

Belisa Bordin de Sales

**Construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*
recombinantes superexpressoras de transportadores de
pentoses**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

Belisa Bordin de Sales

**Construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes
superexpressoras de transportadores de pentoses**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Elisabete José Vicente

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Sales, Belisa Bordin de.

Construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*
recombinantes superexpressoras de transportadores de pentoses /
Belisa Bordin de Sales. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Elisabete José Vicente.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de
concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Melhoramento
genético de levedura para produção de etanol.

Versão do título para o inglês: Construction of *Saccharomyces*
cerevisiae recombinant strains overexpressing pentoses transporters.

Descritores: 1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. Gene *HXT5* 3. Gene
HXT7 4. Produção de etanol 5. Fermentação de material
lignocelulósico 6. Xilose I. Vicente, Elisabete José II. Universidade
de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0157/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Belisa Bordin de Sales.

Título da Dissertação: Construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes superexpressoras de transportadores de pentoses.

Orientador(a): Elisabete José Vicente.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais e meu noivo Leandro pelo
apoio e paciência e muito amor. Somente com
a ajuda de vocês fui capaz de realizar essa
conquista.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Elisabete José Vicente pela oportunidade dada e confiança conquistada.

À Prof^ª. Dr^ª. Ana Clara Guerrini Schenberg pela colaboração científica.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos pelo crescimento profissional e também pessoal: Ana Cristina, Ana Raquel, Andréia, Carolina, Claudionor, Cleide, Diogo, Fábio, Felipe, Ilana, Jéssica, Oeber, Poliana, Ronaldo. Obrigada pela ajuda e companheirismo.

À Heloísa, Lilian e Ciça, amigas conquistadas em São Paulo, sucesso e felicidades nas suas conquistas!

Aos amigos da minha cidade, obrigada por se mostrarem presentes mesmo quando a distância física é enorme.

Aos meus pais, Eliana e José Sales, e irmão Fábio pelo carinho, paciência e conselhos valiosos que me ajudaram até o momento.

Ao meu noivo Leandro pelo companheirismo, paciência e por ter me apoiado incondicionalmente, mesmo quando minhas decisões profissionais afetaram sua vida pessoal.

À Norma, Kazui, Leninha, muito obrigada pelo apoio para realização desse trabalho.

À Alice, Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela seriedade e atenção.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr. Odanir Garcia Guerra, pela confiança em me indicar como aluna de mestrado.

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

Olhai de que esperanças me mantenho!
Vede que perigosas seguranças!
Que não temo contrastes nem mudanças,
Andando em bravo mar, perdido o lenho.
(Luis Vaz de camões)

RESUMO

SALES, B. B. **Construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes superexpressoras de transportadores de pentoses.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A produção industrial de etanol a partir de componentes vegetais é uma estratégia importante para que esse produto se torne competitivo com os combustíveis tradicionais. Entretanto, a conversão da biomassa para este fim só é viável se a fração hemicelulósica e celulósica for utilizada no processo industrial. Na tentativa de se obter leveduras capazes de produzir etanol a partir de pentoses presentes em hidrolisados vegetais, a captação desses açúcares é muito estudada e diversos autores concluíram que a captação do substrato é uma etapa limitante. Ainda não foi descoberto um sistema específico para a captação de pentoses, e por isso, acredita-se que a captação de xilose por leveduras seja mediada, de forma não específica, pelo sistema de transportadores de hexoses. O objetivo deste trabalho foi isolar microrganismos naturalmente capazes de utilizar e fermentar pentoses; e obter linhagens *S. cerevisiae* capazes de captar mais xilose e glicose, decorrente da introdução de cópias adicionais dos genes *HXT5* e *HXT7*, visando à produção de etanol. Foram isoladas sete leveduras da biodiversidade brasileira, que utilizam preferencialmente xilose como fonte de carbono. Análises qualitativas e quantitativas mostraram que os novos clones recombinantes foram capazes de consumir mais rapidamente xilose ou glicose. Após 24 horas de cultivo em glicose (50 g/l), o clone recombinante YPH252/pMAHXT5, consumiu 10 g/l; o clone YPH252/pMAHXT7, 16 g/l; e o controle YPH252/pMA91, 1,48 g/l; e, a produção de etanol de YPH252/pMAHXT5 foi de 2,08 g/l; YPH252/pMAHXT7 foi de 1,99 g/l e YPH252/pMA91 (controle) foi de 1,85 g/l. Após 24 horas de cultivo em xilose (50 g/l), o clone recombinante YPH252/pMAHXT5 consumiu 8,7 g/l; YPH252/pMAHXT7, 12,3 g/l; e, YPH252/pMA91, 6,3 g/l. O maior consumo de glicose pelos clones recombinantes resultou em maior produção de etanol; porém, a maior captação de xilose não resultou em maior produção de biomassa ou etanol, possivelmente devido à baixa expressão dos genes da rota de utilização de xilose endógenos, causando acúmulo intracelular desta pentose.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Gene *HXT5*. Gene *HXT7*. Produção de etanol. Fermentação de material lignocelulósico. Xilose.

