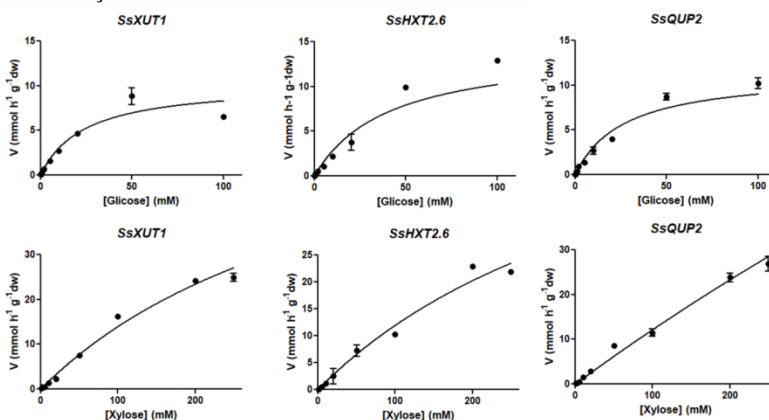


Tabela 13 – Parâmetros cinéticos do transporte de glicose e xilose por cepas de *S. cerevisiae* expressando os genes provenientes da biblioteca genômica de *Sc. stipitis*.

Gene	^{14}C Glucose		^{14}C xilose	
	K_m (mM)	V_{max} [mmol h $^{-1}$ (g peso seco) $^{-1}$]	K_m (mM)	V_{max} [mmol h $^{-1}$ (g peso seco) $^{-1}$]
<i>SsHXT2.6</i>	39,3 ± 13	14,0 ± 4,4	453,9 ± 153	66,2 ± 15,0
<i>SsXUT1</i>	25,0 ± 3,4	10,7 ± 1,2	417,7 ± 176	72,4 ± 27,0
<i>SsQUP2</i>	26,5 ± 3,5	11,4 ± 1,2	818 ± 287	117,0 ± 32,8

Nota: determinados após crescimento em maltose.

A cinética de transporte de glicose por outros transportadores provenientes de *Sc. stipitis* tem sido previamente analisada por Weierstall e colaboradores (1999) e, embora os transportadores *SUT1*,

SUT4 e *SUT3* tenham apresentado afinidades bem mais altas para glicose (com K_m variando de 0,8-1,5 mM), os valores de V_{max} encontrados com as permeases *SUT4* e *SUT3* foram bem mais baixos (3,3 e 3,7 mmol/h/g, respectivamente) quando comparados com os do presente trabalho. Além disso, as leveduras *hxt*-nulo que expressavam esses três genes *SUTs* mostraram uma ineficiente utilização da glicose, condizente com resultados de V_{max} claramente mais baixos para estas permeases, quando comparados com os transportadores endógenos de glicose *HXT* de *S. cerevisiae*.

Os parâmetros cinéticos com xilose nos mostra um K_m bem mais alto para o *SsQUP2*, em comparação com os outros dois (*SsHXT2.6* e *SsXUT1*), que apresentaram afinidades semelhantes com este açúcar (Tabela 13). Esta baixíssima afinidade certamente refletiu no padrão de utilização de xilose pelo *SsQUP2*, que foi menos eficiente em comparação com leveduras expressando os outros dois transportadores. Esse padrão na cinética de transporte de xilose, com baixa afinidade e alta capacidade, também foi descrita para os outros transportadores (*SUT1*, *SUT4* e *SUT3*) de *Sc. stipitis* clonados em *S. cerevisiae* (Weierstall *et al.*, 1999), que apresentaram K_{ms} de 49-145 mM, com V_{maxs} de 41-132 mmol/h/mg peso seco. Resultado semelhante foi encontrado com o transportador *GXF1* de *C. intermedia* que apresentou um K_m de 88 mM com V_{max} de 30 mmol/h/mg peso seco, quando expresso em *S. cerevisiae hxt*-nulo (Leandro *et al.*, 2006). Por outro lado, Du e colaboradores (2010) identificaram dois transportadores específicos para xilose (*An25* e *Xyp29*) provenientes de *N. crassa* e *Sc. stipitis* respectivamente, que exibiram valores de K_m 175.7 mM para *An25* e 56 mM para *Xyp29*. Estes foram caracterizados pelos autores como transportadores de baixa afinidade, embora tenham uma afinidade maior, quando comparado com o sistema de transporte de xilose pelos *HXTs* na *S. cerevisiae*. Young e colaboradores (2012) mostram que após evolução dirigida de dois transportadores heterólogos: *GXS1* de *C. intermedia* e *XUT3* de *Sc. stipitis*, diminui os K_{ms} e aumentou as V_{maxs} nas versões mutantes, melhorando o crescimento em xilose em até 70%. Entretanto, quando analisamos os dados das fermentações e co-fermentações em xilose e glicose, a velocidade de assimilação de xilose ainda continua lenta e ineficiente, e o padrão de utilização sequencial desses açúcares ainda permanece nas linhagens contendo as permeases mutantes.

Nossos resultados indicam que as permeases clonadas de *Sc. stipitis* realizam o transporte por difusão facilitada. De fato, vários trabalhos tem demonstrado que transportadores do tipo H^+ -simporte tem

como característica em comum a presença de aminoácidos com grupos funcionais ionizáveis (por exemplo ácido glutâmico, ácido aspártico, ou histidina) no meio dos domínios transmembranares, sendo que estes aminoácidos seriam responsáveis pela ligação ao próton (Chaptal et al., 2011; Dang et al., 2010; Ditty & Harwood, 2002; Vadyvaloo et al., 2006). Não foi observada a presença de nenhum destes aminoácidos em qualquer segmento transmembranar das sequências clonadas de *Sc. stipitis*. A permease *GXS1* de *C. intermedia* foi o primeiro transportador de xilose/glucose do tipo H^+ -simporte a ser caracterizado em *S. cerevisiae*, e ele exibe um K_m com glicose e xilose de 0,012 mM e 0,4 mM respectivamente (Leandro et al., 2006). É característico de transportadores do tipo co-transporte possuírem alta finidade pelo substrato.

No intuito desenvolver linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes com capacidade de transportar e fermentar xilose mais eficientemente, foram selecionados novos transportadores de açúcares provenientes de outras espécies de levedura fermentadoras de xilose. Em 2014, foi realizado o sequenciamento da levedura *Sp. arborariae*, que naquela época, além de ser descrita como uma nova espécie de levedura isolada da biodiversidade do Brasil, apresentava excelentes capacidades fermentativas em xilose e hidrolisado lignocelulósico (Cadete et al., 2009, 2012, 2013). O genoma completo está anotado sob o número de acesso AYLH00000000 (Lobo et al., 2014) e, utilizando o programa de bioinformática BLAST (Camacho et al., 2009), dez sequências foram identificadas como possíveis transportadores de açúcares, por serem homólogas às de transportadores de açúcares de fungos filamentosos e leveduras (Gonçalves, 2014). Destas dez sequências, duas delas (sequências 3 e 7) já haviam sido previamente analisadas e nomeadas *HXT4* e *GET1*, respectivamente (de Sales, 2015). Essas sequências foram escolhidas baseadas em suas similaridades com conhecidos transportadores de xilose, no qual o *GET1* apresentou 50% de similaridade ao *SsXUT1* (GeneID 4839826) e *SsXUT3* (GeneID 4851844) da levedura fermentadora de xilose *Sc. stipitis* (Jeffries et al., 2007), e com o transportador putativo de xilose *DhXylhP* (GeneID 2900246) de *Debaryomyces hansenii* (Dujon et al., 2004). Já o gene *HXT4* apresentou 63% de similaridade a um transportador ativo de frutose de *C. dubliniensis* (Gamble, 2009). Esses genes foram clonados na linhagem *S. cerevisiae* *hxt-nulo* DLG-K1 para que suas funções como transportadores de xilose fossem verificadas. Porém, nenhuma das linhagens obtidas (BBY-SaGET1 e BBY-SaHXT4) foram capazes de utilizar outras fontes de carbono além de maltose, embora a SaGet1

tenha sido capaz de captar glicose apenas quando maltose também estava presente (de Sales, 2015).

Diante disto, o presente trabalho decidiu investigar a capacidade de transportar xilose de mais duas sequências da levedura *Sp. arborariae*. Sendo assim, a sequência 4 (nomeada de *SaXUTI*) e a 6 (nomeada *SaRGT2*) foram escolhidas baseando-se em análises adicionais das sequências de aminoácidos, utilizando programas de bioinformática para realizar predição de suas estruturas secundárias (PSPIPRED) e a existência de segmentos transmembrana (HMMTOP v2.1) (Pirovano *et al.*, 2008; Pirovano & Heringa, 2010; Simossis *et al.*, 2005). Além da presença dos 12 segmentos transmembranas (TM) de α -hélices hidrofóbicas, que é considerado uma característica estrutural dos transportadores, especialmente transportadores de monossacarídeos (Reddy *et al.*, 2012), estas sequências também abrigavam um motivo conservado (G-G/F-XXX-G) em transportadores de xilose, localizado no TM1 (Young *et al.*, 2014). O gene *SaXUTI* apresenta 79% de identidade com *SsXUTI* de *Sc. stipitis* (GeneID 4839826), e 35% de identidade com o transportador exclusivo de xilose *Xyp29* (GeneID 4841106) proveniente de *Sc. stipitis* (Du *et al.*, 2010, de Sales *et al.*, 2015), além de uma identidade de 33% com o transportador *GXF1* de *C. intermedia* (GeneID CAI44932.1). Já o gene *SaRGT2* apresenta identidade de 46% com o transportador *GXF1* de *C. intermedia* e 52% de identidade com o gene *RGT2* (GeneID 851417) de *S. cerevisiae*, o que nos levou a nomeá-lo com este mesmo nome.

Além da *Sp. arborariae*, a espécie do mesmo gênero, *Sp. passalidarum*, vem se destacando muito nos últimos anos em virtude da sua excelente capacidade em fermentar xilose, inclusive superando a espécie *Sc. stipitis* (Hou *et al.*, 2012), que até então era a melhor espécie fermentadora de xilose encontrado na natureza. Isto é verdade também para cepas isoladas da biodiversidade brasileira que, além de tudo, foi capaz de fermentar hidrolisados lignocelulósicos do bagaço de cana-de-açúcar e da palha de arroz (Cadete *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2006). A partir do genoma sequenciado desta levedura (Wohlbach *et al.*, 2011), duas sequências de possíveis transportadores de xilose foram selecionadas para que fossem testadas na *S. cerevisiae* DLG-K1. A primeira sequência selecionada estava anotado no NCBI como frutose simporte e por isto foi nomeado *SpFRS1*. A segunda sequência escolhida, estava anotado como transportador putativo de alta afinidade *XUTI* e por isto foi nomeado *SpXUTI*. Essas sequências também foram selecionadas levando em consideração as características mencionadas anteriormente, no entanto, apenas o *SpXUTI* abriga o motivo G-G/F-

XXX-G. O transportador *SpFRS1* apresentou 26% de identidade com o transportador de alta afinidade para xilose *XUT7* (GeneID 4851701) de *Sc. stipitis*, 28% de identidade com *GXF1* de *C. intermedia* (GeneID CAI44932.1) e com *SsXUT1* de *Sc. stipitis* (GeneID 4839826). Já a permease *SpXUT1* apresentou 80% de identidade com *SsXUT1*, 34% com *Xyp29* e 33% com *XUT7*, todos estes, transportadores de *Sc. stipitis*. Todas as quatro sequências selecionadas estão com seus números de acesso no GenBank anotados na Tabela 10 de Material e Métodos.

Essas sequências foram clonadas em vetores multicópia utilizando os *primers* e promotores constitutivos como descrito na Tabela 9. A correta inserção dos genes foi verificada através de *primers* que se anelavam no promotor do plasmídeo e no final do gene inserido, garantido a verificação da correta posição do gene no plasmídeo, como mostrado na Figura 16. Verificações adicionais foram feitas utilizando combinações de enzimas de restrição. Os plasmídeos transformantes foram propagados em *E. coli* DH5 α e em seguida transformados na linhagem *S. cerevisiae* *hxt*-nulo DLG-K1. As novas linhagens (Tabela 8) foram denominadas de DGL-SaXUT1 (com gene *SaXUT1* de *Sp. arborariae*), DGL-SaRGT2 (com gene *SaRGT2* de *Sp. arborariae*), DLG-SpFRS1 (com o *SpFRS1* de *Sp. passalidarum*) e DLG-SpXUT1 (com *SpXUT1* de *Sp. passalidarum*). Adicionalmente, foi construída uma linhagem apenas com o vetor de expressão vazio como controle negativo, tal cepa foi denominada DLG-GPD por abrigar o plasmídeo vazio p426-GPD. Em seguida, as linhagens transformantes foram crescidas em meio sintético completo sem uracila, com diferentes fontes de carbono como maltose, glicose, xilose, frutose e galactose. Como esperado, todas as linhagens mantiveram seus crescimentos em maltose (Figura 20) e, apesar da linhagem expressando o gene *SpFRS1* ter apresentado um crescimento menor em maltose, o consumo deste açúcar e produção de etanol foi muito semelhante entre as cinco linhagens. Por outro lado, nenhuma delas foi capazes de crescer ou fermentar frutose ou galactose (dados não mostrados). Das quatro linhagens construídas, apenas a DLG-SaXUT1 e DLG-SaRGT2 foram capazes de restaurar na *S. cerevisiae* DLG-K1 a capacidade de crescer e consumir glicose (Figura 21), embora após uma extensiva fase *lag* de mais de 100 h.

Figura 20 - Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-SaXUT1, DLG-SaRGT2, DLG-SpFRS1, DLG-SpXUT1, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% maltose.

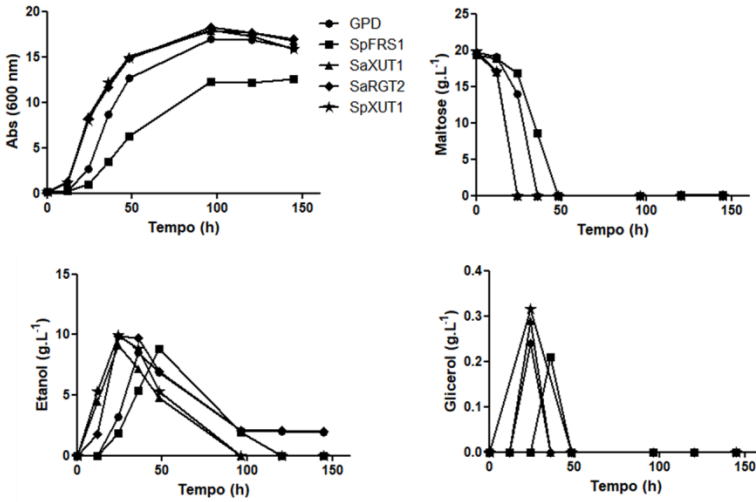
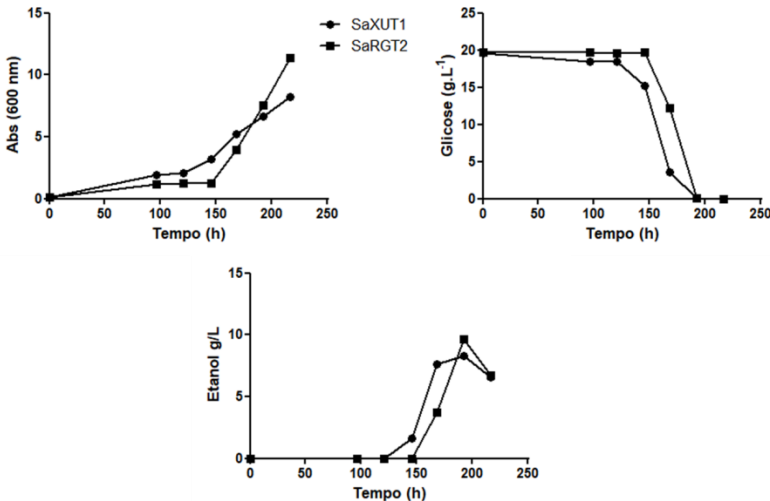


Figura 21 - Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-SaXUT1, DLG-SaRGT2, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% de glicose.



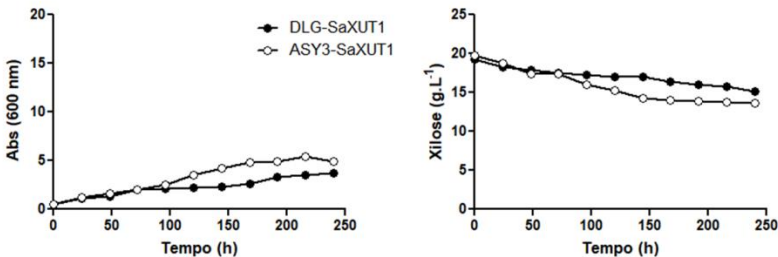
A fase *lag* do ciclo de crescimento microbiano representa o período de tempo necessário para que os micro-organismos se adaptem a um novo ambiente antes que a multiplicação de células comece (Robinson *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2001; McKellar *et al.*, 2002a). Alguns trabalhos que modelaram o comportamento de bactérias nos alimentos mostraram que a fase *lag* é mais difícil de prever do que a velocidade específica de crescimento (McMeekin *et al.*, 1993; Duh & Schaffner, 1993; Duffy *et al.*, 1994a; Knøchel & Gould, 1995; Augustin & Carlier, 2000). Isto implica que inúmeras variáveis, incluindo o histórico de temperatura da cultura do inóculo e suas condições de crescimento, portanto o estado fisiológico e tamanho do inóculo, têm efeito profundo sobre a fase *lag* (Albertson *et al.*, 1990; Mackey e Derrick, 1984; Breand *et al.*, 1999; Augustin *et al.*, 2000a). Existem poucas informações específicas sobre os possíveis efeitos das interações célula-célula na fase *lag*, embora a sinalização celular tenha mostrado afetar o surgimento de células em dormência e o tempo de latência das populações em biofilmes (Mukamolova *et al.*, 1998; Batchelor *et al.*, 1997).

De todas as quatro linhagens transformantes, apenas a DLG-SaXUT1 foi capaz de consumir ~4 g/L de xilose (Figura 22) do meio, sem praticamente ter ocorrido crescimento celular. Porém, é necessário relatar que esta linhagem recombinante floculou durante o crescimento em xilose, e isso pode estar subestimando os valores de crescimento mostrados no gráfico. A floculação é um fenômeno complexo influenciado por uma multiplicidade de fatores. Além das características genéticas das cepas (presença de genes FLO, supressores e ativadores), diferentes parâmetros afetam a floculação, incluindo a concentração de Ca^{2+} presente nos meios, pH, temperatura, açúcares, oxigênio e etanol. Por outro lado, a limitação de nutrientes também induz o início da floculação (Soares *et al.*, 2011). Isso pode explicar a floculação apresentada pela cepa DLG-SaXUT1 em xilose, uma vez que o consumo deste açúcar é baixo e as células podem estar sob limitação de nutrientes.

Na tentativa de melhorar o crescimento em xilose pelo transportador *SaXUT1*, alternativamente, seu gene foi inserido em uma linhagem DLG-K1 deletada do gene *PHO13* (denominada ASY-3, vide dos Santos, 2016). A deleção do *PHO13* melhora a utilização de xilose por *S. cerevisiae* recombinantes, uma vez que esse gene está envolvido na modulação das enzimas presentes na via das pentoses fosfato (Kim *et al.*, 2013 e 2015; Ni *et al.*, 2007). Embora o esperado fosse uma melhora no consumo da xilose pela nova linhagem gerada (ASY3-SaXUT1), a

Figura 22 nos mostra que a diferença entre a linhagem *pho13Δ* e a parental não foram significativamente diferentes, apesar que a ASY3-SaXUT1 consumiu ~2 g/L a mais de xilose do que a DLG-SaXUT1, e não foi detectada a produção de etanol (dos Santos, 2016).

Figura 22 - Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagem recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-SaXUT1 e ASY3-SaXUT1, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% de xilose.



Considerando que os métodos utilizados para selecionar genes de transportadores, como o BLAST, não permitiram encontrar genes para o transporte eficiente de xilose, decidimos usar outra estratégia baseada em modelagem e *docking* de proteínas, usando os programas SWISS-MODEL e SWISS-DOCK, respectivamente (Biasini *et al.*, 2014; Grosdidier *et al.*, 2011). O critério de seleção foi escolher uma proteína transportadora que se ligava apenas com xilose no poro central do transportador, e nunca com glicose. A análise do genoma de *M. guilliermondii* (Butler *et al.*, 2009), uma levedura descrita como capaz de crescer e fermentar xilose e hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar (Martini *et al.*, 2016), revelou um gene (Tabela 10) com essas características (Figura 23), que foi denominado *MgGET1*. Este gene foi clonado em plasmídeo multicópia e transformado na linhagem DLG-K1, da mesma forma que os demais genes descritos acima, dando origem à linhagem DLG-MgGET1 (Tabela 8).

Assim como as linhagens transformantes anteriores, a DLG-MgGET1 também não foi capaz de crescer nem fermentar frutose e galactose (dados não mostrados), mantendo o mesmo padrão de crescimento em maltose quando comparado com a parental (Figura 24). Por outro lado, apesar dos resultados do *docking* com glicose e xilose, que indicavam que este transportador seria específico para xilose, esta linhagem foi incapaz de crescer nesta fonte de carbono, e, pelo contrário, cresceu em glicose (Figura 24) somente após uma extensa fase *lag*,

assim como as linhagens DLG-SaXUT1 e DLG-SaRGT2. Neste sentido, ainda são necessárias mais investigações para verificar os motivos das diferenças obtidas entre os resultados do *docking* e da clonagem do transportador.

Figura 23 – Modelo estrutural e *docking* com glicose ou xilose do transportador *MgGET1*. O modelo baseia-se na estrutura *outward-facing* parcialmente ocluída da *XylE* de *E. coli* ligada à xilose (A), ou ligada à glicose (B) (código ZINC ID 1529214 e 3861213, respectivamente). As imagens 3D foram criadas por MODELLER (Webb & Sali, 2014).

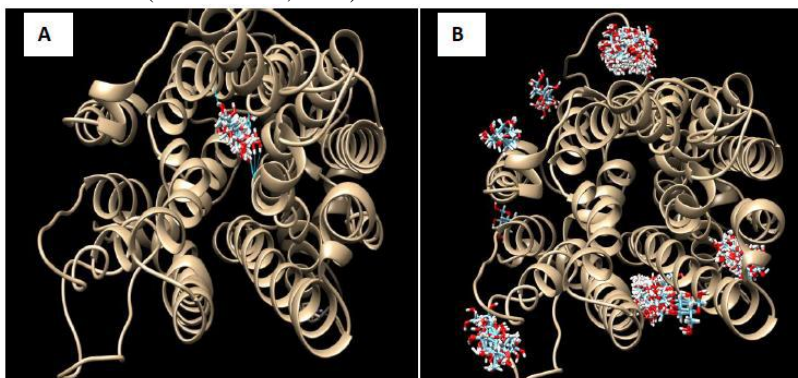
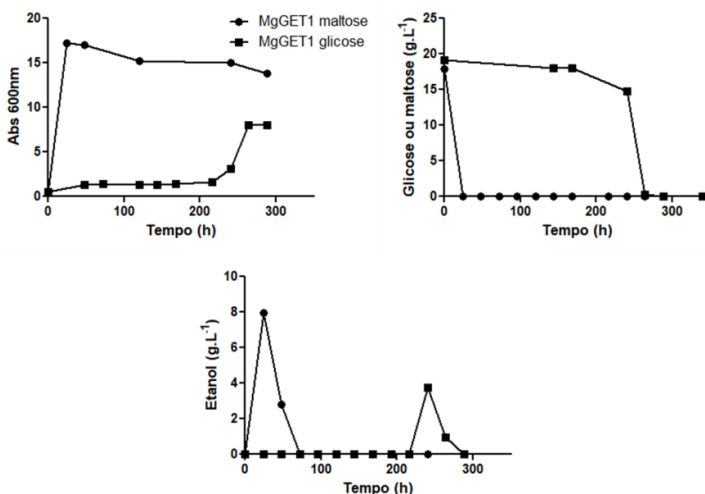


Figura 24 - Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* DLG-MgGET1, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% maltose ou 2% de glicose.



A linhagem DLG-SpFRS1 não foi capaz de crescer em nenhum monossacarídeo testado, e como o crescimento em maltose foi afetado pela expressão do gene *SpFRS1*, é provável que este transportador não seja funcional em *S. cerevisiae*, além do mais, sua expressão na membrana plasmática provavelmente interfere no desempenho dos transportadores de maltose presentes na linhagem DLG-K1. Um resultado inesperado foi a incapacidade da linhagem DLG-SpXUT1 de crescer inclusive em glicose, uma vez que este transportador *SpXUT1* de *Sp. passalidarum* apresenta elevada identidade com o transportador *XUT1* de *Sc. stipitis* (permite não só fermentação de glicose como também de xilose, como mostrado por de Sales *et al.*, 2015) e com o transportador *SaXUT1* de *Sp. arborariae* (que permite consumo e fermentação de glicose após uma extensa fase *lag*, como mostra na Figura 21e pouco crescimento e consumo de xilose como mostra na Figura 22). Além disto, quando esta linhagem DLG-SpXUT1 foi crescida em maltose apresentou claramente a capacidade de transportar ^{14}C -glicose e ^{14}C -xilose (Figura 25), com parâmetros cinéticos semelhantes aos observados para os outros transportadores clonados, incluindo uma moderada afinidade por glicose (mas baixa capacidade de transporte) e uma baixa afinidade por xilose, com alta capacidade (V_{\max}) de transporte (Tabela 14).

Figura 25 - Cinética de transporte de ^{14}C -xilose ou ^{14}C -glicose pela linhagem *S. cerevisiae* recombinante com o transportador *SpXUT1* de *Sp. passalidarum*. A captação inicial do açúcar por células pré-crescidas em 2% maltose foi determinado nas concentrações indicadas, e os valores representam a média de três ensaios independentes para cada concentração.

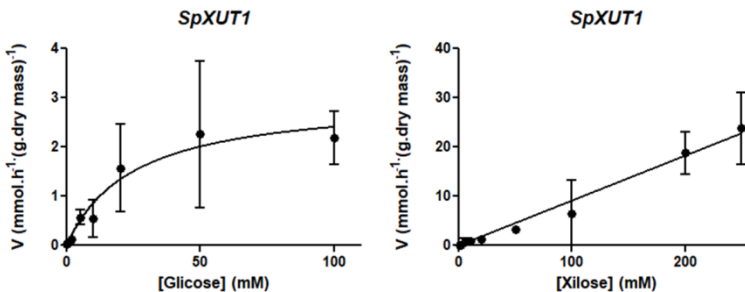


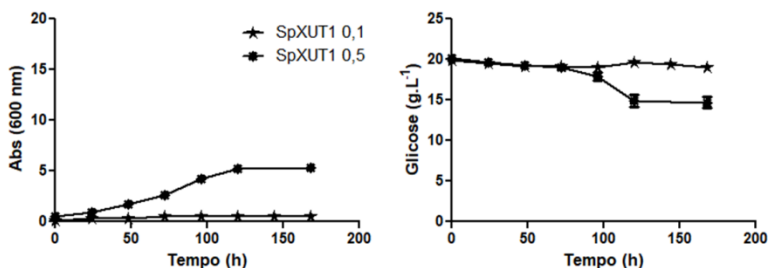
Tabela 14 – Parâmetros cinéticos do transporte de glicose e xilose pela cepa de *S. cerevisiae* DLG-SpXUT1

Gene	¹⁴ C Glicose		¹⁴ C xilose	
	K_m (mM)	V_{max} [mmol.h ⁻¹ .(g dry mass) ⁻¹]	K_m (mM)	V_{max} [mmol.h ⁻¹ .(g dry mass) ⁻¹]
<i>SpXUT1</i>	22,1 ± 7,5	2,5 ± 0,2	711 ± 550	72,3 ± 7,5

Nota: determinados após crescimento em maltose.

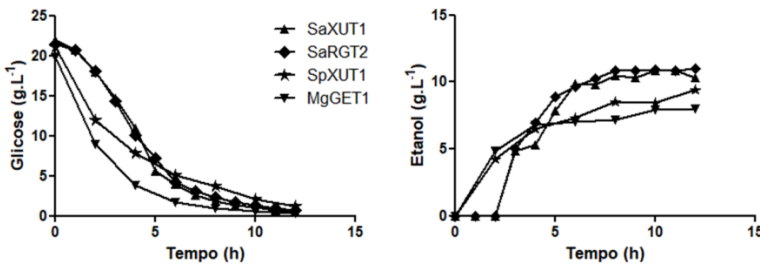
Este resultado nos levou a reavaliarmos a funcionalidade da permease *SpXUT1* expressa na linhagem de *S. cerevisiae* *hxt*-null DLG-K1. Como pode ser observado na Figura 26, quando esta linhagem foi inoculada no meio de cultivo na concentração comumente utilizada (~0,1 DO_{600nm}), as células foram incapazes de crescer ou consumir a glicose. No entanto, ao ser inoculada uma quantidade maior de células (~0,5 DO_{600nm}), a linhagem passou a crescer lentamente em glicose, chegando a consumir ~6 g/L desta fonte de carbono (Figura 26), sem produzir etanol. Este desempenho provavelmente é reflexo dos parâmetros cinéticos deste transportador *SpXUT1* (Figura 25 e Tabela 14), caracterizado por uma baixa capacidade em transportar glicose. Resultados semelhantes foram obtidos com outros transportadores provenientes de *Sc. stipitis* clonados em *S. cerevisiae*. Como mencionado anteriormente, os transportadores *SUT4* e *SUT3* apresentaram alta afinidade por glicose, porém estes transportadores apresentaram baixos V_{max} s com este açúcar (<3.7 mmol/h/g peso seco), de forma que as linhagens de *S. cerevisiae* expressando estes transportadores não conseguiram utilizar glicose de forma eficiente (Weierstall *et al.*, 1999).

Figura 26 - Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* DLG-SpXUT1, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% de glicose, inoculada com uma concentração inicial de células de 0,1 ou 0,5 DO_{600nm}.



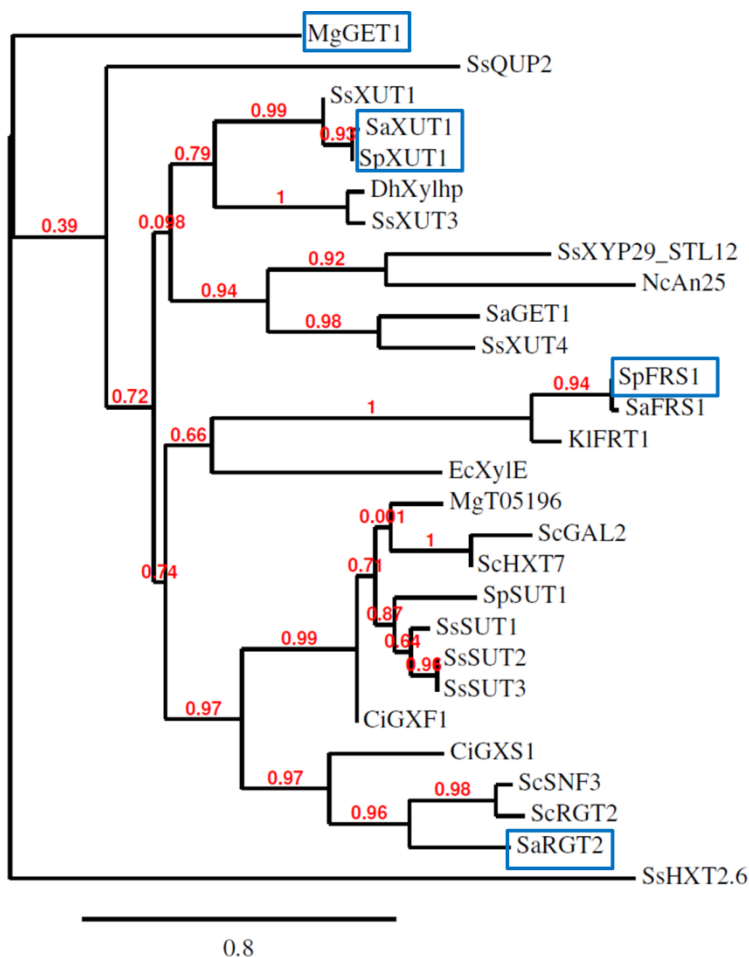
É importante salientar que, de fato, todas as linhagens recombinantes que conseguiram restauraram a capacidade em utilizar glicose (DLG-SaXUT1, DLG-SaRGT2, DLG-SpXUT1 e DLG-MgGET1) pela linhagem DLG-K1, também foram capazes produzir etanol a partir deste açúcar em fermentações em batelada com altas densidades celulares (Figura 27). Como podemos observar nessa Figura, todas as linhagens apresentaram um comportamento semelhante de consumo do açúcar, consumindo praticamente toda a glicose em até 10 h de fermentação, e produzindo ~10 g/L de etanol (atingindo praticamente o máximo teórico), com exceção da linhagem DLG-MgGET1 que apesar de consumir rapidamente o açúcar, produziu cerca de 2 g/L a menos de etanol do que as outras linhagens.

Figura 27 – Fermentação em batelada com 10 g/L das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-SaXUT1, DLG-SaRGT2, DLG-SpXUT1 e DLG-MgGET1 em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% glicose como fonte de carbono.



A Figura 28 mostra uma análise filogenética dos oito transportadores heterólogos clonados e analisados no presente trabalho, com outros transportadores de açúcares já descritos até o presente. Como podemos observar, o transportador *SpFRS1*, que não apresentou atividade de transporte com nenhum açúcar, é similar ao gene *SaFRS1* de *Sp. arborariae*, um gene (antes chamado de *HXT4*) que recentemente foi também descrito como não funcional em *S. cerevisiae* (de Sales, 2015). As sequências *SaXUT1* de *Sp. arborariae* e *SpXUT1* de *Sp. passalidarum* se agruparam muito próximas uma da outra no filograma, e também se agruparam perto do transportador *SsXUT1* proveniente de *Sc. stipitis* (de Sales *et al.*, 2015). No entanto, apesar de serem próximos, apresentaram diferenças significativas entre si no que diz respeito ao crescimento e fermentação de açúcares quando clonados na linhagem *S. cerevisiae* DLG-K1.

Figura 28 – Filograma com os possíveis transportadores de xilose clonados neste trabalho (marcados em caixa azul), juntamente com os principais transportadores de xilose e outros açúcares já caracterizados. A árvore filogenética foi construída baseada nas seqüências proteicas de cada gene e utilizando o programa Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008).



Dessa forma, parece que uma sutil diferença na seqüência de aminoácidos do transportador, já é suficiente para mudanças drásticas no desempenho da proteína. Corroborando com isto, Wang e colaboradores (2015) mostraram que a mutação de F432 na região TM-10 no transportador *Mgt05196* de *M. guilliermondii* não teve impacto no

transporte de glicose, mas aumentou a atividade de transporte de xilose, sendo que o seu resíduo correspondente F383 em *XylE* de *E. coli* foi descrito como em contato direto com a glicose (Sun et al., 2012). Além disso, mudar o resíduo N330 em *Mgt05196* para metionina não afetou o transporte de glicose, mas o transporte de xilose reduziu pela metade, e ao mudar o sítio correspondente D340 no transportador *HXT7* de *S. cerevisiae* para um resíduo de metionina diminuiu, drasticamente, sua afinidade com a glicose (Kasahara e Kasahara, 2010). Por outro lado, o resíduo T213 em *HXT7* provou ser um resíduo crucial para o transporte de glicose, ao mudar T213 por alanina, o transporte com glicose foi drasticamente reduzido (Kasahara et al., 2011), enquanto a mudança do sítio correspondente T203 em *Mgt05196* para alanina não afetou o transporte de glicose, apenas reduziu o transporte de xilose (Wang et al., 2015). Um trabalho realizado por Young e colaboradores (2012), mostra que enquanto em um mutante de *SsXUT3*, com apenas uma alteração (E538K) apresentou aumento no crescimento em todas as fontes de carbono (menos glicose); em outro transportador (*CiGxs1*) mutante com cinco alterações (F40V, L74S, H274Q, F465S e F500S), apenas o crescimento em xilose foi melhorado. Estes resultados indicam que os aminoácidos conservados em transportadores homólogos podem possuir funções diferentes. Nesse sentido, parece que ainda há muito a ser compreendido quanto às relações entre sequência, estrutura e função dos transportadores (Young et al., 2012).

Os genes dos transportadores *SsHXT2.6*, *SsQUP2* e *MgGET1* são aparentemente os mais distantes, e não agruparam com nenhum transportador conhecido. O único transportador próximo aos transportadores de hexoses presentes em *S. cerevisiae* foi o codificado pelo gene *SaRGT2*, que se agrupou com os genes *SNF3* e *RGT2*, que codificam para sensores de glicose capazes de detectar baixas e altas concentrações de glicose, respectivamente, e levam à indução de transportadores de glicose de alta (via *SNF3*) ou baixa (via *RGT2*) afinidade (Ozcan & Johnston, 1999). Estes sensores, interagem com a caseína quinase *YCK1/2*, que por sua vez fosforila os reguladores transcricionais *MTH1* e *STD1*, desencadeando uma cascata de sinalização que culmina na derepressão da expressão de gene de transportadores (Moriya & Johnston, 2004). É sabido que sensores de açúcares compartilham a mesma estrutura tridimensional proteica dos transportadores, porém, estes sensores presentes em *S. cerevisiae* são incapazes de mediar o transporte de glicose (Neugeborn et al., 1986; Ozcan et al., 1996b; Ozcan et al., 1998). Além disto, eles possuem como característica marcante a presença de um longo domínio C-terminal

citoplasmático, responsável pela transmissão do sinal dentro da célula (Dlugai *et al.*, 2001; Ozcan *et al.*, 1998).

Estes sensores de glicose foram também identificados somente nas leveduras *C. albicans* (Brown *et al.*, 2006), *Kluyveromyces lactis* (Betina *et al.*, 2001) e *Hansenula polymorpha* (Stasyk *et al.*, 2008). Assim, nosso conhecimento sobre sensores de hexose em fungos, em geral, parece bastante limitado. Por outro lado, vários trabalhos recentes têm identificado em diferentes espécies de fungos, transportadores com a dupla função de transporte e sensor, funcionando como transceptores. Em um trabalho realizado por Schuler e colaboradores (2015), eles mostraram que o transportador de alta afinidade para glicose e sacarose *HXT1* proveniente de *Ustilago maydis*, apresentou também a função de sensor. Um outro trabalho mostrou que, em *N. crassa*, dois transportadores de celodextrinas (*CDT-1* e *CDT-2*), contribuem para a detecção de celulose, sugerindo que esses transportadores atuam como transceptores, permitindo a dupla função de transporte de celodextrinas e sinalização que resultam na ativação da expressão de genes celulolíticos (Znameroski *et al.*, 2014). Em outro trabalho, dois transportadores provenientes de *Aspergillus nidulans* também mostraram atividade de transceptores (Reis *et al.*, 2016). Além disso, há evidências de que *T. reesei* usa vários transportadores que podem funcionar na transdução de sinal, para induzir a expressão do gene da celulase (Zhang *et al.*, 2013). Por outro lado, até o momento, nenhum transceptor foi identificado em leveduras do gênero *Spathaspora*. De fato, como podemos verificar no alinhamento das sequências selecionadas e clonadas por PCR (Figura 29), o *SaRGT2* possui uma extensa porção C-terminal, bem diferente das outras proteínas, indicando que, possivelmente, possa se tratar do primeiro transceptor descrito na levedura *Sp. arborariae*.

Neste alinhamento também foram identificados motivos de resíduos de aminoácidos que são característicos de transportadores, como, por exemplo, o PESPR conservado em todas as sequências clonadas (caixa marcada em preto) (Figura 29). Este motivo localiza-se logo após o TM-6 e está presente em transportadores de glicose de humanos (*GLUT1-GLUT4*) e no transportador de xilose *XylE* de *E. coli* (Sun *et al.*, 2012). Somando-se a esse motivo, outro importante motivo foi identificado por Young e colaboradores (2012), onde uma mutação no aminoácido F40 do transportador *CiGXS1*, permitiu que os autores verificassem que esse aminoácido era parte de uma sequência presente em todos os transportadores de xilose (com maior transporte de xilose que de glicose).

Figura 29 – Alinhamento múltiplo entre as sequências dos transportadores *SpFRS1*, *SaXUT1*, *SpXUT1*, *SaRGT2*, *MgGET1*, *XylE* de *E. coli* e *GLUT1*. O alinhamento foi realizado utilizando o programa de bioinformática PRALINE com PSIPRED para estrutura secundária e HMMTOP v2.1 para predição de estrutura transmembrana, encontrados no servidor IBIVU (Pirovano *et al.*, 2008; Pirovano & Heringa, 2010; Simossis *et al.*, 2005). As posições dos 12 segmentos transmembranas estão destacadas em verde, a caixa em vermelho marca o motivo GG/FXXXG (TM-1); a caixa em preto marca o motivo PESPR; a caixa em amarelo marca o motivo YFFYY, e caixa em azul marca um resíduo importante de asparagina (N) presente no TM-8.

```

..... 10 ..... 20 ..... 30 ..... 40 ..... 50
(PRED) SpFRS1 M S G T I S P T S E F D K P T V E K T E N Y S A S V E S V E L G E D I D V D K E F G D Y V Q L G H E
(PRED) SaXUT1 ----- FDKPTVEKTE ----- ----- ----- -MHGGSDSND
(PRED) SpXUT1 ----- ----- ----- ----- ----- -MHGGSDCND
(PRED) SaRGT2 ----- ----- ----- ----- ----- -MFKF
(PRED) MgGET1 ----- ----- ----- -MVASIK SACKLSESSI RSQDDLEKVV
(PRED) EcXylE ----- ----- ----- ----- -----
(PRED) HsGLUT1 ----- ----- ----- ----- -----

..... 60 ..... 70 ..... 80 ..... 90 ..... 100
(PRED) SpFRS1 L K S G G T F W T N L K N V E F P V T F K N R N N M V R F L G I F T S A G I L S Q V D Q S I I S G
(PRED) SaXUT1 I Q Q I I A E K R L E I A G K P G I A G L V A N K K S F L I A V P A S I G G L V Y G N Q G M F G Q
(PRED) SpXUT1 V Q A I I A Q K R L E I A G K P G I A G L I A N R K S F L I A V P A S I G G L V Y G N Q G M F G Q
(PRED) SaRGT2 L E Q I L Y D N T I E E E Y H R K L R Q K S S N S A I V G L V A A G G F L Y G Y D T G L I N G
(PRED) MgGET1 E Q E Q P K K K W R W R V D T S D A P K E L F N R T L Y L S I L V F G L G S A R G Y D E G N I S C
(PRED) EcXylE ----- -MNT Q Y N S S Y I F S I T L V A T I G G L L F G Y D T A V I S G
(PRED) HsGLUT1 ----- -MEPSS K K L T G R L M L A V G G A V I G S L O F G Y N T G V I N A

..... 110 ..... 120 ..... 130 ..... 140 ..... 150
(PRED) SpFRS1 A S I G M N K A L Q - - L - - - - - - - - - - S D H E N S L I S S L M P L C A V A G S I L M T P
(PRED) SaXUT1 I S G M - T S F S E A - - A G - - - - V G K I Q D N P T L Q G L L T S I L E L C A W V G V L M N G Y
(PRED) SpXUT1 I S G M - T S F S A A - - A G - - - - V G K I Q D N P T L Q G L L T S I L E L C A W V G V L M N G Y
(PRED) SaRGT2 L L E M - K Y V Y T N - - F A - - - - S N G E T F T S H E R A L T V A M L S L C T F V G A L I A P L
(PRED) MgGET1 T L A Q - V S F K K T - - F G L S D P H K S K D E V A N L K S N I A A M V Q L C S I G G S I L L A N Y
(PRED) EcXylE T V E S - L N T V F V - - A P - - - - Q N L S E S A A N S L L G F C V A S A L I C C I I G G A L G G Y
(PRED) HsGLUT1 P Q K V I E E F Y N Q T W V H R Y G E S I L P T T L T T L W S L S V A I F S V G G M I G S F S V S L

..... 160 ..... 170 ..... 180 ..... 190 ..... 200
(PRED) SpFRS1 L S E H F G R K R A I L Y S C I L Y T I G A I I C A A P ----- -D H
(PRED) SaXUT1 V A D R V G R R W S V V P G - V A W F I L G V I I Q A C T H G S ----- -N Y
(PRED) SpXUT1 V A D R V G R R W S V M P G - V A W F I L G V I I Q A C T H G A ----- -N Y
(PRED) SaRGT2 I S D N Y G R K E S I I L S S T I V F N V G N I L Q I A L T ----- -E L
(PRED) MgGET1 T V D R L G R I R A L Q Q V - C I I W I T A A I I Q I T K ----- -N V
(PRED) EcXylE C S N R F G R R D S L K I A - A V L F P I S C V G S A W P E L G I T S I N P D N T V P V Y I A G Y V
(PRED) HsGLUT1 F V N R F G R R N S M L M M - N L L A F V S A V L M G F S K L G K ----- -S F

..... 210 ..... 220 ..... 230 ..... 240 ..... 250
(PRED) SpFRS1 E T M Y A G R F Y L C L G V C I E R G S V G V Y I A E C V P P T O R G N L V S L Y Q F F I A F C E V
(PRED) SaXUT1 D F I L G G R F I V G V G V G I L S M I V P L Y N A E V A P P E I R G S L V A L Q Q L A I T F C I M
(PRED) SpXUT1 S F I L G G R F I V C V G V G I L S M I V P L Y N A E V A P P E I R G S L V A L Q Q L A I T F C I M
(PRED) SaRGT2 A L L A A G R F V A C V S V G I L S A I V P L Y Q A E A S P K W Y R G S I V F T Y Q W A I T W C L L
(PRED) MgGET1 G Q L Y A G R L I E C F A I C Q T T I G P L Y T A E V A P P Q I R G M C G C I F A G A V I F C I M
(PRED) EcXylE P E F V I Y R I I G G I V G C L A S M L S P M Y I A E L A P A H I R K K L V S F N Q F A I Y F G Q L
(PRED) HsGLUT1 E M L I L G R F I I G V Y C G L T T G F V P M Y I G E V S P T A I R C A L G T L H Q L G I V V G I L