ABSTRACT

SALES, B. B. **Construction of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strains overexpressing pentoses transporters.** Master Thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The industrial production of ethanol from plant components is an important strategy to make this product competitive with traditional fuels. However, the conversion of biomass for this purpose is feasible only if hemicellulose and cellulose are used in the industrial process. In the attempt to construct yeast strains capable of producing ethanol from pentoses present in biomass hydrolyzed the uptake of these sugars are widely studied, and several authors concluded that the internalization of this substrate is a limiting step for ethanol production. It has not yet been discovered a special system for capturing pentoses, and therefore, it is believed that the uptake of xylose by yeasts is mediated by a non-specific system of hexose transporters. The purpose of this work was to isolate microorganisms naturally able to exploit and ferment pentoses; and acquire *S. cerevisiae* strains capable of transport more xylose and glucose due to the introduction of additional copies of the genes *HXT5* and *HXT7* for ethanol production. It was selected seven strains isolated from Brazilian biodiversity, which preferably use xylose as carbon source. Qualitative and quantitative analysis showed that the recombinant clones were able to consume more rapidly xylose or glucose. After 24 hours of cultivation in glucose (50 g/l), the clone YPH252/pMAHXT5 consumed 10 g/l; YPH252/pMAHXT7, 16 g/l and the control strain YPH252pMA91, 1.48 g/l; and the ethanol production by YPH252/pMAHXT5 was 2.08 g/l; YPH252/pMAHXT7, 1.99 g/l and by YPH252pMA91, 1.85 g/l. after 24 hours of cultivation in xylose (50 g/l), the clone YPH252/pMAHXT5 consumed 8.7 g/l; YPH252/pMAHXT7, 12.3 g/l, and the control strain YPH252/pMA91, 6.3 g/l. The higher consumption of glucose was converted into higher ethanol production; although the higher xylose consumption did not result in more biomass or ethanol, possibly because of the low endogenous gene expression of xylose-utilizing route, causing intracellular accumulation of this pentose.