```

```

..... 260..... 270..... 280..... 290..... 300
(PRED) SpFRS1 LCPATAAIAIFF TV----- HGGWRFMVGS SLLPSTLLI GLLFL -PESP
(PRED) SaXUT1 ISWITTYGTN FIGGTGEGQS KAAWLVPICI QMVPAILIGS CIFLM -PESP
(PRED) SpXUT1 ISWITTYGTN FIGGTGEGQS KAAWLVPICI QMVPAILIGS CIFLM -PESP
(PRED) SaRG2T IASAVTQATR KM-----NN SGSYRIP IGL QFLPALLICT GMLEL -PESP
(PRED) MgGET1 MCVFANVYGA LHMLN---TS QVQW IAPT SI KIVLAGLIFI GSFLI -PESP
(PRED) EcXy1E LVYCVNFFIA RSGDA-SWLN TDGWRYPFAS ECIPALLFLM LLYTW -PESP
(PRED) HsGLUT1 LAQVEGLDSI M-----GN KDLWPLLIS IIFIPALLOCI VLPFC -PESP

..... 310..... 320..... 330..... 340..... 350
(PRED) SpFRS1 RVL-VYNNKY AEAINVYDRL RDISE--RTS KVEFLEMIGN AQAERKLRAS
(PRED) SaXUT1 RVL-MNEGNE EKCLDVLSRL RGLDRNNELI QMEFLEMKAQ KIFEHELEAT
(PRED) SpXUT1 RVL-MNEGNE EKCLDVLSRL RGLDRNNELI QMEFLEMKAQ KIFEHELEAT
(PRED) SaRG2T RYV-VQKNNI QKALES LAKL RRLNQDDADL IEELVEIKAN YDYELSFGKT
(PRED) MgGET1 RVL-VKVGVV ELAAQNLSKT RHLPPDHPYI VGEVADINLE IAIEQEAISG
(PRED) EcXy1E RVL-MSRGKQ EQAEGILRKI MG---NTLA TQAVQEIKHS LDHGRKTC--
(PRED) HsGLUT1 RLLINRNEE NRAKSVLKKL RG---TADV THDLQEMKEE SRQMREKKV

..... 360..... 370..... 380..... 390..... 400
(PRED) SpFRS1 QSRVQVW--- -----LDL FTI---PRN RRRLFTAVIM VSLGQLTGIN
(PRED) SaXUT1 AYPDLQDGSA SSRFKIGFLQ YKSMITHYPT FKRFAVACLI MTFQQWTCVN
(PRED) SpXUT1 AYPDLQDGSA SSRFKIGFLQ YKSMITHYPT FKRFAVACLI MTFQQWTCVN
(PRED) SaRG2T T-----I--- -----LDC FRSGGGRHKQ RLRMFTGIV QFFQQTGCIN
(PRED) MgGET1 SGVFDKI--- -----REI LTV---KSVR YRFFAVATMS QLLGQWSCAN
(PRED) EcXy1E -----GR- LK-----EG VGVIVIGVML SIFQQFVGIN
(PRED) HsGLUT1 TI-----L-LEL FRS---PAY RQFELIAVVL QLSQQLSGIN

..... 410..... 420..... 430..... 440..... 450
(PRED) SpFRS1 AVMYLSTMM ANIGFSE-EN AVFMSLVGGI LNLGTT--FA TLYMDRFGRR
(PRED) SaXUT1 FLIYYAFFIF ASLGLSGKTT SLASGVVGI YMPIATT-PA VLVVDQLGRK
(PRED) SpXUT1 FLIYYAFFIF ASLGLSGKTT SLASGVVGI YMPIATT-PA VLVVDQLGRK
(PRED) SaRG2T FIIYYGVNFF LNTGVQ---N YYMSEIYTL YNVVFTE--FG ILLIDITGRR
(PRED) MgGET1 NVTIYSPELM GFAGYKGVVE RLKMTAVLGV VKFISAYASA PFIIDFLGRR
(PRED) EcXy1E VVLYYAPEVF KTLGAST-DI ALLQTTIVGV LNLFTPT--LA TMTVDKFGKR
(PRED) HsGLUT1 AVFYYSTSIF EKAGVQ---Q PVYATIGSGI YNTAFTV--YS LFVVERAGR

..... 460..... 470..... 480..... 490..... 500
(PRED) SpFRS1 VVGM-NLVGF TICLVLVGVG YLIPL-----ETQR AAALGVVYLF
(PRED) SaXUT1 PVLVSGALLM GMCHFVAVGI LGGLGGD--- -----FTNHM GAGWAAVVFI
(PRED) SpXUT1 PVLVSGALLM GMCHFVAVGI LGGLHGD--- -----FTNHM GAGWAAVVFI
(PRED) SaRG2T KLLLVGGVGM SVSNFIIATC VVSI-----KQPE INSILSVSFS
(PRED) MgGET1 KALYFGITLQ MISILFFAIF VTVVFNATED VPLPLTASED RAAKAALASL
(PRED) EcXy1E PLOIIGALCM AIGMFSLGTA FYT-----PQ AVIALLSM
(PRED) HsGLUT1 TLHLGLAGM AGCAILMTIA LALL-----EQLP WMSYLSLVAI

..... 510..... 520..... 530..... 540..... 550
(PRED) SpFRS1 LIIYMGFFCA YACLTWVIPA ESFSIGTRSI GMTICSSFLY LNAFTVTYFN
(PRED) SaXUT1 NLFAIFFGYS WGPCAWVIVA EVFPLGLRAK GVSIGASSNW LNNFAVAMT
(PRED) SpXUT1 NLFAIFFGYS WGPCAWVIVA EVFPLGLRAK GVSIGASSNW LNNFAVAMT
(PRED) SaRG2T CVPILFPASS WGCCTWALCS DIYSISIRQK AVAITAATNW LVNFIYPAYT
(PRED) MgGET1 YLSGVGWTMG FNSIQYLYG EIFPLRIRSF AQSAIMVLHF ANQYGN SKAL
(PRED) EcXy1E LFVVAAPFAMS WGPVCHVLLS EIFPNAIRGK ALATAVAAGW LANYFVSWVF
(PRED) HsGLUT1 FGFVAFFEVG PGPIPWPIVA ELFSQGPRPA AIATAVAGEFNW TSNFIYGMCF

..... 560..... 570..... 580..... 590..... 600
(PRED) SpFRS1 NRMKS-----A MTYV-ALITIG FYGGIAFLGF FYQIFFMRET KGKTLLEEID
(PRED) SaXUT1 PDFV-----AKAK-YGAY I FLGLMCFVCA AYVLFVPET KGRTLDEIDE
(PRED) SpXUT1 PDFV-----AKAT-YGAY I FLGLMCFVCA AYVLFVPET KGRTLDEIDE
(PRED) SaRG2T PYLIDTGLHT AAIG-NKIFF MWGGFNALAV VFVYFAYET KGLKLEEVDI
(PRED) MgGET1 PKML-----L SMHK-FGAFY FVVGIMAI SL FWANEEFPEV AGRSLMESMD
(PRED) EcXy1E PMMDKNSWLV AHPHN-SPSYW IYCGMGLVAA LFMNKFVPET KGKTLDELEA
(PRED) HsGLUT1 QYVE-----QHLCGPYVFI IFTVLLVLF IFTYFKVPET KGRTLDEIAS

```

```

..... 610..... 620..... 630..... 640..... 650
(PRED) SpFRS1  IFE-----KPSM  EIAKENLRNM  KRFLTK----
(PRED) SaXUT1  LFGDT--SGV  SKREAEIHNR  I IKEVGLEL  VGLEDLSDK  SKGGDVQYQE
(PRED) SpXUT1  LFGDT--SGV  SKRECEIRNR  ILKEVGLEL  IGLEELSDK  SKGGDVHYQE
(PRED) SaRGT2  MYAHC--DSA  IISPEFRSTK  IDYAKLDENY  NP ILEESTST  PSDVSHHIIV
(PRED) MgGET1  IFSLPWYMG  RKGAEPCPDH  SEVSKIHVNS  SGHGNAIDGK  LDYDEKTSVH
(PRED) EcXy1E  LWEPE--TKK  TQQTATL---
(PRED) HsGLUT1 GFR-----TKK  ---QGCASQS  DKTPEELFHP  LGADSQV---

..... 660..... 670..... 680..... 690..... 700
(PRED) SpFRS1  -----
(PRED) SaXUT1  EKVAADAD---
(PRED) SpXUT1  EKAADADADS  A-----
(PRED) SaRGT2  EKDTVPEPLY  NSNQGNLTI  IPYNNILSPT  STEQDTEEF  RRESVTS HQF
(PRED) MgGET1  HDEGNSLMVK  DSNEKDLEKE  VKK-----
(PRED) EcXy1E  -----
(PRED) HsGLUT1  -----

..... 710..... 720..... 730..... 740..... 750
(PRED) SpFRS1  -----
(PRED) SaXUT1  -----
(PRED) SpXUT1  -----
(PRED) SaRGT2  SNTNMSTISP  LTQGD SHVSN  DYQSYLES LK  REYS CIQQLI  PQEFSDEESI
(PRED) MgGET1  -----
(PRED) EcXy1E  -----
(PRED) HsGLUT1  -----

..... 760..... 770..... 780..... 790..... 800
(PRED) SpFRS1  -----
(PRED) SaXUT1  -----
(PRED) SpXUT1  -----
(PRED) SaRGT2  EISNIETSQN  LPTTVIATPY  FTQPPSDSDS  SDEEEEEEEQ  KEEQEQE QEK
(PRED) MgGET1  -----
(PRED) EcXy1E  -----
(PRED) HsGLUT1  -----

...
(PRED) SpFRS1  ---
(PRED) SaXUT1  ---
(PRED) SpXUT1  ---
(PRED) SaRGT2  KQK
(PRED) MgGET1  ---
(PRED) EcXy1E  ---
(PRED) HsGLUT1  ---

```

Mais tarde, esse motivo foi melhor caracterizado e está presente em 29 sequências dos 46 transportadores estudados, e está localizado no segmento TM-1 dessas proteínas. Sua sequência degenerada G-G/F-XXX-G estaria envolvida na eficiência e seletividade para o transporte de xilose (Young *et al.*, 2014). Este motivo (marcado em caixa vermelha na Figura 29) foi encontrado em três dos cinco transportadores clonados (*SaXUT1*, *SaRGT2* e *SpXUT1*). Talvez isso explique o motivo do transportador *MgGET1* de *M. guilliermondii* não ter conseguido transportar xilose. Embora este motivo esteja presente na maioria dos transportadores de xilose encontrados, ele não está presente apenas nos transportadores de xilose, uma vez que também ocorre, menos frequentemente, em transportadores que captam mais glicose que xilose,

captam apenas glicose, ou mesmo não são funcionais quando expressos em *S. cerevisiae* (Young *et al.*, 2014). Por outro lado, Wang e colaboradores (2015) mostram também a existência de um outro motivo conservado (caixa amarela na Figura 29), rico em resíduos aromáticos (YFFYY), presente no sétimo segmento transmembrana (TM-7), que desempenha um papel importante na atividade de transporte de xilose. O anel fenil do último resíduo de tirosina (Y) pode assumir a função de evitar que a xilose escape durante o transporte. O penúltimo resíduo (Y) também apresentou papel importante no transporte de xilose, porém, mutações nesse resíduo não alteraram o transporte de glicose. Ao analisarmos este motivo nos transportadores clonados, observamos que o motivo não se mostrou conservado em nenhuma das permeases. No entanto, o último resíduo de tirosina (Y), está presente em todos os transportadores, já o penúltimo resíduo (Y), só não está presente no *MgGET* que, de fato, não apresenta transporte de xilose e de nenhum outro açúcar que não glicose.

Muitos trabalhos estão focados na obtenção de um transportador de xilose específico, que não é mais inibido pela glicose. Assim, existem muitos estudos empenhados em reprogramar os transportadores endógenos de açúcares em *S. cerevisiae* para o transporte efetivo de xilose (Farwick *et al.*, 2014; Nijland *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2015; Young *et al.*, 2012, 2014). Farwick e colaboradores (2014) e Shin e colaboradores (2017) mostram que mutações nos resíduos de asparagina (N) presentes no TM-8 dos transportadores *GAL2*, *HXT7* e *HXT11* de *S. cerevisiae* melhoram o transporte de xilose. Dessa forma, parece que esse aminoácido é importante para a afinidade por glicose. Esse resíduo está presente apenas na sequência *SaRGT2* dos transportadores clonados neste trabalho, já para o transportador *MgGET1*, o aminoácido correspondente é uma lisina (K), para o *SpFRS1* é uma leucina (L) e para o *SaXUT1* e o *SpXUT1* é uma metionina (M) (resíduos marcados em caixa azul na Figura 29). Shin e colaboradores (2017) mostram que a mutação dessa asparagina (N) por uma metionina (M) ou uma treonina (T) no transportador *HXT11*, confere à levedura uma co-metabolização de glicose e xilose. Entretanto, essa característica não foi observada nas linhagens com o *SaXUT1* e o *SpXUT1*. Por outro lado, a mutação dessa mesma asparagina por uma treonina, em um transportador quimérico *HXT11/2*, melhorou a afinidade e capacidade de transporte de xilose, enquanto manteve uma reduzida afinidade por glicose (Shin *et al.*, 2017). Esses resultados, só reforçam a ideia de que é imprevisível saber os efeitos de uma mutação pontual de aminoácidos (de forma dirigida ou encontrada naturalmente entre as sequências) no contexto geral de cada

transportador, e prever como isso vai afetar o comportamento de transporte deles.

De fato, a seleção e posterior clonagem de transportadores heterólogos em linhagens de *S. cerevisiae* nem sempre resulta em proteínas funcionais, capazes de transportar açúcares para dentro das células (Hamacher *et al.*, 2002). Além disto, mais de 80% dos genes pesquisados anotados como supostos ou conhecidos transportadores de açúcar não foram funcionais em *S. cerevisiae*, provavelmente devido à problemas estruturais ou localização imprópria na célula (Young *et al.*, 2011), ou ainda alguma falha na transcrição e tradução do mRNA, resultando em uma proteína não funcional em *S. cerevisiae*. Além disso, é sabido que os transportadores endógenos de *S. cerevisiae* pertencentes a família *HXT* sofrem, além de regulação transcricional, regulações pós-traducionais mediada pela presença (ou não) de glicose no meio extracelular. Membros desta família de transportadores são, por exemplo, removidos da membrana por endocitose (O'Donnell *et al.*, 2015; Nikko *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 2014). Para que os transportadores sejam removidos da membrana é necessário que aconteça uma complexa cascata de sinalização, onde a ubiquitinação serve como um sinal importante para a endocitose da proteína e, em alguns casos, ela parece atuar de forma redundante com outros sinais, como fosforilação das permeases (Finley *et al.*, 2012; Gadura *et al.*, 2006). Esta ubiquitinação normalmente acontece em resíduos de lisina (K), sendo que para alguns transportadores os resíduos de lisina importantes são os localizados na porção N-terminal, enquanto que para outros estão na porção C-terminal (Finley *et al.*, 2012; Nijland *et al.*, 2016; Sen *et al.*, 2016; Shin *et al.*, 2017).

Trabalhos recentes realizados por Nijland e colaboradores (2016) e Roy e colaboradores (2014), mostraram que a substituição de resíduos de lisinas na porção N-terminal de transportadores de baixa afinidade como *HXT1*, *HXT36* (transportador quimérico entre o *HXT3* e *HXT6*) e *HXT5*, melhoraram suas permanências na membrana citoplasmática na ausência de glicose, havendo, como consequência, uma melhora na fermentação de xilose após o esgotamento da glicose, ou quando as células foram cultivadas em xilose como única fonte de carbono. Em outro trabalho mais recente, foi mostrado que a substituição da região N-terminal do transportador *HXT2* pela região N-terminal do *HXT11* – reconhecido por sua estabilidade na membrana, independente dos efeitos das concentrações de glicose – criando assim, o transportador quimérico *HXT11/2*, que apresentou um aumento na permanência na membrana citoplasmática, quando comparado com o transportador normal *HXT2*

(Shin *et al.*, 2017). Já foi comprovado recentemente que abordagem semelhante também melhorou a permanência na membrana e, conseqüentemente, o desempenho fermentativo de transportadores heterólogos clonados em *S. cerevisiae* (Sen *et al.*, 2016). Neste trabalho, eles verificaram que uma versão truncada na porção C-terminal do transportador *CDT-2* de *N. crassa*, melhorou a produção de etanol a partir de celobiose durante a fermentação, quando comparado com a linhagem parental.

Entretanto, os mecanismos de ubiquitinação das proteínas de membrana ainda não são muito bem compreendidas e, assim, parece difícil prever em qual parte do transportador vai acontecer a ubiquitinação. Alguns programas de bioinformática como, por exemplo, o UbPred (Radivojac *et al.*, 2010), conseguem fazer previsões de quais possíveis resíduos de lisina possam ser passivos de ubiquitinação, com graus de alta, média e baixa confiança. Ao analisarmos as sequências dos transportadores clonados neste trabalho, utilizando este programa, verificamos por exemplo que o transportador *SsXUTI* (o que permitiu a melhor fermentação de xilose), apesar de possuir 7 resíduos de lisina nas extremidades N- e C-terminais, não possui nenhum resíduo de lisina passível de ubiquitinação na porção N-terminal, e apenas um seria ubiquitinado na porção C-terminal (Figura 30).

Considerando que, talvez, a possível ausência de ubiquitinação deste transportador tenha contribuído para a estabilidade e desempenho da permease *SsXUTI* expressa em *S. cerevisiae*, hipotetizamos que os transportadores clonados neste trabalho poderiam estar sofrendo algum tipo de regulação pós-traducional e, assim, estarem sendo endocitados da membrana citoplasmática, levando a subestimar o desempenho destes transportadores seja com glicose ou xilose como fontes de carbono. Sendo assim, decidimos retirar esses resíduos (passíveis de ubiquitinação), na extremidade C-terminal do transportador *SpXUTI* de *Sp. passalidarum*, e em ambas as extremidades dos transportadores *SaXUTI* de *Sp. arborariae* e *MgGET1* de *M. guilliermondii* (Figura 30). O *SaXUTI* foi escolhido, por ter sido o único transportador que até então havia permitido um baixo consumo de xilose; o transportador *SpXUTI* porque, apesar de não ter conseguido utilizar xilose, apresentou transporte deste açúcar nas análises de cinética com ¹⁴C-xilose (Figura 25 e Tabela 14); e a permease *MgGET1* foi escolhida baseado nos resultados da técnica de *docking* com xilose, utilizada para selecioná-la.

Figura 30 - Alinhamento das porções N- e C-terminais dos transportadores selecionados para truncagem. Em “A” está destacado o domínio N-terminal, em “B” está o domínio C-terminal, sendo que em verde estão destacados o TM-1 e TM-12, respectivamente. Os resíduos de lisina possivelmente envolvidos na ubiquitinação, estão marcados em caixas vermelhas (preditos com alta confiança) e em caixas azuis (preditos com média confiança). As predições dos sítios de ubiquitinação foram realizadas com o auxílio do programa UbPred (Radivojac *et al.*,2010).

A	
 10 20 30 40 50
(PRED)	SaXUT1-----MHG GSDSNDIQQI IAEKRLLEIAG KPGIAGLVAN
(PRED)	SpXUT1-----MHG GSDGNDVQAI IAQKRLLEIAG KPGIAGLIAN
(PRED)	SsXUT1-----MHG GGDGNDITEI IAARRLQIAG KSGVAGLVAN
(PRED)	MgGET1 MVAS K SAG K LSESSIRSQD DLE K VVEQE Q P K KKWRWRVD TSDAPKE L F N
 60 70 80 90 100
(PRED)	SaXUT1 KKSFLIAVFA SLGGLVYGYN QGMFGQISGM TSFSEAAG-- --VGKIQDNP
(PRED)	SpXUT1 RKSFLIAVFA SLGGLVYGYN QGMFGQISGM TSFSAAG-- --VGKIQDNP
(PRED)	SsXUT1 SRSFLIAVFA SLGGLVYGYN QGMFGQISGM YSFSKAIG-- --VEKIQDNP
(PRED)	MgGET1 R TLYLSILV F G VLGS A RGYD EGNISGTLAQ VSFKKT F GLS DPHKSKDEVA
B	
 510 520 530 540 550
(PRED)	SaXUT1 A VAM S TPDFV AKA-KYGAYI FLGLMCFVGA AYVLFV P ET KGRTLDEIDE
(PRED)	SpXUT1 A VAM S TPDFV AKA-TYGAYI FLGLMCFVGA AYVFF C PET KGRTLDEIDE
(PRED)	SsXUT1 A VAM S TPDFV AKA-KFGAYI FLGLMCFVGA AYVQFF C PET KGRTLEEIDE
(PRED)	MgGET1 E NSKALPKML LSMHKFGA Y F EVGIM A ISL F WAW F V P EV AGRSLESMED
 560 570 580 590 600
(PRED)	SaXUT1 LFGDT--SGV SKREAEIHR I IKEVGLLEL VGLLEDLSD E K S KGGDV Y QE
(PRED)	SpXUT1 LFGDT--SGV SKREGEIHR I IKEVGLLEL IGLEELSD E K S KGGDV Y QE
(PRED)	SsXUT1 LFGDT--SGT SKMEKEIHEQ KLKEVGLLQL LGEENASESE NS K ADV Y HVE
(PRED)	MgGET1 IFSLPWY M IG RGAELCPDH SEV S K I H VNS SGHGNA Y DD R LDYDEKTSVH
 610 620
(PRED)	SaXUT1 E KRVADAD-----
(PRED)	SpXUT1 E KAAADAD S A-----
(PRED)	SsXUT1 K-----
(PRED)	MgGET1 HDEGNSLMVK DSNEKDLEKE V K K

Para isto, foram desenhados *primers* mudando a posição da metionina inicial para imediatamente depois do último resíduo de lisina, passível de ubiquitinação, na porção N-terminal da proteína (*primer forward*), para os transportadores *SaXUT1* e *MgGET1*, e também mudando o códon de parada, na porção C-terminal, para imediatamente antes do primeiro resíduo de lisina, passível de ubiquitinação (*primer reverse*), para os transportadores *SpXUT1*, *SaXUT1* e *MgGET1*, como mostrado na Figura 17 acima. Os *primers* utilizados para esta abordagem experimental estão listados na Tabela 9. Desta forma, foram criadas versões truncadas dos genes *SaXUT1*, *SpXUT1* e *MgGET1* que foram nomeados *tSaXUT1*, *tSpXUT1* e *tMgGET1*, respectivamente. Em seguida, estes genes foram clonados em plasmídeos multicópia e

subsequentemente, transformados na linhagem *S. cerevisiae* *hxt*-nulo DLG-K1, da mesma forma como descrito anteriormente para todos os outros transportadores. Assim, foram geradas as linhagens DLG-tSaXUT1, DLG-tSpXUT1 e DLG-tMgGET1 (Tabela 8).

Como podemos notar na Figura 31, a linhagem DLG-tSpXUT1 contendo o transportador *SpXUT1* truncado na porção C-terminal, removendo o único resíduo de lisina passível de ubiquitinação (Figura 30), passou a crescer em glicose eficientemente, inclusive com produção de etanol, o que não era notado na linhagem DLG-SpXUT1 contendo a permeasse *SpXUT1* não truncada. Além disto, a linhagem DLG-tSpXUT1 também passou a utilizar xilose (Figura 32), porém somente após uma extensiva fase *lag* sem ocorrer produção de etanol. Nas fermentações em batelada com elevadas concentrações celulares também foram observadas significativas melhoras. Na fermentação em batelada da glicose, a linhagem DLG-tSpXUT1 consumiu todo o açúcar em aproximadamente 2 h, mais de 20 horas mais rápido que pela linhagem contendo o transportador na sua versão não truncada (Figura 33). Em relação aos resultados da fermentação em batelada de xilose, os resultados foram ainda mais promissores, pois além de conseguir fermentar este açúcar, o que não era observado pela linhagem DLG-SpXUT1, a linhagem DLG-tSpXUT1 consumiu toda a xilose em cerca de 24 h, produzindo em torno de 6 g/L de etanol (Figura 34). Este resultado foi superior ao obtido com outros transportadores heterólogos clonados em *S. cerevisiae*, como por exemplo, o *SsXUT1* proveniente de *Sc. stipitis* que permitiu um consumo de apenas 90% de xilose em 30 horas de fermentação, produzindo menos de 5 g/L de etanol (vide Tabela 11 acima; de Sales *et al.*, 2015).

A comparação com o transportador de *Sc. stipitis* *SsXUT1* é especialmente interessante porque, além de compartilhar 80% de identidade com o *SpXUT1*, os dados das cinéticas de transporte com glicose e xilose indicavam diferenças significativas entre os transportadores, principalmente em relação à glicose (vide Figuras 19 e 25, e Tabelas 12 e 13). Apesar das diferenças observadas, a versão truncada do transportador *SpXUT1* permitiu uma melhor fermentação destes dois açúcares pela linhagem DLG-K1 recombinante.

Provavelmente, o transportador *SpXUT1* estava sendo ubiquitinado e retirado da membrana, ao mesmo tempo em que estava sendo inserido (uma vez que foram clonados sob a expressão de promotores constitutivos), dessa forma, seus desempenhos em utilizar os açúcares estavam sendo subestimado. Assim, uma vez removido os possíveis sítios de ubiquitinação na linhagem contendo o transportador

truncado (DLG-tSpXUT1), os transportadores expressos permanenciam na membrana, o que resultou na semelhança nos padrões de utilização de açúcares apresentado entre tSpXUT1 e SsXUT.

Figura 31 - Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-SpXUT1 e DLG-tSpXUT1, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% de glicose.

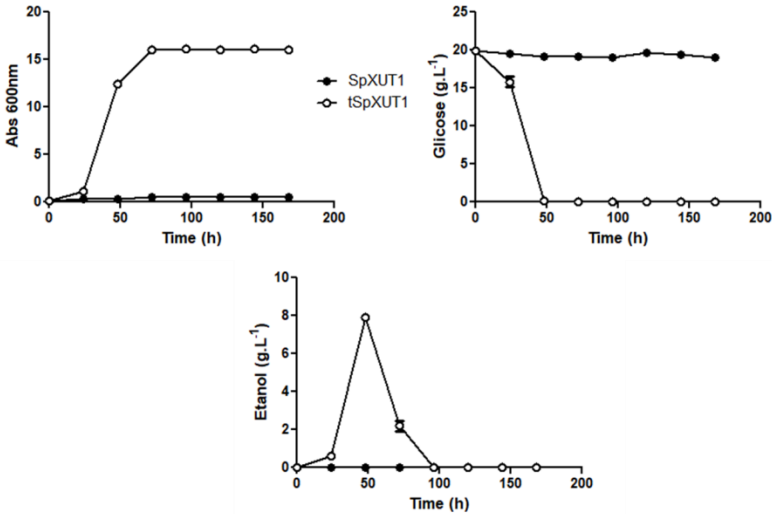
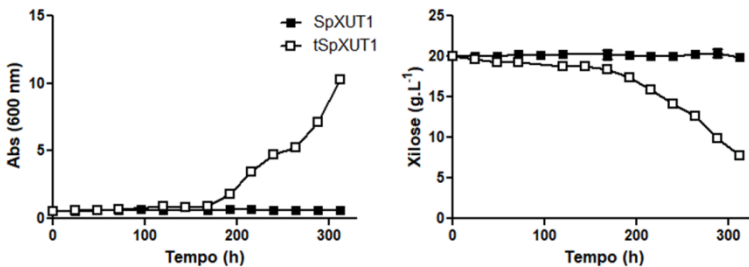


Figura 32 - Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-SpXUT1 e DLG-tSpXUT1, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% de xilose.