Key-words: *Saccharomyces cerevisiae*. Gene *HXT5*. Gene *HXT7*. Ethanol production. Fermentation of lignocellulosic material. Xylose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Esquemas da parede celular vegetal. À esquerda são evidenciados os cristais de celulose entremeados por hemicelulose e lignina. À direita, uma molécula de celulose se apresenta aumentada em prolongada, mostrando as unidades de glicose ligadas entre si. Uma das moléculas de hemicelulose também é mostrada.....	22
Figura 2.	Representação esquemática da hidrólise ácida reagindo com a celulose e a hemicelulose.....	24
Figura 3.	Rotas de conversão de D-xilose em D-xilulose-5-fosfato em bactérias e fungos.....	25
Figura 4.	Equações das reações enzimáticas para determinação bioquímica de etanol no sobrenadante dos cultivos.....	48
Figura 5.	Crescimento de leveduras isoladas em meio mínimo sólido contendo xilose (SX-1).....	49
Figura 6.	Ensaio de fermentação de xilose de leveduras selvagens isoladas neste trabalho. a) fermentação em meio mínimo com 2% de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar; C ⁻ : controle negativo; b) fermentação em meio mínimo com 2% de xilose; C ⁻ : controle negativo; c) comparação da fermentação do isolado LX6 nos meios mínimos de cultura contendo 2% xilose (1), 1,5% xilose com 0,5% glicose (2) e 2% hidrolisado de cana-de-açúcar (3).....	50
Figura 7.	Consumo de glicose em meio mínimo contendo 2% de glicose (SD-2), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.....	51
Figura 8.	Consumo de xilose em meio mínimo contendo 2% de xilose (SX-2), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.....	52
Figura 9.	Curva de crescimento em meio mínimo contendo 2% de glicose (SD-2), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.....	53
Figura 10.	Curva de crescimento em meio mínimo contendo 2% de xilose (SX-2), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.....	54

Figura 11. Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio do amplicon correspondente ao gene <i>HXT5</i> (1.779 pb) obtido por reação de PCR, a partir do DNA genômico da levedura S288C; 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng).....	55
Figura 12. Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio do amplicon correspondente ao gene <i>HXT7</i> (1.713 pb) obtido por reação de PCR, a partir do DNA genômico da levedura S288C; 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng).....	55
Figura 13. Representação esquemática da construção do vetor intermediário pGEMTHXT5.....	56
Figura 14. Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio de: 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) digestão do plasmídeo intermediário construído pGEMTHXT5 com a enzima de restrição <i>Bgl</i> III, liberando o gene <i>HXT5</i> (1.779 pares de base).....	57
Figura 15. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio: 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) pGEMTHXT5/ <i>Bam</i> HI; 3) pGEMTHXT5/ <i>Acc</i> I).....	57
Figura 16. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio: 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) plasmídeo pGEMTHXT5; 3) fragmento <i>HXT5</i> , produto de PCR empregado como DNA molde o plasmídeo pGEMTHXT5.....	57
Figura 17. Representação esquemática da construção do plasmídeo pMAHXT5.....	58
Figura 18. Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio plasmídeo pMAHXT5 digerido com a enzima <i>Bgl</i> III, liberando o vetor linearizado (cerca de 9.500 pb) e o gene <i>HXT5</i> (1.779 pb);1) marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) Digestão de pMAHXT5 com <i>Bgl</i> III.....	58

- Figura 19.** Perfis de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio da amplificação do cassete de expressão *pPGK*HXT5*tPGK* (3.636 pb) e da análise de restrição: 1) marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) *pPGK*HXT5*tPGK* amplificado por PCR; 3) Controle negativo da amplificação; 4) *pMAHXT5/AccI* (3.238 e 477 pb); 5) *pMAHXT5/BamHI* (3.248 e 467 pb); 6) *pMAHXT5/KpnI* (1.676, 1.374 e 630 pb)..... 59
- Figura 20.** Representação esquemática da construção do vetor intermediário *pTOPOHXT7*..... 60
- Figura 21.** Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio da digestão do plasmídeo intermediário construído *pTOPOHXT7* com a enzima de restrição *BglII*, liberando o fragmento *HXT7* (1.713 pb). 1) marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng)..... 60
- Figura 22.** Perfis de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio: 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) *pTOPOHXT7/HindIII*; 3) *pTOPOHXT7/HpaI*; 4) *pTOPOHXT7/NcoI*..... 60
- Figura 23.** Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio: 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) amplificação do fragmento *HXT7*, por PCR a partir do plasmídeo *pTOPO*..... 61
- Figura 24.** Representação esquemática da do plasmídeo *pMAHXT7*..... 62
- Figura 25.** Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio: 1) marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) digestão plasmídeo *pMAHXT7* com a enzima *BglII*, liberando o vetor *pMA91* linearizado (9.483 pb) e o gene *HXT7* (1.713 pb)..... 62