Isso fica mais evidente, ao analisarmos a Figura 30, onde podemos ver claramente que o *SpXUT1* possui três sítios para ubiquitinação (K), na porção C-terminal da proteína (todas elas com alta

confiança), ao passo que o *SsXUT1*, possui apenas um possível sítio. É sabido que, embora uma única molécula de ubiquitina seja suficiente para promover a endocitose, múltiplas ubiquitinações podem acelerar a velocidade de endocitose (Galan e Haguener-Tsapis, 1997; Springael *et al.*, 1999). Dessa forma, mesmo que o transportador *SsXUT1* possa estar sendo ubiquitinado e retirado da membrada, a velocidade com que está acontecendo com o *SpXUT1* seria muito maior, em função dos múltiplos pontos de ubiquitinação presentes nele.

Figura 33 – Fermentação em batelada com 10 g/L das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-*SpXUT1* e DLG-*tSpXUT1*, em meio sintético *dropout* (sem uracila), com 2% glicose como fonte de carbono.

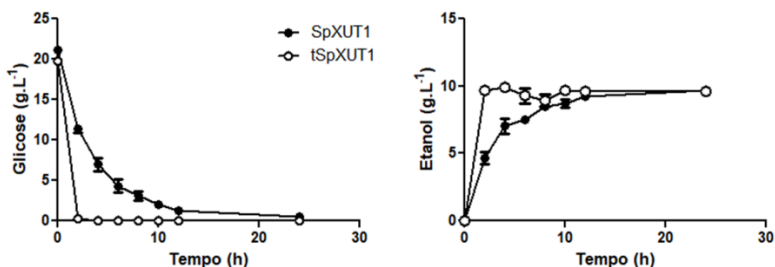
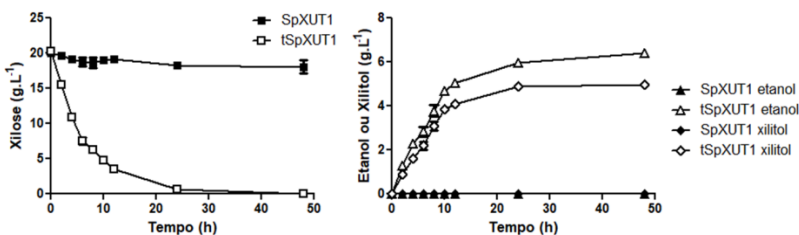


Figura 34 – Fermentação em batelada com 10 g/L das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-*SpXUT1* e DLG-*tSpXUT1*, em meio sintético *dropout* (sem uracila), com 2% xilose como fonte de carbono.



Adicionalmente, os resultados de cinética de transporte com xilose e glicose do *SpXUT1* (Tabela 14) provavelmente também estão sendo subestimados. Nijland e colaboradores (2016) mostraram que a linhagem com o transportador quimérico *HXT36-N367A*, mutado em seus resíduos de lisina na porção N-terminal, teve suas V_{maxs} aumentadas com glicose e xilose. Além disso, uma outra versão desse transportador (*HXT36*) também mutado nas lisinas, teve sua afinidade e V_{max} com

glicose aumentada, com aumento também na afinidade por xilose. Um outro trabalho realizado também com um transportador quimérico (*HXT11/2*), mostrou que a troca da porção N-terminal do transportador *HXT2* pelo N-terminal do *HXT11* e consequente substituição de todos os resíduos de lisina nessa região, mudou o K_m com xilose de 65,5 mM para 69 mM, em comparação com o parental *HXT2* (Shin *et al.*, 2017).

É interessante também compararmos esses resultados, com os resultados de fermentação por linhagens contendo transportadores *HXTs* endógenos de *S. cerevisiae*, com expressão específica constitutiva (Gonçalves *et al.*, 2014). O melhor resultado obtido para fermentação de xilose foi a linhagem expressando o transportador *HXT7*, que apresentou consumo máximo volumétrico de açúcar (V_S) de 0,7 g/L/h, com produção máxima volumétrica de etanol (V_E) de 0,3 g/L/h em xilose e apenas 85% do açúcar. Como podemos notar na Tabela 15, a linhagem DLG-tSpXUT1 apresentou uma V_S três vezes maior, com uma V_E mais que o dobro, quando comparado à linhagem expressando o *HXT7*, além de ter consumido 100% do açúcar. Por outro lado, quando comparamos as co-fermentações de glicose mais xilose (Figura 35), a linhagem DLG-tSpXUT1 conseguiu utilizar 100% da glicose e 94% de xilose (Tabela 15), resultado muito diferente do encontrado com a linhagem expressando o *HXT7*, que consumiu 95% de glicose e apenas 45% de xilose. Neste sentido, estes resultados com a linhagem DLG-tSpXUT1 em co-fermentação são particularmente interessantes, tendo em vista que um dos grandes gargalos para uma eficiente fermentação da biomassa vegetal para produção de etanol 2G é a utilização simultânea das mistura de pentoses e hexoses presentes no hidrolisado.

Ao analisarmos a Figura 35, observamos que mesmo a glicose sendo rapidamente consumida, a xilose continuou sendo utilizada, mostrando que de fato a ubiquitinação e consequente degradação do transportador não está acontecendo. E, muito embora, o tempo de consumo pareça ter aumentado, provavelmente em função da presença do etanol no meio, parece que a grande quantidade desse etanol previamente produzido, não prejudicou o consumo de xilose a ponto de impedir que esta continuasse sendo utilizada. Assim, podemos ver claramente nesta figura, que, depois da glicose ter sido totalmente consumida, todo o etanol produzido (~6g/L), além dos 10g/L, foi proveniente da fermentação da xilose. Este resultado não foi observado com a linhagem BBY-SsXUT1 que – mesmo conseguindo produzir etanol a partir de xilose com uma boa capacidade fermentativa – em co-fermentação com glicose e xilose, apesar de consumida, não foi convertida em etanol (de Sales *et al.*, 2015).

Embora bons resultados de co-consumo de glicose e xilose possam ser observados em trabalhos recentes com mutagênese de transportadores *HXTs* endógenos, que resultaram na absorção específica de xilose mesmo na presença de glicose (Farwick *et al.*, 2014; Nijland *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2015; Young *et al.*, 2014), muitas das proteínas *HXTs* são rapidamente degradadas na ausência de glicose (Snowdon *et al.*, 2012) resultando na não utilização completa da xilose. Adicionalmente, mesmo em um trabalho onde a permanência do transportador na membrana foi mantido pela mutagênese da lisina necessária para ubiquitinação, o resultado de co-fermentação ainda apresentou utilização sequencial de glicose e xilose (Nijland *et al.*, 2016).

Com o gene *tSaXUT1*, a truncagem também surtido efeito. Ao analisarmos a Figura 36, percebemos que houve um melhora na utilização de glicose, da mesma forma que com o *tSpXUT1*. Além disto, a extensa fase lag observada na linhagem parental não foi observada na versão truncada. Existem muitas variáveis para isto ter acontecido como, por exemplo: o estado fisiológico do inóculo e tamanho do inóculo (Albertson *et al.*, 1990; Mackey e Derrick, 1984; Breand *et al.*, 1999; Augustin *et al.*, 2000^a). No entanto, tendo em vista que as duas linhagens partiram das mesmas condições, parece que de alguma forma a truncagem teve algum efeito na adaptação das células ao novo ambiente. Nós hipotetizamos que, talvez, a não endocitose do transportador, que antes acontecia e que provavelmente não está acontecendo na linhagem truncada, possa estar poupando energia à célula, de forma que ela tenha mais disponibilidade de ATP para reagir às novas condições do meio. Nijland e colaboradores (2016) apresentaram evidências para este hipótese, já que na linhagem parental expressando o transportador quimérico *HXT36* foi necessário adição de maltose para diminuir a fase lag do crescimento em xilose, no entanto, na linhagem mutada no resíduo de lisina envolvido na ubiquitinação (*HXT36-3K*), observou-se crescimento rápido mesmo sem a adição da maltose.

Curiosamente, a DLG-*tSaXUT1* produziu menos etanol que a DLG-*SaXUT1*. Entretanto, ainda é necessário novos experimentos para confirmar esses resultados. No crescimento em xilose (Figura 37), a linhagem DLG-*tSaXUT1* cresceu mais e consumiu quase o dobro do açúcar, quando comparado com a parental não truncada DLG-*SaXUT1*, todavia, a produção de etanol ainda assim não foi observada. Em contrapartida, ao analisarmos a fermentação em glicose (Figura 38) e co-fermentação em glicose e xilose (Figura 40), não evidenciamos nenhuma diferença significativa entre as duas linhagens.

Tabela 15 – Parâmetros fermentativos em batelada com altas densidades celulares, utilizando 2% glicose ou xilose, e 2% glicose mais 2% xilose como fontes de carbono, por leveduras recombinantes.

Linhagem	Fonte de carbono:						Glicose + Xilose				
	Glicose			Xilose			Glicose		Xilose		Etanol
	Consumo (%)	V_S (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^a	V_E (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b	Consumo (%)	V_S (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^a	V_E (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b	Consumo (%)	V_S (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^a	Consumo (%)	V_S (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^a	V_E (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) ^b
DLG-SpXUT1	100	2.8 ± 0.14	2.39 ± 0.2	10	0.2 ± 0.11	0	97	2.5 ± 0.06	5	0.02 ± 0.01	2.24 ± 0.12
DGL-tSpXUT1	100	9.77 ± 0.01	4.85 ± 0.01	100	2.11 ± 0.04	0.64 ± 0.02	100	9.3 ± 0.01	94	1.59 ± 0.4	5.22 ± 0.12

Nota: ^a consumo máximo volumétrico de açúcar, ^b produção máxima volumétrica de etanol.

Figura 35 – Fermentação em batelada com as linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-SpXUT1 e DLG-tSpXUT1 em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% xilose e 2% glicose como fontes de carbono.

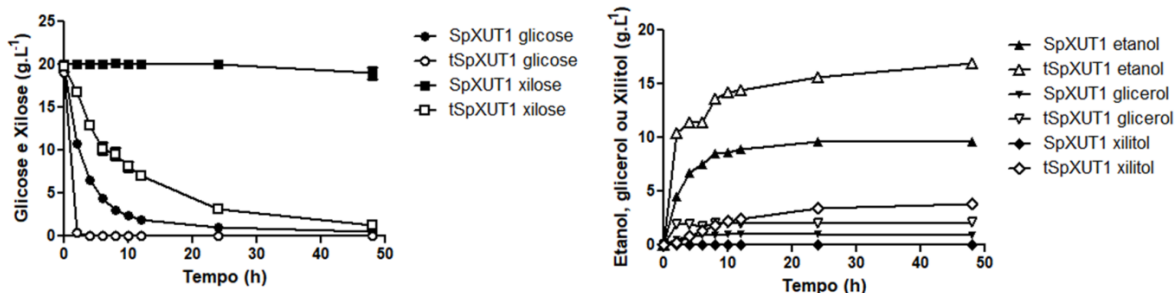
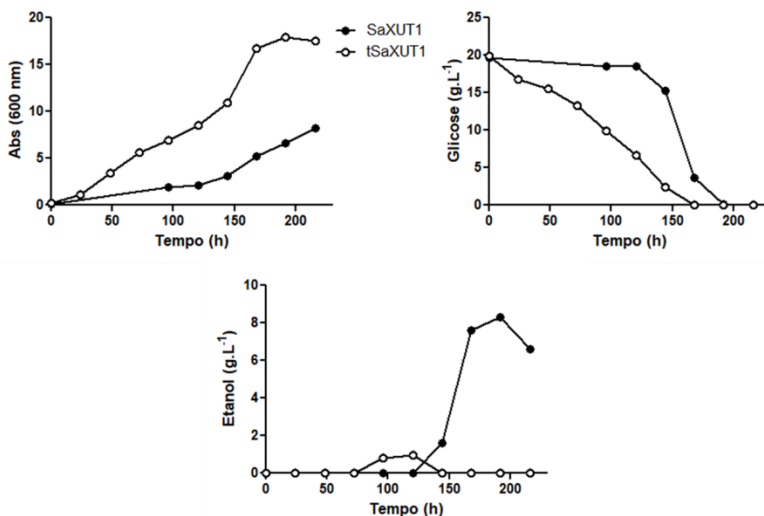


Figura 36 - Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% de glicose.



Já na fermentação em xilose (Figura 39) a linhagem DLG-tSaXUT1 foi capaz de fermentar este açúcar produzindo cerca de 2 g/L de etanol, o que não foi visto com a linhagem parental DLG-SaXUT1. Em recente trabalho, resultados semelhantes foram notados, quando a linhagem sem o resíduo de lisina necessário para ubiquitinação, apresentou uma melhora no crescimento e na fermentação de xilose, na ausência de glicose. Entretanto não foi observado diferença no consumo de glicose entre a linhagem mutada e a parental na co-fermentação com xilose, por se tratar de um transportador endógeno de *S. cerevisiae* que é regulado pela presença da glicose (Nijland *et al.*, 2016).

De fato, não foi bem compreendido as diferenças encontradas, nas versões truncadas e não truncadas, entre as linhagens com os transportadores *SaXUT1* e *SpXUT1* deste trabalho, tendo em vista as semelhanças entre eles observadas no alinhamento (Figura 29). Entretanto, é importante ressaltar que o transportador SaXUT1 e tSaXUT1 estão sob a expressão do promotor GPD, ao passo que o SpXUT1 e tSpXUT1, estão sob a expressão do promotor PGK, e não podemos descartar a possibilidade disto estar influenciando os resultados entre eles. Além disso, podemos observar na Figura 30 que a sequência *SaXUT1* apresenta 2 resíduos de lisina ubiquitináveis com alta

confiança a menos, em comparação com a sequência de *SpXUT1*. Isto talvez possa explicar também as diferenças nos desempenhos de utilização dos açúcares em suas versões não truncadas.

Figura 37 - Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% de xilose.

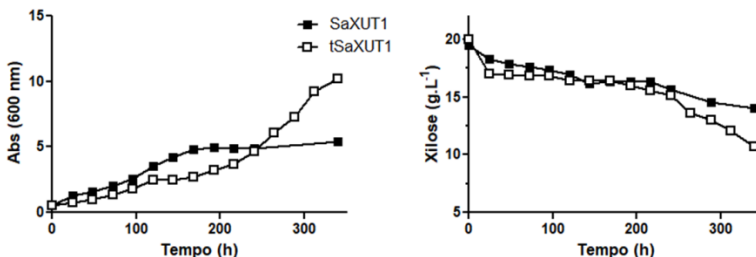


Figura 38 – Fermentação em batelada com 10 g/L das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1 em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% glicose como fonte de carbono.

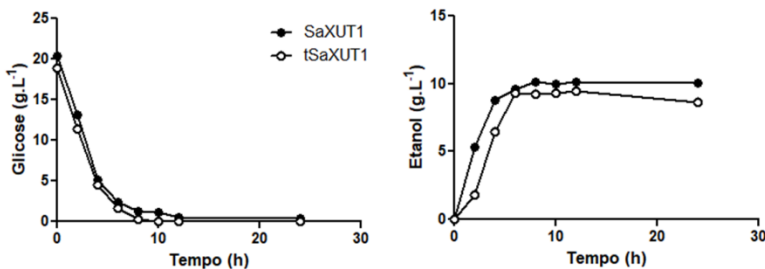


Figura 39 – Fermentação em batelada com 10 g/L das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1 em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% xilose como fonte de carbono.

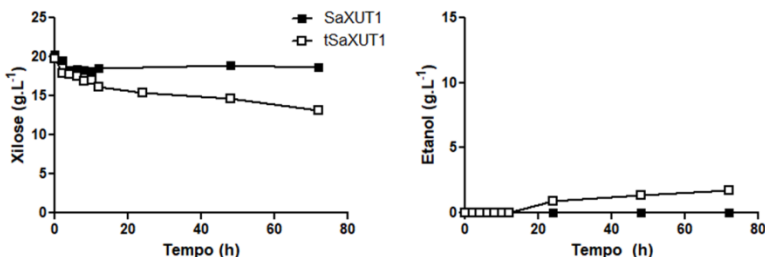
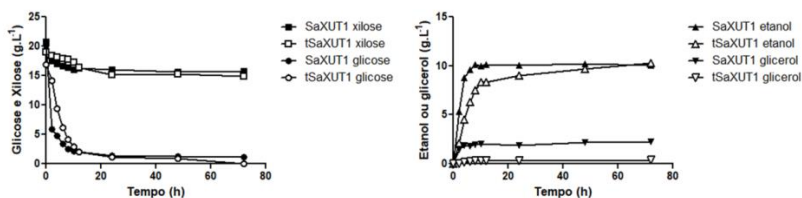


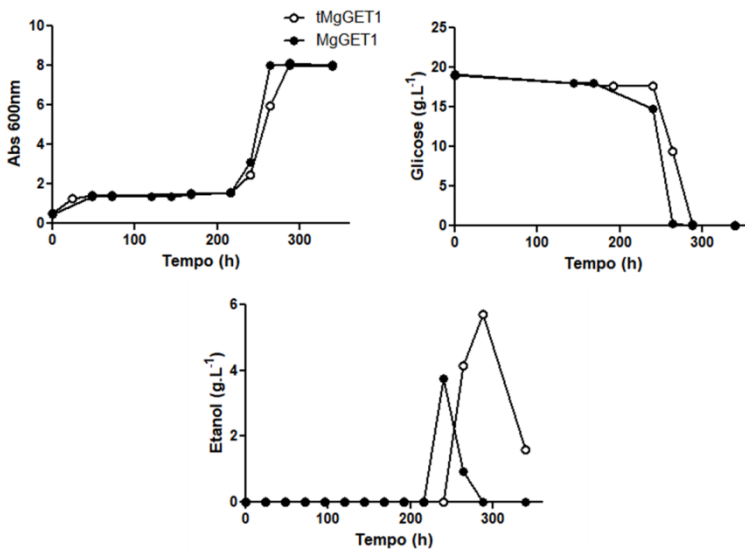
Figura 40 – Fermentação em batelada com as linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-SaXUT1 e DLG-tSaXUT1 em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% xilose e 2% glicose como fontes de carbono.



Ao compararmos os resultados da linhagem DLG-tSaXUT1 com os resultados obtidos pela linhagem que abrigava o gene *SsXUT1* de *Sc. stipitis*, apesar de serem bem semelhantes quando se trata de fermentação de glicose, com utilização de xilose se mantiveram bem diferentes. A linhagem BBY-XUT1 conseguiu consumir 90% desse açúcar em 30 horas de fermentação, produzindo quase 5 g/L de etanol, ao passo que a DLG-tSaXUT1 consumiu apenas 25% em 72 horas, produzindo cerca de 2 g/L de etanol. Dessa forma, a semelhança de 79% de identidade proteica não foi suficiente para manter o mesmo padrão de utilização de açúcares, evidenciando, mais uma vez, que pequenas diferenças nas sequências de aminoácidos já são suficientes para mudar o comportamento da proteína.

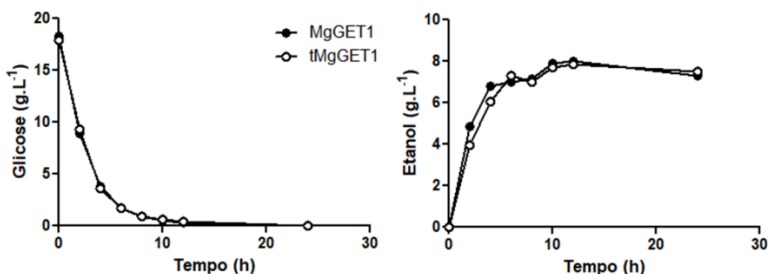
Ao analisarmos os resultados obtidos com as linhagens na versão truncada e não truncada do transportador *MgGET1*, observamos que, embora no crescimento em glicose a versão truncada produziu quase 2 g/L de etanol a mais que a versão não truncada, nenhuma diferença entre elas foi observada nos ensaios de fermentação com este açúcar, apresentando praticamente o mesmo desempenho em ambas as versões (Figuras 41 e 42). Além disso, a versão truncada também continuou não utilizar a xilose nem nos crescimentos nem nas fermentações. Com esses resultados obtidos pela versão truncada do transportador *MgGET1*, fica evidente que, provavelmente, ele se trata de um transportador exclusivo de glicose e que, possivelmente, possa ser regulado em *S. cerevisiae*, da mesma forma que os transportadores *HXTs* de baixa afinidade (*HXT1* e *HXT3*) que normalmente são expressos em altas concentrações de glicose (Özcan & Johnston, 1999) e que são endocitados da membranas citoplasmáticas com subsequente e degradação vacuolar, apenas quando a concentração de glicose é baixa (Roy *et al.*, 2014; Horák, 2013; Snowden & Van Der Merwe, 2012).

Figura 41 - Crescimento aeróbio sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-MgGET1 e DLG-tMgGET1, em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% de glicose.



Ao compararmos os bons resultados obtidos com gene truncado apenas na porção C-terminal (*tSpXUT1*) com o *tSaXUT1*, que foi truncado em ambas extremidades N- e C-terminais, concluímos que, talvez, os resíduos de lisina que são importantes para a ubiquitinação, no caso desses transportadores, estejam na extremidade C-terminal da proteína. Reforçando essa ideia, percebemos que, realmente, os resíduos de lisina que foram dados pela predição com alto grau de confiança, estão apenas na região C-terminal do transportador (Figura 30). Além disso, o único transportador heterólogo truncado (*CDT-2*), descrito na literatura até agora, também descreveu os resíduos de lisina na parte C-terminal da proteína como sendo os importantes para a ubiquitinação (Sen *et al.*, 2016), apesar de alguns trabalhos relatarem que, para os transportadores endógenos (*HXTs*) de *S.cerevisiae*, as lisinas importantes estão no domínio N-terminal do transportador (Nijland *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2017).

Figura 42 – Fermentação em batelada com 10 g/L das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* DLG-MgGET1 e DLG-tMgGET1 em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% glicose como fonte de carbono.



De fato, não é sabido ao certo como acontecem as sinalizações para que os transportadores sejam ubiquitinados. O que se sabe é que, essa ubiquitinação, acontece mediada pela ligase *RSP5*, que é recrutada por meio de uma família de proteínas adaptadoras chamadas α -arrestinas (Finley *et al.*, 2008). Poucos trabalhos até agora se empenharam em elucidar como acontecem os recrutamentos das diferentes α -arrestinas em *S. cerevisiae*. Nikko e colaboradores (2009) verificaram que a arrestina Art4, codificada pelo gene *ROD1*, está envolvida na endocitose do transportador *HXT6*. O'Donnell e colaboradores (2015) verificaram que os genes *ROD1* e *ROG3* que codificam as arrestinas, Art4 e Art7, respectivamente, estão envolvidas no tráfego dos transportadores *HXT1* e *HXT3*. Entretanto, apenas um trabalho com transportadores heterólogos foi realizado até agora. Neste trabalho, Sen e colaboradores (2016) demonstraram que os transportadores heterólogos de celobiose *CDT-1* e *CDT-2*, quando expressos em *S. cerevisiae*, são retirados da membrana celular na presença de celobiose no meio, mediados também pelo *ROD1* e *ROG3*. Nesse sentido, muito estudo ainda é necessário para compreendermos como ocorrem as sinalizações de regulação pós traducional em *S. cerevisiae*, principalmente, quando se tratam de transportadores heterólogos.

Infelizmente, não existem outros trabalhos com transportadores heterólogos de glicose/xilose que foram truncados para compararmos com os nossos resultados. Além disso, é difícil comparar os rendimentos de etanol, produtividade e consumo de substratos dos vários outros trabalhos de clonagem heteróloga de transportadores de xilose em *S. cerevisiae*, devido às variações nos parâmetros experimentais, incluindo a concentração inicial de substrato, os tempos de incubação e as densidades celulares utilizadas para as fermentações (Jun e Jiayi, 2012).

Além do mais, infelizmente, muitos desses trabalhos não apresentaram em seus resultados os dados de fermentação para compararmos com os nossos (Du *et al.*, 2010; Jeffries *et al.*, 2007; Runquist *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015; Weierstall *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2011).

Tendo em vista que poucos trabalhos até o momento abordaram o bloqueio do processo de ubiquitinação nos transportadores e que nenhum trabalho de truncagem de transportadores heterólogos de xilose foi realizado até agora, parece que a abordagem para clonagem de transportadores hetólogos de xilose empregada no presente trabalho, além de ser pioneira, também se mostrou uma excelente estratégia para construção de *S. cerevisiae* recombinantes para a produção de etanol 2G.

4.2 – Identificação e clonagem de enzimas e transportadores para celobiose e xilobiose

O uso de biomassa vegetal para a produção de biocombustíveis exige uma utilização eficiente de todos os açúcares presentes no hidrolisado lignocelulósicos. Embora a composição seja variável, hidrolisados de biomassa vegetal consiste, em muitos casos, de ~70% de celodextrinas e glicose, e ~30% de xilose (Carroll, 2009). Entretanto, como os micro-organismos utilizam preferencialmente a glicose, no momento da sua depleção (quando as células começam a usar xilose), a concentração de etanol já é suficientemente alta reduzindo ainda mais a velocidade de fermentação de xilose. Como resultado, a utilização sequencial da xilose após o esgotamento da glicose por causa da chamada "repressão da glicose" é uma barreira significativa para a utilização bem sucedida da mistura dos açúcares nos hidrolisados celulósicos (Ha *et al.*, 2011). Além disso, são necessárias grandes quantidades de coquetéis de enzimas celulases e hemicelulases para liberar os monossacarídeos finais glicose e xilose, o que elevam os custos do processo, diminuindo, assim, a viabilidade da produção do etanol 2G (Lynd *et al.*, 2002; Chundawat *et al.*, 2011).

Uma alternativa para superar esses desafios, seria a utilização direta dos dissacarídeos celobiose/xilobiose, que aliviaria a competição entre seus respectivos monossacarídeos (glicose e xilose) e tornaria o processo menos caro, uma vez que a última etapa desta digestão no hidrolisado seria evitada. Assim, o transporte seletivo de oligossacarídeos como xilobiose e celobiose, em paralelo com glicose e xilose, pode proporcionar a co-fermentação efetiva desses açúcares. (Li *et al.*, 2015; Ragauskas *et al.*, 2006; Stephanopoulos, 2007; Zhang *et al.*, 2017). Neste sentido, a conversão bem sucedida de biomassa celulósica

em biocombustíveis exigirá, portanto, organismos capazes de uma utilização eficiente das combinações de xilose, celodextrina, glicose e xilodextrinas. Porém, assim como com xilose, a *S. cerevisiae* é incapaz de naturalmente utilizar diretamente a celobiose e a xilobiose, por não possuir transportadores e enzimas necessárias para este processo. Dessa forma, o presente trabalho se propôs a buscar novos transportadores e enzimas para habilitar *S. cerevisiae* a utilizar esses oligossacarídeos eficientemente.

Para isto, em um primeiro momento, duas sequências pertencentes a transportadores da superfamília MFS, de 2 espécies de levedura diferentes (*C. tropicalis* e *M. guilliermondii*), com histórico de utilização de xilose, foram selecionadas como possíveis transportadores de xilobiose (Jeffries, 1981; Matos et al., 2013; Sánchez et al., 2008, Rao et al., 2006; Rao et al., 2004). A identificação destas duas sequências foi através de BLASTp pela similaridade com o conhecido transportador de celobiose/xilobiose *CDT-2* de *N. crassa* (GenBank 380022) (Galazka et al., 2010; Ha et al., 2011). O gene escolhido de *C. tropicalis* foi denominado *CtCBT1* e o de *M. guilliermondii* *MgCBT2*. Além dessas novas sequências selecionadas, os genes *AGT1* de *S. cerevisiae* e *HXT2.4* de *Sc. stipitis* também foram escolhidos para testes de transporte com xilobiose. O primeiro foi escolhido, já que o trabalho anteriormente realizado por Fujii e colaboradores (2011) atribuíram a ele o transporte de xilobiose em uma *S. cerevisiae* expressando uma β -xilosidase intracelular. O segundo, por ser um transportador de celobiose conhecido (Ha et al., 2013), mas que, no entanto, foi descrito por Jeffries & Van Vleet (2009) como um gene fortemente induzido na presença de xilose, levando-nos a acreditar que pode se tratar de um possível transportador de xilobiose. Todas essas sequências selecionadas, bem como o organismo de origem e seus números de acesso no GenBank, estão listados na Tabela 10.

Esses genes, foram clonados em plasmídeo multicópia, da mesma forma como descrito para os demais genes anteriormente clonados, em seguida, exceto o que continha o *AGT1*, foram transformados em uma cepa de *S. cerevisiae* deletada dos transportadores da família Mal (CMY1050) – como descrito em material e métodos – dando origem às linhagens CMY-CtCBT1, CMY-MgCBT2, CMY-HXT2.4 (listadas na Tabela 8) para serem submetidas a ensaios de simporte com xilobiose e outros oligossacarídeos como celobiose, xilotrioses e maltose.

No entanto, nenhuma atividade foi observada com nenhuma das sequências, para todos os açúcares testados. Uma análise adicional das estruturas transmembranas desses transportadores foi realizada, para

verificar a presença de aminoácidos com grupos funcionais ionizáveis (ácido glutâmico - E, ácido aspártico - D, histidina - H) no meio desses domínios, que são característicos em transportadores do tipo H⁺-co-transporte (Chaptal et al., 2011; Dang et al., 2010; Ditty & Harwood, 2002; Vadyvaloo et al., 2006), como mencionado anteriormente neste trabalho. De fato, não foi observada a presença de nenhum destes aminoácidos em qualquer segmento transmembrana para as sequências analisadas, levando a creditar que realmente se tratam de transportadores por difusão facilitada (dados não mostrados).

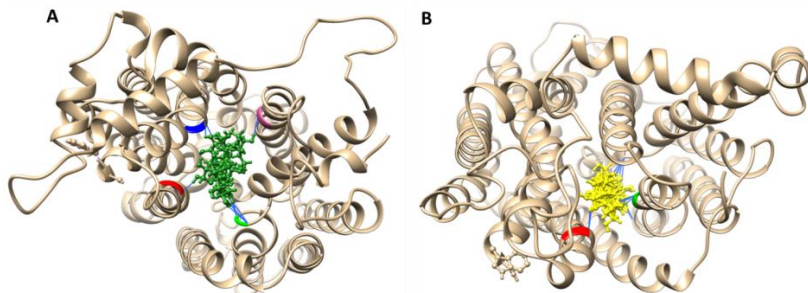
Como foi sugerido por Fujii e colaboradores (2011) que o *AGTI* poderia transportar xilo-oligossacarídeos, um trabalho em paralelo foi realizado para verificar esse possível transporte. Para isto, foi feito um ensaio de simporte com xilobiose e xilotriose, utilizando uma linhagem de *S. cerevisiae* que só possuía em seu genoma os transportadores da família *MAL* (DLG-K1) que inclui o *AGTI*, e uma outra linhagem isogênica à DLG-K1, porém, com o *AGTI* deletado de seu genoma, denominada DLG-B1. Nesse experimento foi verificado que o *AGTI* realmente permite o co-transporte de H⁺ tanto com xilobiose como xilotriose, porém esse transporte não acontece exclusivamente por este transportador e provavelmente outros transportadores da família *MAL* estariam envolvidos (dados não publicados).

Adicionalmente, em um recente trabalho submetido, foi verificado, através de mutagênese sitio dirigido, que resíduos como Glu-120, Asp-123, Glu-167 e Arg-504, presentes no poro de translocação do transportador *AGTI*, estão intimamente relacionados com o transporte de açúcares (dados não publicados). De fato, nas análises de *docking* com maltose, foi observada a interação do *AGTI* (através de ligações de hidrogênio) com alguns desses resíduos verificados como importantes para o transporte (Arg-504), bem como outros possíveis resíduos (Gln-225, T245 e A481) como mostrado na Figura 43-A. Nesse sentido, o presente trabalho decidiu verificar se o *AGTI* também se ligaria com xilobiose. Como é possível observar na Figura 43-B, a xilobiose não só se encaixa no poro de translocação do transportador, como também faz ligações de hidrogênio com dois dos resíduos presentes, nos segmentos transmembrana, que também se ligam à maltose (T245 e A481). Esses resultados indicam que o *AGTI* possa realmente ser um promissor transportador de xilo-oligossacarídeos.

Para verificar a funcionalidade destes genes (*AGTI*, *CtCBT1*, *MgCBT2*, *HXT2.4*) como transportadores de xilobiose, seria necessário encontrar uma β -xilosidase intracelular, para fazer a hidrólise deste

carboidrato no interior da célula e liberar a xilose para ser convertida em etanol.

Figura 43 – Modelo estrutural da permease *AGT1*. O modelo baseia-se na estrutura *outward-facing* parcialmente ocluída da *XylE* de *E. coli* ligada à maltose (estrutura em verde) (A) e ligada à xilobiose (estrutura em amarelo) (B) (código ZINC ID 4095762 e 4095691, respectivamente). As imagens 3D foram criadas por MODELLER (Webb & Sali, 2014). Em vermelho está marcado o resíduo T245, em verde o resíduo A481, em rosa o R509 e em azul G225.



Assim, foi selecionada uma sequência de uma possível β -xilosidase proveniente de *Pseudozyma antarctica*, que foi denominada *PATI* (Tabela 10). Esta sequência foi selecionada baseada em sua similaridade, através de BLASTp, com a enzima β -xilosidase intracelular (GH43) de *N. crassa* (GenBank ID NCU01900) (Li *et al.* 2015). O gene para esta enzima, então, foi clonada em plasmídeo multicópia, da mesma forma que os outros genes, e transformada na linhagem *S. cerevisiae* DLG-K1. Em seguida, esta linhagem denominada DLG-PAT1, foi submetida a ensaios fermentativos com hidrolisado de xilana. No entanto, nenhum consumo dos carboidratos presentes no hidrolisado (xilose, xilobiose, xilotrioses, xilotetose, xilopentose e xilohexose) foi detectado (dados não mostrados).

Diante disso, foi feito um ensaio de determinação da atividade enzimática usando *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (um análogo de xilobiose), como detalhado em material e métodos. Entretanto, uma baixíssima atividade de hidrólise de 0,42 nmoles de *p*-nitrofenil/min./mg de célula foi detectada, levando-nos a acreditar que esta atividade apresentada pela *PATI* não seria suficiente para suportar a eficiente fermentação de xilo-oligossacarídeos pela *S. cerevisiae* recombinante.

É difícil comparar a atividade apresentada pela *PATI* e saber se realmente é muito baixa, já que todos os trabalhos que exibiram as atividades intracelulares de β -xilosidases clonadas em *S. cerevisiae*,

apresentaram unidades de medidas em mg de proteína ou μM de proteína, diferente do presente trabalho que foi quantificadas em mg de células, o que impossibilitou a comparação dos resultados (Fujii *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015). Dessa forma, foi decidido quantificar a atividade da maltase – uma enzima endógena de *S. cerevisiae* e que é fortemente expressa na presença de maltose – usando os mesmos métodos utilizados para quantificar a *PATI*. Feito isto, foi obtido a atividade para maltase de 163,2 nmoles de *p*-nitrofenil/min./mg de célula. De fato, um valor muito acima do encontrada para *PATI*, mostrando que realmente a linhagem expressando esta enzima, não conseguiria utilizar xilobiose ou outros xilo-oligosacarídeos.

A sequência da *PATI* está depositada no NCBI como pertencente à superfamília GH43.4, no entanto, ela também possui motivos conservados pertencentes a outras três famílias de glicosil hidrolases: GH32, GH62 e GH68. Os membros das famílias de glicosil hidrolases (GH32, GH43, GH62, GH68) possuem os domínios de 5-lâminas β -hélice e compreendem os clãs F e J, conforme classificado pelo banco de dados de enzimas ativas com carboidratos (CAZY). O clã F é composto por famílias GH43 e GH62. A família GH43 inclui β -xilosidases, β -xilanasas, α -L-arabinases e α -L-arabinofuranosidases, enquanto a família GH62 contém α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) que se encaixa especificamente -1,2 ou α -1,3-L-arabinofuranose nas cadeias laterais da xilana. O clã J consiste nas famílias GH32 e GH68. GH32 compreende hidrolases de sacarose-6-fosfato, invertases, inulinasas, levanases, fructosiltransferases eucarióticas e fructotransferases bacterianas, enquanto que GH68 é constituído por fructosiltransferases (FTFs) que incluem levansucrase (EC 2.4.1.10); β -fructofuranosidase (EC 3.2.1.26); inasucrase (EC 2.4.1.9), todos os quais utilizam sacarose como seu substrato preferencial. Além disso, em um BLASTp geral com todos os micro-organismos no NCBI, a sequência da *PATI*, possui alta identidade (40-70%) com sequências depositadas como endo- β -xilanasas e nenhuma com β -xilosidases. Portanto, pode ser que esta enzima tenha sua melhor atividade com outro substrato que não xilobiose, o que justificaria a fraca atividade com o análogo deste açúcar. Dessa forma, sem uma enzima β -xilosidase com boa atividade de hidrólise, ficou impossível testar se, realmente, as sequências anteriormente selecionadas (*CtCBT1*, *MgCBT2*, *HXT2.4* e *AGT1*) funcionariam como transportadores de xilobiose.

Até o momento, pouquíssimos trabalhos mostram a utilização direta de xilobiose em *S. cerevisiae*. O primeiro relato foi apresentado por Fujii e colaboradores em 2011. Neste trabalho, eles inseriram uma β -

xilosidase proveniente do fungo filamentosso *T. reesei* em uma linhagem recombinantes de *S. cerevisiae* e verificaram que se tratava de uma enzima intracelular. Essa linhagem foi capaz de produzir etanol a partir de um meio contendo xilo-oligossacarídeos. Como até o momento, nenhum transportador deste tipo de carboidrato tinha sido identificado em *S. cerevisiae*, os autores atribuíram este transporte ao transportador endógeno *AGT1*, que é conhecido por sua promiscuidade em transportar diferentes oligossacarídeos como maltose, maltotriose e sacarose (Badotti et al, 2008; Han et al., 1995; Stambuk et al., 2006). No entanto, eles verificaram que a atividade desta β -xilosidase intracelular era inibida na presença de xilose, levando a uma lenta fermentação dos xilo-oligossacarídeos.

Em outro trabalho, uma linhagem expressando o transportador *CDT-2* e a enzima *GH43.2* de *N. crassa* foi capaz de usar diretamente xilodextrinas, todavia eles descobriram que a enzima xilose redutase inserida na *S. cerevisiae* possuía, também, atividade de xilodextrina-redutase produzindo xilosil-xilitol, que não é um produto metabolizado por *S. cerevisiae*. Porém, eles descobriram em *N. crassa*, outra enzima β -xilosidase (*GH43.7*), com fraca atividade com xilobiose, mas que rapidamente hidrolisava xilosil-xilitol em xilose e, assim, construíram uma nova linhagem expressando as duas enzimas mais o transportador *CDT-2* (Li et al., 2015). Apesar desta nova linhagem crescer mais rapidamente em xilodextrinas que a linhagem anterior, a velocidade de consumo ainda era bastante lenta para aplicações industriais.

Recentemente, Zhang e colaboradores (2017) encontraram um novo transportador isolado de *T. virens* (*ST16*), com evidentes vantagens em transportar xilo-oligossacarídeos sobre o *CDT-2* de *N. crassa*. O gene para este transportador foi transformado em *S. cerevisiae* juntamente com os genes para as enzimas *GH43.2* e *GH43.7* de *N. crassa*, porém, quando realizados ensaios fermentativos em xilodextrinas sob condições anaeróbicas, esta linhagem recombinante não apresentou significativa melhora comparado com a linhagem que levava o transportador *CDT-2*.

Dessa forma, apenas dois transportadores de xilobiose foram descritos até o momento e apenas duas enzimas β -xilosidases intracelulares foram clonadas em *S. cerevisiae*. Isto deixa claro à necessidade de novos transportadores e novas enzimas para melhorar a via de utilização da xilobiose em *S. cerevisiae* e superar alguns dos gargalos necessários para uma eficiente fermentação do hidrolisado de biomassa vegetal. E, apesar de terem sido encontrados novos transportadores com possíveis promissoras capacidades em transportar

xilobiose, encontrar uma β -xilosidase intracelular que seja funcional em *S. cerevisiae* e que apresente uma atividade que sustente um processo fermentativo, ainda é desafiador.

A segunda parte proposta nesta etapa do trabalho foi encontrar genes para possíveis transportadores e enzimas, que fossem promissores para tornar efetiva a construção de uma *S. cerevisiae* industrialmente viável, para produção de etanol a partir da utilização direta de celobiose. Existem duas possíveis vias de utilização intracelular da celobiose: (1) utilizando um transportador de celobiose e uma β -glicosidase intracelular (via hidrolítica) ou (2) através de um transportador de celobiose e uma enzima celobiose fosforilase (via fosforolítica). Na via hidrolítica, duas moléculas de glicose são formadas intracelularmente e, pela atividade hexoquinase (HXK), cada uma é convertida em glicose-6-fosfato (Glc-6P) utilizando 1ATP cada. Já na via fosforolítica, são formados uma molécula de glicose intracelular e uma de glicose-1-fosfato (Glc-1P). Nessa via, a Glc-1P é convertido em Glc-6P por fosfoglucomutase (PGM) sem gasto de ATP, enquanto a glicose é convertida em Glc-6P por HXK da mesma forma que na via anterior. Em ambos os caminhos, Glc-6P é fermentada a etanol e CO₂. Embora a via fosforolítica tenha vantagens enérgicas sobre a via hidrolítica, cepas com celobiose fosforilase intracelular, fermentaram celobiose mais lentamente em relação a cepas empregando β -glicosidase intracelular (Ha et al., 2012).

Diante disto, foi decidido, primeiramente, buscar genes de transportadores de celobiose e β -glicosidasas, na espécie de levedura *Sp. passalidarum*, já que alguns estudos demonstraram sua excelente capacidade em co-metabolizar glicose, xilose e celobiose (Jeffries et al., 2013; Longet et al., 2012). Alguns genes foram identificados a partir do genoma desta levedura anotado no NCBI. Os genes candidatos para transportadores foram selecionados com base na semelhança das seqüências de aminoácidos com *CDT-2* (transportador de xilobiose e celobiose) de *N. crassa* (Galazka et al., 2010). Assim, duas seqüências foram encontradas, a primeira com 28% de identidade nomeada *CBT1* e a segunda com 27% de identidade nomeada *CBT2* (Tabela 10). Para buscar seqüências para possíveis β -glicosidasas intracelulares foi utilizada como molde a conhecida β -glicosidase *GHI-1* (GenBank NCU00130) também de *N. crassa*, porém, nenhuma seqüência com significativa similaridade foi encontrada. Numa segunda tentativa, foi usada a β -glicosidase de *T. terrestris* (*TtBG*) (Bae et al. 2014) e, assim, foram encontradas duas seqüências com 33% e 29% de identidades nomeadas *SpBGL1* e *SpBGL2*, respectivamente (Tabela 10).

Adicionalmente, foram realizadas análises de predição de peptídeo sinal nestas sequências, através do programa de bioinformática PHOBIUS, para assegurar que fossem β -glicosidases intracelulares.

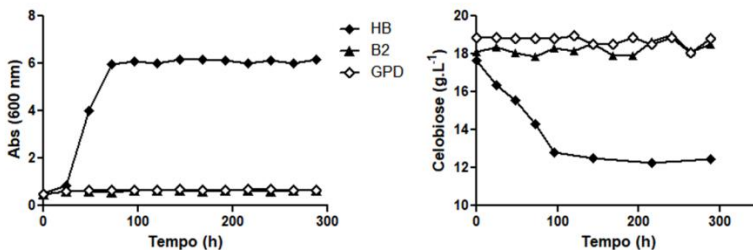
Para estas sequências selecionadas então, foram desenhados *primers* (Tabela 9) para amplificação do gene a partir da cepa *Sp. passalidarum* HMD16.2 que havia sido recentemente isolada da biodiversidade brasileira (Cadete *et al.*, 2012). Entretanto, das quatro sequências selecionadas, apenas a *SpBGL2* foi amplificada com os *primers* desenhados, provavelmente, em função do polimorfismo que havia entre as duas cepas, já que a sequenciada foi isolada do intestino de besouro (Nguyen *et al.*, 2006) e a segunda – usada para amplificar o gene – tinha sido isolada de madeira em decomposição (Cadete *et al.*, 2012).

Esta sequência foi clonada, primeiramente, em plasmídeo multicópia contendo o gene *URA3* para seleção das transformantes (como detalhado em material e métodos). Em seguida esse plasmídeo foi transformado na linhagem *S. cerevisiae* CENPK2-1C (Tabela 8) – como forma de garantir que a enzima realmente fosse intracelular, já que a CENPK2-1C é incapaz de transportar celobiose – dando origem à linhagem CENPK-B2 (Tabela 8). Posteriormente, a sequência *SpBGL2* também foi clonada em outro plasmídeo contendo o gene de seleção *TRP1* e em seguida foi transformado na CENPK2-1C, juntamente com outro plasmídeo contendo o conhecido transportador de celobiose *HXT2.4* de *Sc. stipitis* (HA *et al.*, 2013), mas que levava o gene marcador *URA3*, dando origem à linhagem CENPK-HB (Tabela 8). Isso foi feito para verificar a funcionalidade da *SpBGL2* como β -glicosidase intracelular.

Como é possível observar na Figura 44, a única linhagem capaz de crescer em celobiose foi a que possuía os genes para β -glicosidase (*SpBGL2*) e o transportador de celobiose (*HXT2.4*), mostrando que, de fato, a enzima *SpBGL2* realmente se trata de uma β -glicosidase intracelular. Diante disso, foi feito um ensaio de determinação da atividade enzimática usando *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NP β G) (análogo de celobiose), como detalhado em material e métodos. Como resultado, foi obtido uma atividade de 146,8 nmoles de *p*-nitrofenil/min./mg de célula. No entanto, mais uma vez, as diferenças nos métodos de determinação enzimáticas e/ou unidades de medida, usados nos outros trabalhos que empregaram β -glicosidases intracelulares em *S. cerevisiae* (Bae *et al.*, 2014; Galazka *et al.* 2010), dificultaram a comparação com os resultados deste trabalho. Por outro lado, ao compararmos com a atividade da maltase de 163,2 nmoles de *p*-nitrofenil/min./mg de célula (como mencionado anteriormente), fica

claro que, realmente, a enzima *SpBGL2* apresentou uma excelente atividade em *S. cerevisiae*.

Figura 44 - Crescimento aeróbico sob agitação a 160 rpm das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* CENPK-HB, CENPK-B2 e linhagem controle CENPK-GPD (que leva o plasmídeo vazio), em meio sintético *dropout* (sem uracila) com 2% de celobiose para CENPK-B2 e para CENPK-GPD e meio sintético *dropout* (sem triptofano sem uracila) com 2% de celobiose para CENPK-HB.

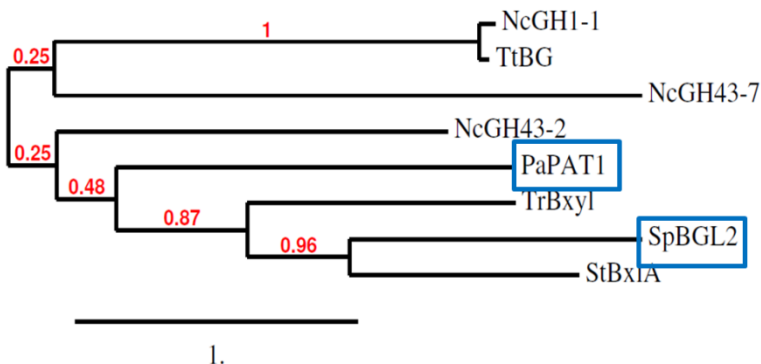


Adicionalmente, foi realizando a determinação da atividade enzimática usando *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NP β X) (análogo de xilobiose), para verificar se a *SpBGL2* poderia ter, também, atividade como β -xilosidase e, de fato, foi observado uma atividade de 42 nmoles de *p*-nitrofenil/min./mg de célula. Este resultado foi 100 vezes maior do que tinha sido obtido anteriormente com a enzima *PATI*.

Ao analisar o filograma (Figura 45), construído com as principais enzimas intracelulares caracterizadas, foi observado que a *PATI* se localiza mais próxima às β -xilosidases, entretanto, não se agrupou perto de nenhuma das β -xilosidases caracterizadas em *S. cerevisiae*, mostrando que realmente é uma sequência muito diferente das que foram funcionais e tiveram boa atividade. Dessa forma, esta enzima, possivelmente, pode se tratar de outra enzima que não β -xilosidase, como especulada anteriormente. Já a *SpBGL2*, interessantemente, se agrupou mais próxima das β -xilosidases, inclusive com maior proximidade com a *BXLA* de *Streptomyces thermovilaceos* – que faz parte de um operon *BXL* composto por uma proteína de ligação ao xiloligossacarídeo (*BXLE*), duas permeases (*BXLF* e *G*) e a β -xilosidase intracelular (*BXLA*) – que não foi testada em *S. cerevisiae* (Tsujibo *et al.*, 2004). Por outro lado, ao analisar a sequência da *SpBGL2* em um alinhamento geral com todos os micro-organismos (dados não mostrados), ela se agrupa mais próximas de β -glicosidases de *Sc. stipitis*

e *Debaryomyces hansenii* depositadas, mas que também não foram caracterizadas.