Figura 26.	Perfis de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio: 1) marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) <i>pPGK*HXT7*tPGK</i> amplificado; 3) controle negativo da amplificação; 4) pMAHXT7/ <i>HindIII</i> (1.960 e 1.613 pb); 5) pMAHXT7/ <i>HpaI</i> (2.603 e 976 pb); 6) pMAHXT7/ <i>NcoI</i> (3.96 e 483 pb).....	63
Figura 27.	Ensaio de fermentação de glicose em tubos Durham com o meio SD-2 THUAL dos clones recombinantes YPH252/pMAHXT5, YPH252/pMAHXT7 e YPH252/pMA91: A: YPH 252/pMA91; B: YPH252/pMAHXT5 clone 11; C: YPH252/pMAHXT5 clone 13; D: YPH252/pMAHXT5 clone 20; E: YPH252/pMAHXT7 clone 3; F: YPH252/ pMAHXT7 clone 9; G: YPH252/pMAHXT7 clone 20.....	64
Figura 28.	Figura 26. Cultivo de clones recombinantes em meio completo sólido após cultivo por 30 horas, a 28 °C: I) YPD-2 BCP; II) YPD-5 BCP. A: YPH252/pMAHXT5 clone 20; B: YPH252/pMAHXT5 clone 13; C: YPH252/pMAHXT5 clone 11; D: YPH252/pMAHXT7 clone 20; E: YPH252/pMAHXT7 clone 9; F: YPH252/pMAHXT7 clone 3; G: YPH252/pMA91.....	65
Figura 29.	Consumo de glicose em meio mínimo contendo 2% de glicose (SD-2 THUAL), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.....	67
Figura 30.	Consumo de glicose em meio mínimo contendo 5% de glicose (SD-2 THUAL), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 50 rpm.....	68
Figura 31.	Consumo de xilose em meio mínimo contendo 2% de xilose (SX-2 THUAL), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.....	69
Figura 32.	Consumo de xilose em meio mínimo contendo 5% de xilose (SX-5 THUAL), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.....	70
Figura 33.	Curva de crescimento em meio mínimo contendo 2% de glicose (SD-2 THUAL), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.....	71