Figura 45 – Filograma construído com as enzimas clonadas neste trabalho (*PAT1* e *SpBGL2*-marcados em caixa azul), juntamente com as principais enzimas β -glicosidasases e β -xilosidasases intracelulares caracterizadas. A árvore filogenética foi construída baseada nas sequências proteicas de cada gene e utilizando o programa Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008)



A sequência *SpBGL2* está depositada no NCBI como pertencente à superfamília GH3. As glicosil hidrolases GH3, apresentam uma diversidade incomum em estrutura, especificidade e papel biológico e são amplamente distribuídas em bactérias, fungos e plantas. Esta família, contém β -glicosidasases, N-acetilglicosaminidasases (muitas vezes chamadas NagZs), β -xilosidasases e arabinofuranosidasases (Harvey *et al.*, 2000). Em muitos casos, as enzimas GH3 apresentam dupla especificidade. Por exemplo, existem várias enzimas bifuncionais bem caracterizadas nesta família que possuem atividade α -L-arabinofuranosidase e β -D-xilopiranosidase (Lee *et al.*, 2003) e um exemplo caracterizado de uma N-acetil-p-D-glicosaminida/ β -glicosídeo hidrolase/fosforilase de *Cellulomonas fimi* (Macdonald *et al.*, 2015; Mayer *et al.*, 2006). Além disso, a enzima GH3 de *K. marxianus* (*KmBgli*), que compartilha 55% de identidade com a *SpBGL2*, hidrolisa *p*NP β G com uma alta eficiência catalítica, mas também hidrolisa *p*NP β X, *p*NP β Fuc, *p*NP β Ara e *p*NP β Gal com menores eficiências (Yoshida *et al.*, 2010). Todas estas evidências, talvez expliquem a atividade com o análogo de xilobiose (*p*NP β X), apresentada pela *SpBGL2*.

Além de pertencer à família GH3 e possuir o domínio conservado entre as β -D-glicosidases (PRK15098), a *SpBGL2* também abriga o domínio PA14 (pf07691). Este domínio está localizado na porção N-terminal da proteína e está envolvido com o sítio de reconhecimento do carboidrato (Finn et al., 2006; Kobayashi et al., 1998; Rigden et al., 2004). Yoshida e colaboradores (2010) mostraram que para a β -glicosidase KmBgli (55% de identidade com *SpBGL2*), o domínio PA14 conferiu uma característica essencialmente limitada a dissacarídeos, de forma que quando os trissacarídeos foram usados como substratos, a atividade diminuiu drasticamente.

Sabe-se que as β -glicosidases estão também envolvidas em reações inversas de síntese de glicosídeos por transglicosilação (Christakopoulos et al., 1994). Ha e colaboradores (2011) relatam que, provavelmente, as celodextrinas acumuladas no meio de fermentação, podem estar sendo geradas pela atividade de transglicosilação da β -glicosidase intracelular (*GHI-1*) e liberadas no meio pelo transportador de celodextrina (*CDT-1*). Até o momento, apenas a enzima *TtBG* de *T. terrestris*, apresentou reduzida atividade de transglicosilação quando clonada em *S. cerevisiae* (Bae et al., 2014). Ao analisar a Figura 45, é possível observar que a *SpBGL2* está bem distante das duas únicas enzimas β -glicosidases intracelulares caracterizadas em *S. cerevisiae* (*GHI-1 N. crassa* e *TtBG* de *T. terrestris*) (Bae et al., 2014; Galazka et al., 2010). Dessa forma, seria interessante investigar ausência de atividade de transglicosilação, bem como resistência à inibição por glicose (Chauve et al., 2010), que naturalmente acontecem com as β -glicosidases em geral e levam ao acúmulo de celodextrinas no meio, além de perdas na produtividade de etanol.

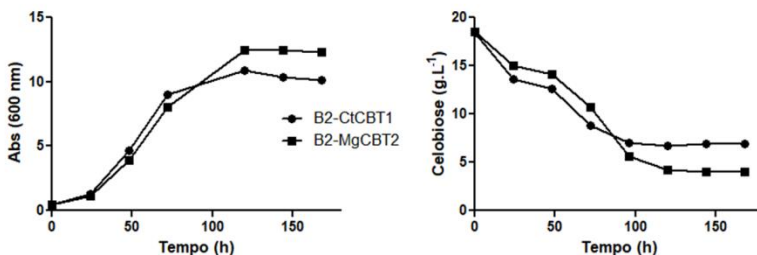
Diante da funcionalidade apresentada pela β -glicosidase *SpBGL2*, resolveu-se testar as sequências *MgCBT2* proveniente de *M. guilliermondii* e *CtCBT1* de *C. tropicalis* (anteriormente selecionadas para possíveis transportadores de xilobiose) como transportadores de celobiose. Esta estratégia foi adotada, uma vez que o gene usado para buscar estas sequências foi o *CDT-2*, que codifica um transportador com transporte tanto com xilobiose como com celobiose (Galazka et al., 2010; Há et al., 2011).

Assim, estas sequências foram clonadas em plasmídeos multicópia e transformadas, juntamente com o plasmídeo contendo a *SpBGL2*, na linhagem *S. cerevisiae* CENPK2-1C (assim como feito anteriormente para a linhagem CENPK-HB), dando origem às linhagens CENPK-B2-*MgCBT2* e CENPK-B2-*CtCBT1*, respectivamente para as sequências *MgCBT* e *CtCBT1* (listadas na Tabela 8). Estas linhagens

foram então submetidas a ensaios de crescimento e fermentação, usando celobiose como fonte de carbono.

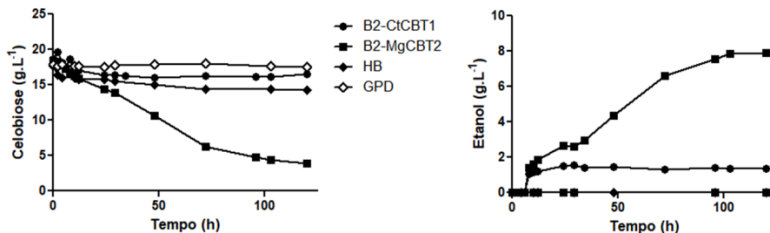
Como é possível observar na Figura 46, ambas as linhagens conseguiram consumir celobiose, confirmando as funcionalidades das sequências *MgCBT2* e *CtCBT1* como transportadores deste açúcar. Entretanto, a linhagem CENPK-B2-*MgCBT2* consumiu cerca de 3 g/L de celobiose a mais que a linhagem CENPK-B2-*CtCBT1*, mostrando um melhor desempenho que esta. Quando são comparados os crescimentos destas linhagens com o crescimento da linhagem CENPK-HB (Figura 44), que continha a *SpBGL2* e o transportador *HXT2.4* de *Sc. stipitis*, foi observado que ambas tiveram um desempenho melhor que esta, onde a CENPK-B2-*MgCBT2* consumiu cerca de 9 g/L de celobiose a mais que a CENPK-HB e a CENPK-B2-*CtCBT1* consumiu aproximadamente 6 g/L a mais. Por outro lado, nenhuma das linhagens testadas foram capazes de produzir etanol durante o crescimento, deixando claro que, para celobiose, a levedura preferiu respirar a fermentar.

Figura 46 - Crescimento aeróbio sob agitação de 160 rpm, das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* CENPK-B2-*CtCBT1* e CENPK-B2-*MgCBT2*, em meio sintético *dropout* (sem triptofano e sem uracila) com 2% de celobiose.



Ao observar os resultados da fermentação entre as linhagens construídas (Figura 47), é possível preceber que a CENPK-B2-*MgCBT2* mostrou um desempenho fermentativo muito superior às demais recombinantes, consumindo 75% da celobiose e produzindo 8,1 g/L de etanol. A linhagem CENPK-B2-*CtCBT1*, apesar do baixo desempenho, ainda conseguiu consumir 12% de celobiose produzindo cerca de 1,4 g/L de etanol, já a linhagem CENPK-HB não conseguiu fermentar este açúcar. Por outro lado, o consumo de celobiose pela CENPK-B2-*MgCBT2* foi bastante lento e, mesmo depois de 120 horas, a celobiose ainda não tinha sido completamente consumida.

Figura 47 – Fermentação em batelada com as linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* CENPK-B2-CtCBT1, CENPK-B2-MgCBT2, CENPK-HB e linhagem controle CENPK-GPD (que leva o plasmídeo vazio) em meio sintético *dropout* (sem triptofano e sem uracila) para linhagens CENPK-B2-CtCBT1, CENPK-B2-MgCBT2, CENPK-HB e (sem uracila) para CENPK-GPD, com 2 % de celobiose.



Esse lento consumo de celobiose na fermentação, também foi observado em outros trabalhos que abordaram a utilização direta deste açúcar por *S. cerevisiae*. Galaska e colaboradores (2010) mostram que a celobiose foi totalmente consumida apenas depois de 120 horas. Em outro trabalho, Ha e colaboradores (2012) mostram que a linhagem modificada para utilização de celobiose consumiu todo esse açúcar apenas depois de 96 horas.

Uma das possíveis explicações para esse lento consumo de celobiose, realizado pela CENPK-B2-MgCBT2, pode ser em função de uma possível ubiquitinação do transportador *MgCBT2* com subsequente endocitose e degradação. Um trabalho recente demonstrou que os transportadores de *N. crassa* *CDT-1* e *CDT-2*, estão sujeitos a endocitose mediada por quatro α -arrestinas (*ROD1*, *ROG3*, *ALY1* e *ALY2*) e que, pelo menos para *CDT-2*, os resíduos de lisina localizados em seu domínio citosólico C-terminal, são necessários para sua eficiente endocitose. Tanto a deleção destas α -arrestinas, como as mutações nos resíduos de lisinas, melhoraram a produção de etanol a partir de celobiose em fermentação (Sen et al., 2016). Nesse sentido, ao analisarmos as sequências de aminoácidos do transportador *MgCBT2*, usando um programa de análise de predição de resíduos de lisinas passivos de ubiquitinação (como detalhado em material e métodos), constatamos a presença de 2 resíduos de lisina (K) na porção N-terminal do transportador (dados não mostrados): um na posição K10 (com média confiança de ubiquitinação) e outro na K20 (com alta confiança de ubiquitinação). Apesar de Sen e colaboradores (2016) mostrarem que os resíduos de lisina importantes para ubiquitinação localizavam-se na

porção C-terminal do transportador, existem outros trabalhos que mostram que a presença de lisinas ubiquitináveis estavam apenas na porção N-terminal (Nijland et al., 2016; Roy et al., 2014). Dessa forma, como constatado anteriormente, ainda não está muito bem compreendido os mecanismos de como ocorre as ubiquitinações nos transportadores e, assim, pode ser que o transportador *MgCBT2* possa realmente estar sendo ubiquitinado e removido da membrana, gerando como consequência, a lenta e incompleta utilização da celobiose.

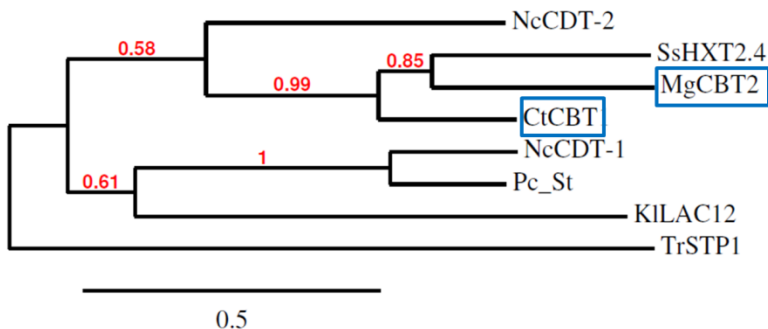
Ao analisar o filograma construído com os principais transportadores de celobiose caracterizados até o momento (Figura 48), é possível preceber que as sequências *CtCBT1* e *MgCBT2* se agruparam próximas à sequência *HXT2.4* de *Sc. stipitis*. Ha e colaboradores (2013) mostraram que a linhagem expressando o transportador *HXT2.4* juntamente com a β -glicosidase intracelular *GHI-1*, foi capazes de consumir 1.33 g celobiose/L/h e produzir 0.54 g etanol/L/h. Esse resultado foi muito diferente do obtido com as linhagens CENPK-B2-MgCBT2 e CENPK-B2-CtCBT1 que consumiram 0.17 g celobiose/L/h e 0.07g celobiose/L/h, e 0.09 g etanol/L/h e 0.07 g etanol/L/h respectivamente. Entretanto, os métodos experimentais empregados por esses outores, foram muito diferentes dos utilizados no presente trabalho, impossibilitando a comparação dos desempenhos fermentativos entre eles.

Por outro lado, Ha e colaboradores (2013) também identificaram que a mutação do resíduo de aminoácido A291 presente no *HXT2.4* (presente no *luping* citoplasmático entre TM 6 e 7) por ácido aspártico (D), melhorou significativamente o K_m e a V_{max} do transportador e consequentemente, a fermentação em celobiose. Entretanto, essa Alanina 291 não é conservada no sítio correspondente dos transportadores *MgCBT2* e *CtCBT1*, que possuem nessa posição uma asparagina (N) e uma serina (S) respectivamente.

Existem várias linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes, que permitiram consumo direto de celobiose utilizando diferentes combinações de transportadores e enzimas β -glicosidases intracelulares. Galazka e colaboradores (2010) mostram que, *S. cerevisiae* expressando o transportador *CDT-1* e a β -glicosidase intracelular *GHI-1* provenientes de *N. crassa*, foi capaz de fermentar celodextrinas de forma eficiente. Sadie e colaboradores (2011) relatam que a cepa de *S. cerevisiae* expressando o transportador *LAC12* de *K. lactis* e a enzima celobiose fosforilase intracelular (*cepA*) de *Clostridium stercorarium* foi capaz apenas de crescer em celobiose como única fonte de carbono, não apresentado capacidade em fermentar esse açúcar. Kimberly e

colaboradores (2012) mostraram que a expressão de uma celobiose fosforilase intracelular de *Ruminococcus flavefaciens* e do transportador *CDT-1* de *N. crassa*, em *S. cerevisiae*, permitiu fermentação de glicose, xilose e celobiose em condições anaeróbicas. Já Bae e colaboradores (2013), demonstraram que a cepa de *S. cerevisiae* com o transportador (*PcST*) de *P. chrysogenum* e β -glicosidase (*TtBG*) de *T. terrestris* apresentou um melhor desempenho fermentativo em celobiose, em comparação com a cepa que expressava o transportador de celodextrina de *N. crassa* (*CDT-1*) e a β -glicosidase de *N. crassa* (*GHI-1*). Num outro trabalho foi identificado que o transportador *Stp1* de *T. reesei* foi capaz de transportar celobiose em uma linhagem de *S. cerevisiae* com a β -glicosidase intracelular (*GHI-1*) de *N. crassa* (Zhang et al. 2013). No entanto, mais uma vez, as diferenças nos métodos fermentativos (densidades celulares iniciais, meios de cultura e condições de oxigenação) empregados nos diferentes trabalhos, dificultou a comparação com os resultados das fermentações do presente trabalho.

Figura 48 – Filograma construído com as sequências *MgCBT2* e *CtCBT1* (marcados em caixa azul), juntamente com as sequências dos principais transportadores de celobiose caracterizados em *S. cerevisiae* até o momento. A árvore filogenética foi construída baseada nas sequências proteicas de cada gene e utilizando o programa Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008)



Por outro lado, o melhor rendimento em gramas de etanol produzido por gramas de celobiose consumida, alcançado até agora foi de 0,44 g/g (Galazka *et al.*, 2010; Lee & Jin, 2017). Este resultado foi obtido por recombinantes *S. cerevisiae* que expressavam o transportador *CDT1* e a enzima *GHI-1*, ambos de *N. crassa*. Nesse sentido, a linhagem CENPK-B2-MgCBT2 superou todos os resultados encontrados até agora, apresentando uma correlação (g) etanol/(g)

celobiose de 0,54, que atinge o máximo teórico de conversão deste açúcar em etanol.

Dessa forma, esses resultados tornam o transportador *MgCBT2* de *M. guilliermondii* e a β -glicosidase *SpBGL2* de *Sp. passalidarum* muito promissores para serem empregados em linhagens industriais, visando o consumo eficiente do hidrolisado de biomassa vegetal e consequente produção economicamente viável de etanol 2G.

5 – CONCLUSÕES

O presente trabalho se propôs a contribuir para uma melhor utilização de xilose por *S. cerevisiae*, bem como torná-la apta a utilizar de forma eficiente outros importantes carboidratos (celbiose e xilobiose) encontrados nos hidrolisados lignocelulósicos, visando à produção de etanol 2G. Nossos resultados nos permitem concluir que:

1. Os transportadores provenientes de uma biblioteca genômica de *Sc. stipitis* (*SsHXT2.6*, *SsXUT1* e *SsQUP2*) são do tipo difusão facilitada, com moderada afinidade e baixa capacidade de transporte de glicose, além de uma baixa afinidade e alta capacidade de transporte de xilose.
2. O transportador *SpFRS1* de *Sp. passalidarum* se mostrou não funcional em *S. cerevisiae*. Já os transportadores *SaXUT1* e *SaRGT2* (*Sp. arborariae*), *SpXUT1* (*Sp. passalidarum*) e *MgGET1* (*M. guilliermondii*) restauram a capacidade de utilizar glicose em *S. cerevisiae*.
3. O transportador *SpXUT1* é um transportador do tipo difusão facilitada com moderada afinidade e baixa capacidade de transporte de glicose, e baixa afinidade e alta capacidade de transportar xilose.
4. As versões truncadas dos transportadores *SaXUT1* e *SpXUT1*, envolvendo a remoção de resíduos de lisina passíveis de ubiquitinação das porções N- ou C-terminais das proteínas, permitiram a fermentação de xilose por *S. cerevisiae*.
5. Os ensaios de co-transporte de H^+ com xilobiose e xilotriose, bem como as análises de modelagem e *docking* realizados com o transportador *AGTI* de *S. cerevisiae*, sugerem que esta permease possa ser um promissor transportador de xilo-oligossacarídeos.
6. Das várias enzimas identificadas e clonadas, a enzima *SpBGL2* de *Sp. passalidarum* apresentou significativa atividade β -glicosidase e β -xilosidase intracelular, quando expressa em *S. cerevisiae*.
7. Os transportadores *MgCBT2* e *CtCBT1* provenientes de *M. guilliermondii* e *C. tropicalis*, quando expressos em *S. cerevisiae* contendo a enzima *SpBGL2*, permitiram o consumo de celbiose, sendo que o transportador *MgCBT2* permitiu a fermentação eficiente deste açúcar, atingindo o rendimento máximo de etanol a partir desta fonte de carbono.

6 - REFERÊNCIAS

ABRAMSON, J., SMIRNOVA, I., KASHO, V., VERNER, G., KABACK, H. R., & IWATA, S. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. **Science**, v. 30, n. 5633, p. 610-615, 2003.

ADELSBERGER, H. Enzyme system of *Clostridium stercorarium* for hydrolysis of arabinoxylan: reconstitution of the in vivo system from recombinant enzymes. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2257–226, 2004.

ALBERTSON, N.H., NYSTROM, T., KJELLEBERG, S. Macromolecular synthesis during recovery of the marine *Vibrio* sp. S4 from starvation. **Microbiology**, v. 136, p. 2201–2207, 1990.

AUGUSTIN, J.-C., ROSSO, L., CARLIER, V. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 169–181, 2000a.

AUGUSTIN, J.C., BROUILLAUD-DELATTRE, A., ROSSO, L., CARLIER, V. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1706 – 1710, 2000b.

AUGUSTIN, J.C., CARLIER, V. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 29–51, 2000c.

AUESUKAREE, C., DAMNERNSAWAD, A., KRUATRACHUE, M., POKETHITIYOOK, P., BOONCHIRD, C., KANEKO, Y., & HARASHIMA, S. Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Genetics**, v. 50, n. 3, p. 301-310, 2009.

BADOTTI, F., DÁRIO, M. G., ALVES, S. L., CORDIOLI, M. L. A., MILETTI, L. C., DE ARAUJO, P. S., & STAMBUK, B. U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 4, 2008.

BAE, Y.H., KANG, K.H., JIN, Y.S., SEO, J.H. Molecular cloning and expression of fungal cellobiose transporters and β -glucosidases

conferring efficient cellobiose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 169, p. 34–41, 2014.

BALAGURUNATHAN, B., JONNALAGADDA, S., TAN, L., SRINIVASAN, R. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model for *Scheffersomyces stipitis*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p.27, 2012.

BALDWIN, S. A. (Ed.). *Membrane transport: a practical approach* (No. 230). **Oxford University Press**, USA, 2000.

BATCHELOR, S.E., COOPER, M., CHHABRA, S.R., GLOVER, L.A., STEWART, G.S.A.B., WILLIAMS, P., PROSSER, J.I. Cell densityregulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidising bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 2281– 2286, 1997.

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.

BELINCHÓN, M. M., & GANCEDO, J. M. Xylose and some non-sugar carbon sources cause catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, v. 180, n. 4, p. 293-297, 2003.

BERA, A. K., HO, N. W., KHAN, A., & SEDLAK, M. A genetic overhaul of *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) to improve xylose fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 617-626, 2011.

BETINA, S., GOFFRINI, P., FERRERO, I., WESOŁOWSKI-LOUVEL, M. RAG4 gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. **Genetics**, v. 158, p. 541–548, 2001

BIASINI, M., BIENERT, S., WATERHOUSE, A., ARNOLD, K., STUDER, G., SCHMIDT, T., KIEFER, F., CASSARINO, T. G., BERTONI, M., BORDOLI, L., AND SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, p. W252-W258, 2014.

BIELY, P., VRSANSKÁ, M., TENKANEN, M., KLUEPFEL, D. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n.1-3, p. 151–166, 1997.

BISSON, L. F., & FRAENKEL, D. G. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 6, p. 1730-1734, 1993a.

BISSON, L. F., & FRAENKEL, D. G. Transport of 6-deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of bacteriology**, v. 155, n.3, p. 995-1000, 1983b.

BOLES, E., & HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, n.1, p. 85-111, 1997.

BOURAOU, H., DESROUSSEAUX, M.-L., IOANNOU, E., ALVIRA, P., MANAI, M., REMOND, C., DUMON, C., FERNANDEZ-FUENTES, N., O'DONOHUE, M.J. The GH51 alpha-L-arabinofuranosidase from *Paenibacillus* sp. THS1 is multifunctional, hydrolyzing main-chain and side-chain glycosidic bonds in heteroxylans. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n.1, p. 140, 2016.

BOHLIN, C., PRAESTGAARD, E., BAUMANN, M. J., BORCH, K., PRAESTGAARD, J., MONRAD, R. N., & WESTH, P. A comparative study of hydrolysis and transglycosylation activities of fungal β -glucosidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n.1, p. 159-169, 2013.

BOUGUYON, E., PERRINE-WALKER, F., PERVENT, M., ROCHETTE, J., CUESTA, C., BENKOVA, E., & NACRY, P. Nitrate controls root development through posttranscriptional regulation of the NRT1.1/NPF6.3 transporter/sensor. **Plant Physiology**, v. 172, n. 2, p. 1237-1248, 2016.

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

BRÉAND, S., FARDEL, G., FLANDROIS, J. P., ROSSO, L., & TOMASSONE, R. A model describing the relationship between

regrowth lag time and mild temperature increase for *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 251-261, 1999.

BROWN, V., SEXTON, J. A., & JOHNSTON, M. A glucose sensor in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n.10, p. 1726-1737, 2006.

BUTLER, G., RASMUSSEN, M. D., LIN, M. F., SANTOS, M. A., SAKTHIKUMAR, S., MUNRO, C. A., RHEINBAY, E., GRABHERR, M., FORCHE, A., REEDY, J.L., AGRAFIOTI, I., ARNAUD, M. B., BATES, S., BROWN, A. J. P., BRUNKE, S., COSTANZO, M. C., FITZPATRICK, D. A., GROOT, P. W. J., HARRIS, D., HOYER, L. L., HUBE, B., KLIS, F. M., KODIRA, C., LENNARD, N., LOGUE, M. E., MARTIN, R., NEIMAN, A. M., NIKOLAOU, E., QUAIL, QUINN, J., SANTOS, M. C., M. A., SCHMITZBERGER, F. F., SHERLOCK, G., SHAH, P., SILVERSTEIN, K. A. T., SKRZYPEK, M. S., SOLL, D., STAGGS, R., STANSFIELD, I., STUMPF, M. P. H., SUDBERY, P. E., SRIKANTHA, T., ZENG, Q., BERMAN, J., BERRIMAN, M., HEITMAN, J., GOW, N. A. R., LORENZ, M. C., BIRREN, B. W., KELLIS, M. & CUOMO, C. A. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 657-662, 2009.

CADETE, R. M., ALEJANDRO, M., SANDSTRÖM, A. G., FERREIRA, C., GÍRIO, F., GORWA-GRAUSLUND, M. F., FONSECA, C. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1. 2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 167, 2016.

CADETE, R. M., MELO, M. A., ZILLI, J. E., VITAL, M. J., MOURO, A., PROMPT, A. H., ROSA, C. A. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel D-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 2, p. 421-431, 2013.

CADETE, R. M., MELO, M. A., DUSSAN, K. J., RODRIGUES, R. C., SILVA, S. S., ZILLI, J. E., ROSA, C. A. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian forest. **PLoS One**, v.7, n. 8, p. 43135, 2012.

CADETE, R. M., SANTOS, R. O., MELO, M. A., MOURO, A., GONÇALVES, D. L., STAMBUK, B. U., ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 8, p. 1338-1342, 2009.

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

CAPRIOTTI, A., & RAINIERI, L. Yeasts in greenhouse environment. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 48, n. 4, p. 325-331, 1964.

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

Carroll, A., Somerville, C. Cellulosic biofuels. **Annu Rev Plant Biol** v. 60, p. 165–182, 2009.

CHAPTAL, V., KWON, S., SAWAYA, M. R., GUAN, L., KABACK, H. R., ABRAMSON, J. Crystal structure of lactose permease in complex with an affinity inactivator yields unique insight into sugar recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 23, p. 9361-9366, 2011.

CHAUVE, M., MATHIS, H., HUC, D., CASANAVE, D., MONOT, F., FERREIRA, N. L. Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 3, 2010.

CHRISTAKOPOULOS, P., BHAT, M. K., KEKOS, D., MACRIS, B. J. Enzymatic synthesis of trisaccharides and alkyl β -D-glucosides by the transglycosylation reaction of β -glucosidase from *Fusarium oxysporum*. **International journal of biological macromolecules**, v.16, n. 6, p. 331-334, 1994.

CHUNDAWAT, S. P., BECKHAM, G. T., HIMMEL, M. E., DALE, B. E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 121-145, 2011.

COLABARDINI, A.C., RIES, L.N.A., BROWN, N.A., DOS REIS, T.F., SAVOLDI, M., GOLDMAN, M.H.S., MENINO, J.F., RODRIGUES, F., GOLDMAN, G.H. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1, 2014.

COLLINS, T., GERDAY, C., FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, 2005.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento -Levantamentos de Safra: cana-de-açúcar. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Brasília: CONAB. Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso em: 27 set. 2017.

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

CRABTREE, H. G. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. **Biochemical Journal**, v. 23, n. 3, p. 536, 1929.

DA CUNHA-PEREIRA, F., HICKERT, L. R., SEHNEM, N. T., DE SOUZA-CRUZ, P. B., ROSA, C. A., AYUB, M. A. Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4218-4225, 2011.

DANG, C. C., LE, Q. S., GASCUEL, O., LE, V. S. FLU, an amino acid substitution model for influenza proteins. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2010.

DASHTBAN, M., MAKI, M., LEUNG, K.T., MAO, C., QIN, W. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Crit. Rev. Biotechnol.** V. 30, p. 302–309, 2010.

DASHTBAN, M., SCHRAFT, H., & QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues, opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578, 2009.

DE ARAUJO, F. V., SOARES, C. A. G., HAGLER, A. N., MENDONÇA-HAGLER, L. C. Ascomycetous yeast communities of

marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangrove ecosystem. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 68, n. 2, p. 91-99, 1995.

DE SALES, B. B., SCHEID, B., GONÇALVES, D. L., KNYCHALA, M. M., MATSUSHIKA, A., BON, E. P., STAMBUK, B. U. Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing D-xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 10, p. 1973-1982, 2015.

DE SALES, B. B. **Clonagem e expressão heteróloga de transportadores de xilose em linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante**. Tese (Doutorado em Bioquímica), Florianópolis - SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

DE SOUZA, W. R. Microbial degradation of lignocellulosic biomass. In *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization*. InTech. 2013.

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, n. 25, p.193-199, 1990.

DEREEPER, A., GUIGNON, V., BLANC, G., AUDIC, S., BUFFET, S., CHEVENET, F., CLAVERIE, J. M. Phylogeny. fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n.suppl_2, p. W465-W469, 2008.

DIRIYE, F. U., GIANANTE, C., SCORZETTI, G., ZILLI, R. Indagine preliminare sulla ecologia dei lieviti delle acque del litorale Abruzzese. **Ann Fac Agr Perugia**, v. 45, p. 339-345, 1993.

DITTY, J. L., & HARWOOD, C. S. Charged amino acids conserved in the aromatic acid/H⁺ symporter family of permeases are required for 4-hydroxybenzoate transport by PcaK from *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v.184, n. 5, p. 1444-1448, 2002.

DLUGAI, S., HIPPLER, S., WIECZORKE, R., BOLES, E. Glucose-dependent and-independent signalling functions of the yeast glucose sensor Snf3. **FEBS letters**, v. 505, n. (3), p. 389-392, 2001.

DOS SANTOS, L. V., CARAZZOLLE, M. F., NAGAMATSU, S. T., SAMPAIO, N. M. V., ALMEIDA, L. D., PIROLA, R. A. S., PEREIRA, G. A. G. Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Scientific Reports**, v. 6, p. 38676, 2016.

DU, J., YUAN, Y., SI, T., LIAN, J., ZHAO, H. Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 18, p. 142-142, 2012.

DU, J., LI, S., & ZHAO, H. Discovery and characterization of novel d-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 11, p. 2150-2156, 2010.

DU PREEZ, J. C., DE KOCK, S. H., KILIAN, S. G., & LITTHAUER, D. The relationship between transport kinetics and glucose uptake by *Saccharomyces cerevisiae* in aerobic chemostat cultures. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, n. 4, p. 379-388, 2000.

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

DUFFY, L.L., VANDERLINE, P.B., GRAU, F.H.,. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed meats: effect of pH, a , nitrite and ascorbate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 377–390, 1994.

DUH, Y. H., SCHAFFNER, D.W. Modelling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 205– 210, 1993.

DUJON, B., SHERMAN, D., FISCHER, G., DURRENS, P., CASAREGOLA, S., LAFONTAINE, I., GOFFARD, N. Genome evolution in yeasts. **Nature**, v. 430, n. 6995, p. 35-44, 2004.

ELBING, K., LARSSON, C., BILL, R. M., ALBERS, E., SNOEP, J. L., BOLES, E., HOHMANN, S., GUSTAFSSON, L. Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*.

Applied and Environmental Microbiology, v. 70, n. 9, p. 5323-5330, 2004

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

ERIKSEN, D. T., HSIEH, P. C. H., LYNN, P., ZHAO, H. Directed evolution of a cellobiose utilization pathway in *Saccharomyces cerevisiae* by simultaneously engineering multiple proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

FARWICK, A., BRUDER, S., SCHADEWEG, V., OREB, M., BOLES, E. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 14, p. 5159-5164, 2014.

FAULON, J. L., CARLSON, G. A., HATCHER, P. G. A three-dimensional model for lignocellulose from gymnospermous wood. **Organic geochemistry**, v. 21, n.12, p. 1169-1179, 1994.

FERREIRA, D., NOBRE, A., SILVA, M. L., FARIA-OLIVEIRA, F., TULHA, J., FERREIRA, C., LUCAS, C. XYLH encodes a xylose/H⁺ symporter from the highly related yeast species *Debaryomyces fabryi* and *Debaryomyces hansenii*. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 7, p.585-596, 2013.

FINLEY, D., ULRICH, H. D., SOMMER, T., KAISER, P. The ubiquitin–proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 19, n.12, p. 319-360, 2012.

FINN, R. D., MISTRY, J., SCHUSTER-BÖCKLER, B., GRIFFITHS-JONES, S., HOLLICH, V., LASSMANN, T., EDDY, S. R. Pfam: clans, web tools and services. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. (suppl_1), p. D247-D251, 2006.

FREER, S. N., & GREENE, R. VTransport of glucose and cellobiose by *Candida wickerhamii* and *Clavispora lusitaniae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n.(22), p. 12864-12868, 1990.

FUJII, T., YU, G., MATSUSHIKA, A., KURITA, A., YANO, S., MURAKAMI, K., & SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylo-oligosaccharides by xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* expressing β -xylosidase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. (6), p. 1140-1146, 2011.

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.

GADURA, N., ROBINSON, L. C., & MICHELS, C. A. Glc7-Reg1 phosphatase signals to Yck1, 2 casein kinase 1 to regulate transport activity and glucose-induced inactivation of *Saccharomyces maltose* permease. **Genetics**, v. 172, n. (3), p. 1427-1439, 2006.

GALAN, J. M., & HAGUENAUER-TSAPIS, R. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. **The EMBO Journal**, v. 16, n. (19), p. 5847-5854, 1997.

GALAZKA, J. M., TIAN, C., BEESON, W. T., MARTINEZ, B., GLASS, N. L., CATE, J. H. Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. **Science**, v. 330, n. (6000), p. 84-86, 2010.

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

GANCEDO, J. M. The early steps of glucose signalling in yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. (4), p. 673-704, 2008.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. (2), p. 334-361, 1998.

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., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MARQUES, S., BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. (13), p. 4775-4800, 2010.

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

GOLDEMBERG, J. The ethanol program in Brazil. **Environmental Research Letters**. v.1, 2006.

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

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

GROSDIDIER, A., ZOETE, V. & MICHIELIN, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. W270-W277, 2011.

GUO, D., DAI, M. I., ZHOU, Z. P., Molecular identification and morphological analysis of yeast in spoiled orange juice. **Food Science**, v. 33, n.(9) p.131–137, 2012.

GUPTA, A. & VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.

HA, S.J., GALAZKA, J.M., OH JOONG, E., KORDIC', V., KIM, H., JIN, Y.S., CATE, J.H.D. Energetic benefits and rapid cellobiose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing cellobiose phosphorylase and mutant cellodextrintransporters. **Metabolic Engineering**, v. 15, p. 134–143, 2012.

HA, S. J., KIM, H., LIN, Y., JANG, M. U., GALAZKA, J. M., KIM, T. J., CATE, J. H. D., JIN, Y. S. Single amino acid substitutions in HXT2. 4

from Scheffersomyces stipitis lead to improved cellobiose fermentation by engineered Saccharomyces cerevisiae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. (5), p. 1500-1507, 2013b.

HA, S. J., GALAZKA, J. M., KIM, S. R., CHOI, J. H., YANG, X., SEO, J. H., JIN, Y. S. Engineered Saccharomyces cerevisiae capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. (2), p.504-509, 2011.

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, n. (5), p. 937-953, 2007.

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

HAHN-HÄGERDAL, B., JEPPSSON, H., SKOOG, K., PRIOR, B. ABiochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. (11), p.933-943, 1994.

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, n. (9), p. 2783-2788, 2002.

HAN, E. K., COTTY, F., SOTTAS, C., JIANG, H., MICHELS, C. A. Characterization of AGT1 encoding a general α -glucoside transporter from Saccharomyces. **Molecular Microbiology**, v. 17, n. (6), p. 1093-1107, 1995.

HARVEY, A. J., HRMOVA, M., DE GORI, R., VARGHESE, J. N., FINCHER, G. B. Comparative modeling of the three-dimensional structures of family 3 glycoside hydrolases. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 41, n. (2), p. 257-269, 2000.

HASUNUMA, T., & KONDO, A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. (6), p. 1207-1218, 2012.

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

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

HENRISSAT, B., DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 7, p. 637–644, 1997.

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, n. (5), p. 1852-1859, 1998.

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

HORÁK, J. Regulations of sugar transporters: insights from yeast. **Current Genetics**, v.59, n. (1-2), p. 1-31, 2013.

HORAK, J., AND D.H. WOLF. Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole. **Journal Bacteriol.**, v. 179, p.1541–1549, 1997.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 94, n. (1), p. 205-214, 2012.

HU, Z., NEHLIN, J. O., RONNE, H., & MICHELS, C. A. MG1-dependent and MG1-independent glucose regulation of MAL gene

expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current genetics**, v.28,n. (3), p. 258-266, 1995.

JEFFRIES T. W., WILLIS, L.B., LONG, T.M., SU Y-K, inventores, Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison, Wi (US), U.S. Department of Agriculture. Washington, DC (US). Co-fermentation of glucose, xylose and celobiose by yeast. **United States Patente US 8,530,211 B2**. 2013 Set 10.

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

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

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current opinion in biotechnology**, v. 17,n.(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,n.(5), p. 495-509, 2004.

JEFFRIES, T. W. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. **Biotechnol Lett.**, v. 3, p. 213–218, 1981.

R. JIANG, & M. CARLSON, Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1protein kinase complex, **Genes Dev.**, v.10, p.3105–3115, 1996.

JIANG, Z. Q., DENG, W., ZHU, Y. P., LI, L. T., SHENG, Y. J., HAYASHI, K. The recombinant xylanase B of *Thermotoga maritima* is highly xylan specific and produces exclusively xylobiose from xylans, a unique character for industrial applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, n. (4), p. 207-213, 2004.

JIMENEZ, E., T., DORADO, M. P., & KEGL, B. Experimental investigation on injection characteristics of bioethanol–diesel fuel and bioethanol–biodiesel blends. *Fuel*, v. 90, n. (5), 1968-1979, 2011.

JOHANSSON, B. & HAHN-HÄGERDAL, B. The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001. *FEMS Yeast Res.*, v. 2002, n. 2, p. 277–82, 2011.

JOHNSTON, M. & KIM, J. H. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, 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, n. (3), p. 471-480, 2010.

JOUANDOT, D., ROY, A., & KIM, J. H. Functional dissection of the glucose signaling pathways that regulate the yeast glucose transporter gene (HXT) repressor RGT1. *Journal of cellular biochemistry*, v. 112, n. (11), p. 3268-3275, 2011.

JOY, J., JOSE, C., MATHEW, P. L., THOMAS, S., KHALAF, M.N. Biological delignification of biomass. In: Khalaf, M.N. (ed.) **Green Polymers and Environmental Pollution Control**, p. 271. CRC Press, Boca Raton, 2016.

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

KÄLL, L., KROGH, A., & SONNHAMMER, E. L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of molecular biology*, v. 338, n. (5), p. 1027-1036, 2004.

KANIAK, A., XUE, Z., MACCOOL, D., KIM, J. H., & JOHNSTON, M. Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, v. 3, n. (1), p. 221-231, 2004.

KAPLAN, J. G. An Inducible System for the Hydrolysis and Transport of β -Glucosides in Yeast I. Characteristics of the β -glucosidase activity of intact and of lysed cells. **The Journal of general physiology**, v. 48, n.(5), p. 873-886, 1965.

KARHUMAA, K., SANCHEZ, R. G., HAHN-HÄGERDAL, B., & GORWA-GRAUSLUND, M. F. Comparison of the xylose reductase-xylytol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. (1), p. 5, 2007.

KARHUMAA, K., HAHN-HÄGERDAL, B., & GORWA-GRAUSLUND, M. F. Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering. **Yeast**, v. 22, n. (5), p. 359-368, 2005.

KASAHARA, T., & KASAHARA, M. Identification of a key residue determining substrate affinity in the yeast glucose transporter Hxt7 a two-dimensional comprehensive study. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. (34), p. 26263-26268, 2010.

KASAHARA, T., SHIMOGAWARA, K., KASAHARA, M., Crucial effects of amino acid side chain length in transmembrane segment 5 on substrate affinity in yeast glucose transporter Hxt7. **Biochemistry.**, v. 50, p. 8674-8681, 2011.

KIM, J. H., ROY, A., JOUANDOT, D., & CHO, K. H. The glucose signaling network in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. (11), p. 5204-5210, 2013.

KIM, J. H. DNA-binding properties of the yeast RGT1 repressor. **Biochimie**, v. 91, n. (2), p. 300-303, 2009.

KIM, J. H., & JOHNSTON, M. Two glucose-sensing pathways converge on RGT1 to regulate expression of glucose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. (36), p. 26144-26149, 2006.

KIM, J. H., POLISH, J., & JOHNSTON, M. Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor

RGT1. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. (15), p. 5208-5216, 2003.

KIM, S. R., XU, H., LESMANA, A., KUZMANOVIC, U., AU, M., FLORENCIA, C., JIN, Y. S. Deletion of PHO13, encoding haloacid dehalogenase type IIA phosphatase, results in upregulation of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. (5), p. 1601-1609, 2015.

KIM, J., & MICHELS, C. A. The MAL63 gene of *Saccharomyces* encodes a cysteine-zinc finger protein. **Current genetics**, v. 14, n.(4), p. 319-323, 1988.

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, n. (2), p. 57048, 2013.

KIMBERLY, A.A., KIRSTY, A.S., JOSÉ, M.L., LING, L., JENNIFER, R.H., ALEX, H.H., STEPHEN, P., Co-fermentation of xylose and cellobiose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 39, p. 1597–1604, 2012.

KNØCHEL, S., GOULD, G., Preservation microbiology and safety: Quo vadis? **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 127–131, 1995.

KNOSHAUG, E. P., & ZHANG, M. Butanol tolerance in a selection of microorganisms. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 153, n. (1-3), p. 13-20, 2009.

KOBAYASHI, O., HAYASHI, N., KUROKI, R. AND SONE, H. Region of FLO1 proteins responsible for sugar recognition. **Journal of bacteriology**, v.. 180, p. 6503–6510, 1998.

KÖTTER, P., & CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 38, n.(6), p. 776-783, 1993.

KÖTTER, P., AMORE, R., HOLLENBERG, C. P., CIRIACY, M. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylytol dehydrogenase gene, *XYL2*, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. **Current genetics**, v. 18, n. (6), p. 493-500, 1990.

KOTYK, A. How to name various transport mechanisms and their vehicles. **Biochemical Education**, v. 25, n. (2), p. 86-87, 1997.

KOTYK, A. Properties of the sugar carrier in baker's yeast. **Folia microbiologica**, v. 10, n. (1), p. 30-35, 1965.

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

KULKARNI, N., SHENDYE, A., RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 23, n. (4), p. 411-456, 1999.

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

KUYPER, M., TOIRKENS, M. J., DIDERICH, J. A., WINKLER, A. A., VAN DIJKEN, J. P., PRONK, J. T. A. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS yeast research**, v. 5, n. (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, n. (4-5), p. 399-409, 2005b.

KUYPER, M., HARHANGI, H. R., STAVE, A. K., WINKLER, A. A., JETTEN, M. S., DE LAAT, W. T., ... & 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, n. (1), p. 69-78, 2003.

KWAK, S., & JIN, Y. S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. **Microbial cell factories**, v. 16, n. (1), p. 82, 2017.

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology reviews**, v. 10, n. (3-4), p. 229-242, 1993.

LAGUNAS, R. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 2, n. (4), p. 221-228, 1986.

LAGUNAS, R. Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 27, n. (3), p. 139-146, 1979.

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

LAW, C. J., MALONEY, P. C., & WANG, D. N. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. **Annual review of microbiology**, v. 62, p. 289, 2009.

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

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

LEE, S. H., KODAKI, T., PARK, Y. C., & SEO, J. H. Effects of NADH-preferring xylose reductase expression on ethanol production from xylose in xylose-metabolizing recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of biotechnology**, v. 158, n. (4), p. 184-191, 2012.

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

LEE, S. M., JELLISON, T., & ALPER, H. S. Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. (1), p. 122, 2014.

LEE, S. M., JELLISON, T., & ALPER, H. S. Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. (16), p. 5708-5716, 2012.

LEE, R. C., HRMOVA, M., BURTON, R. A., LAHNSTEIN, J., FINCHER, G. B. Bifunctional Family 3 Glycoside Hydrolases from Barley with α -l-Arabinofuranosidase and β -d-Xylosidase Activity characterization, primary structures, and cooh-terminal processing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. (7), p. 5377-5387, 2003.

LEE, W. H., & JIN, Y. S. Improved ethanol production by engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a mutated cellobiose transporter during simultaneous saccharification and fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 245, p. 1-8, 2017.

LÉON, S., & HAGUENAUER-TSAPIS, R. Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. **Experimental cell research**, v. 315, n. (9), p. 1574-1583, 2009.

LIAB, K., AZADI, P., COLLINS, R., TOLAN, J., KIM, J. S., ERIKSSON, K. E. L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. (1), p. 89-94, 2000.

LI, X., PARK, A., ESTRELA, R., KIM, S. R., JIN, Y. S., CATE, J. H. Comparison of xylose fermentation by two high-desempenho engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 53-56, 2016.

Li, X., Yu, V. Y., Lin, Y., Chomvong, K., Estrela, R., Park, A., Jin, Y. S. Expanding xylose metabolism in yeast for plant cell wall conversion to biofuels. **Elife**, v. 4, e05896, 2015.

LIN, C. H., MACGURN, J. A., CHU, T., STEFAN, C. J., EMR, S. D. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. **Cell**, v. 135, n. (4), p. 714-725, 2008.

LIU, S., ABRAHAMSON, L. P., & SCOTT, G. M. Biorefinery: Ensuring biomass as a sustainable renewable source of chemicals, materials, and energy. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 1-4, 2012.

LOBO, F. P.; GONÇALVES, D. L.; ALVES-JR, S. L.; GERBER, A. L.; VASCONCELOS, A. T. R.; BASSO, L. C.; FRANCO, G. R.; SOARES, M. A.; CADETE, R. M.; ROSA, C. A.; STAMBUK, B. U. Draft genome sequence of the D-xylose-fermenting yeast *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1AT. **Genome Announc.**, v. 2e01163-13, 2014.

LOMBARD, V., GOLACONDA RAMULU, H., DRULA, E., COUTINHO, P. M., HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic acids research**, v. 42, n. (D1), p. D490-D495, 2013.

LONG, T. M., SU, Y. K., HEADMAN, J., HIGBEE, A., WILLIS, L. B., JEFFRIES, T. W. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. (16), p. 5492-5500, 2012.

LOVELL, S. C., DAVIS, I. W., ARENDALL, W. B., DE BAKKER, P. I., WORD, J. M., PRISANT, M. G., RICHARDSON, J. S. AND RICHARDSON, D. C. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. **Proteins**, v. 50, p. 437-450, 2003.

LUDIN, K., JIANG, R., & CARLSON, M. Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the SNF1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. (11), p. 6245-6250, 1998.

LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H., PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, n. (3), p. 506-577, 2002.

MACDONALD, S. S., BLAUKOPF, M., & WITHERS, S. G. N-acetylglucosaminidases from CAZy family GH3 are really glycoside phosphorylases, thereby explaining their use of histidine as an acid/base catalyst in place of glutamic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. (8), p. 4887-4895, 2015.

MACKEY, B.M., DERRICK, C.M. Conductance measurements of the lag phase of injured *Salmonella typhimurium*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 57, p. 299–308, 1984.

MADEJ, M. G., DANG, S., YAN, N., KABACK, H. R. Evolutionary mix-and-match with MFS transporters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n.(15), p. 5870-5874, 2013.

MADHAVAN, A., TAMALAMPUDI, S., USHIDA, K., KANAI, D., KATAHIRA, S., SRIVASTAVA, A., 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, n. (6), p. 1067, 2009.

MAKI, M., LEUNG, K. T., QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International journal of biological sciences**, v. 5, n. (5), p. 500, 2009.

MARTIN-GALIANO, A. J., & FRISHMAN, D. Defining the fold space of membrane proteins: the CAMPS database. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 64, n. (4), p. 906-922, 2006.

MARTINI, C., TAU-K-TORNISIELO, S. M., CODATO, C. B., BASTOS, R. G., CECCATO-ANTONINI, S. R. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. (5), p. 1-9, 2016.

MATOS, I. T. S. R., CASSA-BARBOSA, L. A., GALVÃO, R. D. S. M., NUNES-SILVA, C. G., ASTOLFI FILHO, S. Isolation, taxonomic identification and investigation of the biotechnological potential of wild-type *Meyerozyma guilliermondii* associated with amazonian termites

able to ferment D-xylose= Isolamento, identificação taxonômica e investigação. **Bioscience Journal**, v.30, n.(1), 2014

MATSUHIKA, A., SAWAYAMA, S. Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* requires high activity of xylose reductase and moderate xylulokinase activity. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 106, p. 306-309, 2008.

MATSUSHIKA, A., WATANABE, S., KODAKI, T., MAKINO, K., INOUE, H., MURAKAMI, K., SAWAYAMA, S. Expression of protein engineered NADP⁺-dependent xylitol dehydrogenase increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, n. (2), p. 243-255, 2008.

MAYER, C., VOCADLO, D. J., MAH, M., RUPITZ, K., STOLL, D., WARREN, R. A. J., WITHERS, S. G. Characterization of a β -N-acetylhexosaminidase and a β -N-acetylglucosaminidase/ β -glucosidase from *Cellulomonas fimi*. **The FEBS journal**, v. 273, n. (13), p.2929-2941, 2006.

MCBRIDE, J. E., ZIETSMAN, J. J., VAN ZYL, W. H., & LYND, L. R. Utilization of cellobiose by recombinant β -glucosidase-expressing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evaluation of the sufficiency of expression. **Enzyme and microbial technology**, v. 37, n. (1), p. 93-101, 2005.

MCCLELLAN, C. J., & BISSON, L. F. Glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* grown under anaerobic conditions: effect of null mutations in the hexokinase and glucokinase structural genes. **Journal of bacteriology**, v. 170, n.(11), p. 5396-5400, 1988.

MCKELLAR, R.C., LU, X., KNIGHT, K.P. Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology** v. 73, n. (2), p. 127 – 135, 2002.

MCMEEKIN, T., OLLEY, J., RATKOWSKY, D., CORKREY, R., ROSS, T. Predictive microbiology theory and application: Is it all about rates?. **Food Control**, v.29, n. (2), p. 290-299, 2013.

MEDINTZ, I., H. JIANG, E.K. HAN, W. CUI, AND C.A. MICHELS. Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 2245–2254, 1996.

MICHELS, C. A., & NEEDLEMAN, R. B. The dispersed, repeated family of MAL loci in *Saccharomyces* spp. **Journal of Bacteriology**, v. 157, n. (3), p. 949-952, 1984.

MILANEZ, A. Y., NYKO, D., VALENTE, M. S., SOUSA, L. C., BONOMI, A. M. F. L. J., JESUS, C. D. F. D., JUNQUEIRA, T. L. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar: uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **BNDES Setorial, Rio de Janeiro**, n. (41), 2015.

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

MORIYA, H., & JOHNSTON, M. Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the RGT2 glucose sensor and casein kinase I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n.(6), p. 1572-1577, 2004.

MUKAMOLOVA, G. V., KAPRELYANTS, A. S., YOUNG, D. I., YOUNG, M., & KELL, D. B. A bacterial cytokine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n (15), p.8916-8921, 1998.

MUSSATTO, S. I (Ed.). **Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery**. Elsevier, 2016.

NAN, H., SEO, S. O., OH, E. J., SEO, J. H., CATE, J. H., JIN, Y. S. 2, 3-Butanediol production from celobiose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. (12), p. 5757-5764, 2014.

NAVIGANT RESEARCH (2014) Biofuels demand for road transportation will surpass 51 billion gallons annually by 2022. Available at: <https://www.navigantresearch.com/newsroom/ biofuels->

demand-for-road-transportation-will-surpass-51-billion-gallons-annually-by-2022.

NEEDLEMAN, R. Control of maltase synthesis in yeast. **Molecular microbiology**, v. 5, n. (9), p. 2079-2084, 1991.

NEIGEBORN, L. E. N. O. R. E., SCHWARTZBERG, P. A. M. E. L. A., REID, R. O. B. E. R. T., CARLSON, M. A. R. I. A. N. Null mutations in the SNF3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* cause a different phenotype than do previously isolated missense mutations. **Molecular and cellular biology**, v. 6, n. (11), p. 3569-3574, 1986.

NGUYEN, Q., BOWYER, J., HOWE, J., BRATKOVICH, S., GROOT, H., PEPKE, E., FERNHOLZ, K. Global production of second generation biofuels: trends and influences, 2017. www.dovetailinc.org/report_pdfs/2017/dovetailbiofuels0117.pdf.

NGUYEN, N. H., SUH, S. O., MARSHALL, C. J., BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological research**, v. 110, n.(10), p. 1232-1241, 2006.

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, n. (7), p. 2061-2066, 2007.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. (1), p. 17-27, 2001.

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

NIJLAND, J. G., VOS, E., SHIN, H. Y., WAAL, P. P., KLAASSEN, P., DRIESSEN, A. J. Improving pentose fermentation by preventing

ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. (1), p. 158, 2016.

NIJLAND, J. G., SHIN, H. Y., DE JONG, R. M., DE WAAL, P. P., KLAASSEN, P., DRIESSEN, A. J. Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n.(1), p.168, 2014.

NIKKO, E., & PELHAM, H. R. Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. **Traffic**, v. 10, n. (12), p. 1856-1867, 2009.

NIKKO, E., SULLIVAN, J. A., PELHAM, H. R. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. **EMBO reports**, v. 9, n. (12), p. 1216-1221, 2008.

NOVAK, D. R., BOSART, L. F., KEYSER, D., WALDSTREICHER, J. S. An observational study of cold season-banded precipitation in northeast US cyclones. **Weather and forecasting**, v. 19, n.(6), p. 993-1010, 2004.

O'DONNELL, A. F., MCCARTNEY, R. R., CHANDRASHEKARAPPA, D. G., ZHANG, B. B., THORNER, J., SCHMIDT, M. C. 2-Deoxyglucose impairs *Saccharomyces cerevisiae* growth by stimulating SNF1-regulated and α -arrestin-mediated trafficking of hexose transporters 1 and 3. **Molecular and cellular biology**, v. 35, n. (6), p. 939-955, 2015.

OJEDA, K., ÁVILA, O., SUÁREZ, J., KAFAROV, V. Evaluation of technological alternatives for process integration of sugarcane bagasse for sustainable biofuels production—Part 1. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. (3), p. 270-279, 2011.

OZCAN, S., & JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. (3), p. 554-569, 1999.

OZCAN, S., DOVER, J., & JOHNSTON, M. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 17, n. (9), p. 2566-2573, 1998.

OZCAN, S., LEONG, T., & JOHNSTON, M. RGT1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. **Molecular and cellular biology**, v. 16, n. (11), p. 6419-6426, 1996.

OZCAN, S., DOVER, J., ROSENWALD, A. G., WÖLFL, S., JOHNSTON, M. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. (22), p. 12428-12432, 1996b.

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, n. (5), p. 508-517, 2011.

PARK, C., CHOI, Y., KIM, C., OH, S., LIM, G., MORIYOSHI, Y. Desempenho and exhaust emission characteristics of a spark ignition engine using ethanol and ethanol-reformed gas. **Fuel**, v. 89, n.(8), p. 2118-2125, 2010.

PASCUAL, C., ROBINSON, T.P., OCIO, M.J., ABOABA, O.O., MACKAY, B.M. The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 357 – 361, 2001.

PASULA, S., CHAKRABORTY, S., CHOI, J. H., KIM, J. H. Role of casein kinase 1 in the glucose sensor-mediated signaling pathway in yeast. **BMC cell biology**, v. 11, n. (1), p. 17, 2010.

PÉREZ, J., MUÑOZ-DORADO, J., DE LA RUBIA, T., MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**. v. 5, p.53–63, 2002.

PESSOA-JR, A., ROBERTO, I. C., MENOSSI, M., DOS SANTOS, R. R., ORTEGA FILHO, S., PENNA, T. C. V. Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 121, n. (1-3), p. 59-70, 2005.

PIROVANO, W., & HERINGA, J. Protein secondary structure prediction. **Data Mining Techniques for the Life Sciences**, p. 327-348, 2010.

PIROVANO, W., FEENSTRA, K. A., & HERINGA, J. PRALINETM: a strategy for improved multiple alignment of transmembrane proteins. **Bioinformatics**, v. 24, n.(4), p. 492-497, 2008.

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

PUTRO, J. N., SOETAREDJO, F. E., LIN, S. Y., JU, Y. H., ISMADJI, S. Pretreatment and conversion of lignocellulose biomass into valuable chemicals. **RSC Advances**, v. 6, n. (52), p. 46834-46852, 2016.

Qian, Y., Yomano, L. P., Preston, J. F., Aldrich, H. C., Ingram, L. O. Cloning, characterization, and functional expression of the *Klebsiella oxytoca* xylodextrin utilization operon (*xynTB*) in *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. (10), p. 5957-5967, 2003.

RABELO, S. C., CARRERE, H., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 102, n. (17), p. 7887-7895, 2011.

RABELO, S. C., CARRERE, H., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 102, n. (17), p. 7887-7895, 2011.

RADIOVJAC, P., VACIC, V., HAYNES, C., COCKLIN, R. R., MOHAN, A., HEYEN, J. W., GOEBL, M. G., AND IAKOUCHEVA, L. M. Identification, Analysis and Prediction of Protein Ubiquitination Sites. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 78, n. (2), p. 365-380, 2010.

RAGAUSKAS, A. J., WILLIAMS, C. K., DAVISON, B. H., BRITOVSEK, G., CAIRNEY, J., ECKERT, C. A., MIELENZ, J. R.

THE PATH FORWARD FOR BIOFUELS AND BIOMATERIALS. **Science**, v. 311, n. (5760), p. 484-489, 2006.

RAO, R. S., JYOTHI, C. P., PRAKASHAM, R. S., SARMA, P. N., RAO, L. V. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. (15), p. 1974-1978, 2006.

RAO, R. S., PRAKASHAM, R. S., PRASAD, K. K., RAJESHAM, S. S. P. N., SARMA, P. N., RAO, L. V. Xylitol production by *Candida* sp.: parameter optimization using Taguchi approach. **Process Biochemistry**, v. 39, n. (8), p. 951-956, 2004.

REDDY, V. S., SHLYKOV, M. A., CASTILLO, R., SUN, E. I., SAIER, M. H. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. **FEBS Journal**, v. 279, n. (11), p. 2022-2035, 2012.

REIFENBERGER, E., BOLES, E., CIRIACY, M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **The FEBS Journal**, v. 245, n. (2), p. 324-333, 1997.

REIFENBERGER, E., FREIDEL, K., & CIRIACY, M. Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. **Molecular Microbiology**, v. 16, n. (1), p. 157-167, 1995.

REIS, T. F., LIMA, P. B. A., PARACHIN, N. S., MINGOSSI, F. B., OLIVEIRA, J. V. C., RIES, L. N. A., GOLDMAN, G. H. Identification and characterization of putative xylose and cellobiose transporters in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology for Biofuels**, v.9, n. (1), p. 204, 2016.

RFA – Renewable Fuels Association. Statistics, World Fuel Ethanol Production. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099103927-61e598f7-7643>. Acesso em: 27 set 2017.

RIGDEN, D. J., MELLO, L. V. AND GALPERIN, M. Y. The PA14 domain, a conserved all- β domain in bacterial toxins, enzymes, adhesins and signaling molecules. **Trends Biochem. Sci.** v. 29, p. 335–339, 2004.

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

ROBINSON, T. P., ABOABA, O. O., KALOTI, A., OCIO, M. J., BARANYI, J., MACKEY, B. M. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. **International journal of food microbiology**, v. 70, n. (1), p. 163-173, 2001.

ROLLAND, F., WINDERICKX, J., & THEVELEIN, J. M. Glucose-sensing and-signalling mechanisms in yeast. **FEMS yeast research**, v. 2, n. (2), p. 183-201, 2002.

ROLLAND, F., WINDERICKX, J., & THEVELEIN, J. M. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. **Trends in biochemical sciences**, v. 26, n. (5), p. 310-317, 2001.

ROY, A., KIM, Y. B., CHO, K. H., KIM, J. H. Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter Hxt1. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. (9), p. 2878-2885, 2014.

A. ROY, Y.J. SHIN, K.H. CHO, J.H. Kim, MTH1 regulates the interaction between the RGT1 repressor and the Ssn6-Tup1 corepressor complex by modulating PKA-dependent phosphorylation of RGT1, **Mol. Biol. Cell.**, v.24, p. 1493–1503, 2014.

RUNQUIST, D., HAHN-HÄGERDAL, B., & RÅDSTRÖM, P. Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, n. (1), p. 1, 2010.

RUNQUIST, D., FONSECA, C., RÅDSTRÖM, P., SPENCER-MARTINS, I., HAHN-HÄGERDAL, B. Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation desempenho in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. (1), p. 123-130, 2009.

RYABOVA, O. B., CHMIL, O. M., & SIBIRNY, A. A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **FEMS yeast research**, v. 4, n. (2), p.157-164, 2003.

SADIE, C. J., ROSE, S. H., DEN HAAN, R., VAN ZYL, W. H. Co-expression of a cellobiose phosphorylase and lactose permease enables intracellular cellobiose utilisation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. (4), p. 1373-1380, 2011.

SALOHEIMO, A., RAUTA, J., STASYK, V., SIBIRNY, A. A., PENTTILÄ, M., RUOHONEN, L. Xylose transport studies with xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing heterologous and homologous permeases. **Applied microbiology and biotechnology**, v.74, n. (5), p. 1041-1052, 2007.

SAIER, M. H. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. (2), p. 354-411, 2000.

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

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. (2), p. 185–194, 2009.

SÁNCHEZ, J., CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 5270–5295, 2008.

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

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

SATO, T. K., TREMAINE, M., PARREIRAS, L. S., HEBERT, A. S., MYERS, K. S., HIGBEE, A. J., NARASIMHAN, R. A. Directed evolution reveals unexpected epistatic interactions that alter metabolic regulation and enable anaerobic xylose use by *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS genetics*, v. 12, n. (10), p. e1006372, 2016.

SCHMIDT, M. C., MCCARTNEY, R. R., ZHANG, X., TILLMAN, T. S., SOLIMEO, H., WÖLFL, S. WATKINS, S. C. STD1 and MTH1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. (7), p. 4561-4571, 1999.

SCHULER, D., WAHL, R., WIPPEL, K., VRANES, M., MÜNSTERKÖTTER, M., SAUER, N. KÄMPER, J. Hxt1, a monosaccharide transporter and sensor required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*. **New Phytologist**, v. 206, n. (3), p. 1086-1100, 2015.

SCLAFANI, A., KOEPESELL, H., ACKROFF, K. SGLT1 sugar transporter/sensor is required for post-oral glucose appetite. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 310, n. (7), p. R631-R639, 2016.

SEBAYANG, A. H., MASJUKI, H. H., ONG, H. C., DHARMA, S., SILITONGA, A. S., MAHLIA, T. M. I., ADITIYA, H. B. A perspective on bioethanol production from biomass as alternative fuel for spark ignition engine. **RSC Advances**, v. 6, n. (18), p. 14964-14992, 2016.

SEDLAK, M., & HO, N. W. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast*, v. 21, n. (8), p. 671-684, 2004.

SEN, A., ACOSTA-SAMPSON, L., AHN, J., CATE, J., THORNER, J. W. Internalization of heterologous cellodextrin transporters is mediated by endogenous alpha-arrestins in *Saccharomyces cerevisiae*. **MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL**, v. 26, 2015.

SHARMA, H. K., XU, C., & QIN, W. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-17, 2017.

SHIN, H. Y., NIJLAND, J. G., DE WAAL, P. P., & DRIESSEN, A. J. The amino-terminal tail of Hxt11 confers membrane stability to the Hxt2 sugar transporter and improves xylose fermentation in the presence of acetic acid. **Biotechnology and Bioengineering**, 2017.

SHIN, H. Y., NIJLAND, J. G., DE WAAL, P. P., DE JONG, R. M., KLAASSEN, P., & DRIESSEN, A. J. An engineered cryptic Hxt11 sugar transporter facilitates glucose–xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for biofuels**, v. 8, n. (1), p. 176, 2015.

SIBIRNY, A. A. *Pichia guilliermondii*. In *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, p. 255-275, 1996.

SIMOSSIS, V. A., & HERINGA, J. PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. **Nucleic acids research**, v. 33, n. (suppl_2), p. W289-W294, 2005.

SIMOSSIS, V. A., KLEINJUNG, J., & HERINGA, J. Homology-extended sequence alignment. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. (3), p. 816-824, 2005.

SNOWDON, C., & VAN DER MERWE, G. Regulation of Hxt3 and Hxt7 turnover converges on the Vid30 complex and requires inactivation of the Ras/cAMP/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **PloS one**, v. 7, n. (12), p. e50458, 2012.

SOARES, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Journal of applied microbiology**, v. 110, n. (1), p. 1-18, 2011.

SPRINGAEL, J. Y., GALAN, J. M., HAGUENAUER-TSAPIS, R., ANDRÉ, B. NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. **Journal of cell science.**, v. 112, n. 9 p. 1375–1383, 1999.

STASYK, O. G., MAIDAN, M. M., STASYK, V., VAN DIJCK, P., THEVELEIN, J. M., SIBIRNY, A. A. Identification of hexose transporter-like sensor HXS1 and functional hexose transporter HXT1 in

the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. (4), p. 735-746, 2008.

SUN, L., ZENG, X., YAN, C., SUN, X., GONG, X., RAO, Y., YAN, N. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. **Nature**, v. 490, n. (7420), p. 361-366, 2012.

SORGEN, P. L., HU, Y., GUAN, L., KABACK, H. R., GIRVIN, M. E. An approach to membrane protein structure without crystals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. (22), p.14037-14040, 2002.

SPRINGAEL, J. Y., GALAN, J. M., HAGUENAUER-TSAPIS, R., ANDRÉ, B. NH₄⁺-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. **Journal of cell science**, v. 112, n. (9), p. 1375-1383., 1999.

SRIVASTAVA, N., SRIVASTAVA, M., MISHRA, P. K., GUPTA, V. K., MOLINA, G., RODRIGUEZ-COUTO, S., RAMTEKE, P. W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 2017.

STAMBUK, B. U., ELEUTHERIO, E. C., FLOREZ-PARDO, L. M., SOUTO-MAIOR, A. M., BON, E. P. 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, 2008.

STAMBUK, B. U., ALVES, S. L., HOLLATZ, C., ZASTROW, C. R. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. (4), p. 370-376, 2006.

STAMBUK, B. U., FRANDEN, M. A., SINGH, A., ZHANG, M. D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 105, n. 108, p. 255-263, 2003.

STAMBUK, B. U., DA SILVA, M. A., PANEK, A. D., DE ARAUJO, P. S. Active α -glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS microbiology letters**, v. 170, n. (1), p. 105-110, 1999.

STINCONE, A., PRIGIONE, A., CRAMER, T., WAMELINK, M., CAMPBELL, K., CHEUNG, E., KELLER, M. A. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. **Biological Reviews**, v. 90, n. (3), p. 927-963, 2015.

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

SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical reviews in biotechnology**. v. 17, n. (1), p. 39-67, 1997.

SWEENEY, M.D., XU, F. Biomass converting enzymes as industrial biocatalysts for fuels and chemicals: recent developments. **Catalysts**, v. 2, p. 244-263, 2012.

SZKLO, A., SCHAEFFER, R., & DELGADO, F. Can one say ethanol is a real threat to gasoline?. **Energy Policy**, v. 35, n. (11), p. 5411-5421, 2007.

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

TOIVOLA, A., YARROW, D., VAN DEN BOSCH, E., VAN DIJKEN, J. P., SCHEFFERS, W. A. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. (6), p. 1221-1223, 1998.

TOWLE, H. C. Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 16, n. (10), p. 489-494, 2005.

TRÄFF, K. L., CORDERO, R. O., 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, n. (12), p. 5668-5674, 2001.

TSUJIBO, H., KOSAKA, M., IKENISHI, S., SATO, T., MIYAMOTO, K., INAMORI, Y. Molecular characterization of a high-affinity xylobiose transporter of *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and its transcriptional regulation. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. (4), 1029-1037, 2004.

TUSNADY, G. E., & SIMON, I. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. **Bioinformatics**, v. 17, n. (9), p. 849-850, 2001.

UNCTAD, (2016). “United Nations Conference on Trade and Development”, Second-Generation Biofuel Markets: State of Play, Trade and Developing Country Perspectives. Disponível em: www.unctad.org . Acesso em: 10 outubro. 2017

VADYVALOO, V., SMIRNOVA, I. N., KASHO, V. N., KABACK, H. R. Conservation of residues involved in sugar/H⁺ symport by the sucrose permease of *Escherichia coli* relative to lactose permease. **Journal of molecular biology**, v. 358, n. (4), p. 1051-1059, 2006.

VAN DER REST, M. E., KAMMINGA, A. H., NAKANO, A., ANRAKU, Y., POOLMAN, B., KONINGS, W. N. The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. **Microbiological reviews**, v. 59, n. (2), p. 304-322, 1995.

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

VARDY, E., ARKIN, I. T., GOTTSCHALK, K. E., KABACK, H. R., SCHULDINER, S. Structural conservation in the major facilitator

superfamily as revealed by comparative modeling. **Protein Science**, v. 13, n. (7), p. 1832-1840, 2004.

VINUSELVI, P., & LEE, S. K. Engineered *Escherichia coli* capable of co-utilization of cellobiose and xylose. **Enzyme and microbial technology**, v. 50, n. (1), p. 1-4, 2012.

VINUSELVI, P., & LEE, S. K. Engineering *Escherichia coli* for efficient cellobiose utilization. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, n. (1), p. 125-132, 2011.

WALFRIDSSON, M., HALLBORN, J., PENTTILÄ, M. E. R. J. A., KERÄNEN, S. I. R. K. K. A., 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, n. (12), p. 4184-4190, 1995.

WANG, C., BAO, X., LI, Y., JIAO, C., HOU, J., ZHANG, Q., SHEN, Y. 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.

WANG, J., & NEEDLEMAN, R. Removal of a MG1p binding site converts a MAL63 constitutive mutant derived by interchromosomal gene conversion to glucose insensitivity. **Genetics**, v. 142, n. (1), p. 51-63, 1996.

WANG, M. Ethanol; the complete energy life cycle picture. **US Department of Energy**, p. 1-877, 2007.

WANG, Y., REN, Y. C., ZHANG, Z. T., KE, T., & HUI, F. L. *Spathaspora allomyrinae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from a scarabeid beetle *Allomyrina dichotoma*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 2016

WATANABE, H., & TOKUDA, G. Cellulolytic systems in insects. **Annual review of entomology**, v. 55, p. 609-632, 2010.

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 NADH-preferring xylose reductase from *Pichia stipitis*. **Microbiology**, v. 153, n. (9), p. 3044-3054, 2007.

WEBB, B., & SALI, A. Protein structure modeling with MODELLER. **Protein Structure Prediction**, p. 1-15, 2014.

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

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.

WHISTLER, R. L., & RICHARDS, E. L. Hemicelluloses. **The carbohydrates**, v. 2, p. 447-469, 1970.

WHITWORTH, D. A., & RATLEDGE, C. Phosphoketolase in *Rhodotorula graminis* and other yeasts. **Microbiology**, v. 102, n. (2), p. 397-401, 1997.

WIECZORKE, R., KRAMPE, S., WEIERSTALL, T., FREIDEL, K., HOLLENBERG, C. P., BOLES, E. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**, v. 464, n. (3), p. 123-128, 1999.

WISEDCHAI SRI, G., PARK, M. S., IADANZA, M. G., ZHENG, H., GONEN, T. Proton-coupled sugar transport in the prototypical major facilitator superfamily protein XylE. **Nature communications**, v. 5, 2014.

WOHLBACH, D. J., KUO, A., SATO, T. K., POTTS, K. M., SALAMOV, A. A., LABUTTI, K. M., LUCAS, S. 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.

XU, H., KIM, S., SOREK, H., LEE, Y., JEONG, D., KIM, J., KIM, S. R. PHO13 deletion-induced transcriptional activation prevents sedoheptulose accumulation during xylose metabolism in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic engineering**, v. 34, p. 88-96, 2016.

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

YOUNG, E., LEE, S. M. & ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. *Biotechnol. Biofuels*, v. 3, p. 24, 2010.

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

YOUNG, E. M., TONG, A., BUI, H., SPOFFORD, C., ALPER, H. S. Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 111, n. (1), p. 131-136, 2014.

YOSHIDA, E., HIDAKA, M., FUSHINOBU, S., KOYANAGI, T., MINAMI, H., TAMAKI, H., KUMAGAI, H. Role of a PA14 domain in determining substrate specificity of a glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*. **Biochemical Journal**, v. 431, n. (1), p. 39-49, 2010.

ZANIN, G. M., SANTANA, C. C., BON, E. P., GIORDANO, R. C., DE MORAES, F. F., ANDRIETTA, S. R., FONTANA, J. D. Brazilian bioethanol program. **Appl. Biochem. Biotechnol.** p. 1147-1161, 2000.

ZHANG, C., ACOSTA-SAMPSON, L., YU, V. Y., CATE, J. H. Screening of transporters to improve xylo-dextrin utilization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **PloS one**, v. 12, n. (9), p. e0184730, 2017.

ZHANG, W., KOU, Y., XU, J., CAO, Y., ZHAO, G., SHAO, J., WANG, H., WANG, Z., BAO, X., CHEN, G., LIU, W. Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n.46, p. 32861–32872, 2013.

ZHANG, Z., DONALDSON, A. A., & MA, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology advances**, v. 30, n. (4), p. 913-919, 2012.

ZHOU, H., CHENG, J. S., WANG, B. L., FINK, G. R., STEPHANOPOULOS, G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic engineering**, v. 14, n. (6), p. 611-622, 2012.

ZNAMEROSKI, E. A., LI, X., TSAI, J. C., GALAZKA, J. M., GLASS, N. L., CATE, J. H. Evidence for transceptor function of cellodextrin transporters in *Neurospora crassa*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. (5), p. 2610-2619, 2014.