Figura 34. Curva de crescimento em meio mínimo contendo 2% de xilose (SX-2 THUAL), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.....	71
Figura 35. Produção de etanol a partir de glicose pelos clones recombinantes selecionados em meio SD-5 THUAL em “shaker” a 50 rpm.....	72
Figura 36. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio de produtos de PCR de alelos de <i>HXT5</i> e <i>HXT7</i> da levedura S288C: 1 e 9) marcador de 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) <i>HXT5</i> de S288C; 3-8) resultado da amplificação; 10) <i>HXT7</i> de S288C; 11-16) resultado da amplificação.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição típica do bagaço de cana-de-açúcar brasileiro. Fonte: FINGUERUT et al., 2006.....	21
Tabela 2 - Composição dos principais açúcares de bagaço de cana-de-açúcar. Fonte: VAN MARIS et al., 2006.....	23
Tabela 3 - Plasmídeos utilizados como vetores de clonagem e/ou transformação gênica.....	38
Tabela 4 - Microrganismos utilizados neste trabalho.....	38
Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados e construídos neste trabalho.....	40
Tabela 6 - Locais de coleta das linhagens de levedura selvagens fermentadoras de xilose.....	50
Tabela 7 - Eficiência de transformação das leveduras com o plasmídeos recombinantes construídos.....	63
Tabela 8 - Produção de etanol pelas linhagens recombinantes construídas neste trabalho.....	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Etanol celulósico.....	19
1.2	Biomassa lignocelulósica.....	21
1.3	Utilização de pentoses por microrganismos.....	25
1.4	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
1.5	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> recombinantes para utilização da xilose.....	28
1.6	Sistema de transportadores de açúcares em <i>S. cerevisiae</i>	31
2	OBJETIVOS.....	35
2.1	Objetivo geral.....	35
2.2	Objetivos específicos.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	Meios e soluções.....	36
3.1.1	<i>Meios para bactérias</i>	36
3.1.2	<i>Meios para leveduras</i>	36
3.1.3	<i>Soluções</i>	37
3.2	Plasmídeos utilizados.....	37
3.3	Microrganismos utilizados.....	38
3.4	Isolamento e seleção de levedura capazes de crescer ou fermentar xilose como fonte de carbono.....	39
3.5	Extração do DNA total de levedura.....	39
3.6	Oligonucleotídeos iniciadores.....	40
3.7	Programas utilizados para Reação de Polimerização em Cadeia (PCR).....	41
3.8	Preparação de bactérias eletrocompetentes.....	41
3.9	Transformações de <i>E. coli</i>	42
3.10	Extração de DNA plasmidial.....	42
3.11	Tratamento de DNA plasmidial com enzimas de restrição.....	43
3.12	Análise de fragmentos de DNA em gel de agarose.....	43
3.13	Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose.....	44
3.14	Ligação entre fragmentos de DNA.....	44
3.15	Seqüenciamento de DNA.....	44
3.16	Transformação de levedura <i>S. cerevisiae</i>	45
3.17	Análise da capacidade de fermentação dos clones em tubos Durham.....	45

3.18	Análise da capacidade de fermentação dos clones em meio sólido contendo púrpura de bromocresol.....	46
3.19	Condições de cultivo dos clones e das leveduras isoladas.....	46
3.20	Análise de consumo dos açúcares xilose e glicose dos clones e das leveduras isoladas.....	47
3.21	Análise da produção de etanol dos clones e das leveduras isoladas.....	48
3.22	Análise do crescimento dos clones e das leveduras isoladas.....	48
4	RESULTADOS.....	49
4.1	Seleção de leveduras com capacidade de bioconversão de pentoses.....	49
4.1.1	<i>Isolamento de leveduras selvagens capazes de crescer em xilose como única fonte de carbono.....</i>	49
4.1.2	<i>Seleção de leveduras selvagens capazes de fermentar xilose.....</i>	49
4.1.3	<i>Análises do consumo de açúcares, produção de etanol e verificação da curva de crescimento das leveduras isoladas.....</i>	51
4.1.3.1	Consumo de glicose pelas leveduras isoladas.....	51
4.1.3.2	Consumo de xilose pelas leveduras isoladas.....	52
4.1.3.3	Crescimento das leveduras isoladas em glicose e em xilose.....	53
4.2	Construção de linhagens de <i>S. cerevisiae</i> recombinantes que superexpressam <i>HXT5</i> e <i>HXT7</i>.....	54
4.2.1	<i>Obtenção dos genes <i>HXT5</i> e <i>HXT7</i>.....</i>	55
4.2.2	<i>Sequenciamento e alinhamento dos genes <i>HXT5</i> e <i>HXT7</i>.....</i>	55
4.2.3	<i>Construção do plasmídeo de expressão <i>pMAHXT5</i>.....</i>	56
4.2.4	<i>Construção do plasmídeo de expressão <i>pMAHXT7</i>.....</i>	59
4.2.5	<i>Transformação de leveduras com os plasmídeos recombinantes construídos.....</i>	63
4.2.6	<i>Análise qualitativa da capacidade fermentativa das leveduras recombinantes....</i>	64
4.2.6.1	Análise em tubos Durhan.....	64
4.2.6.2	Análise em meio sólido.....	65
4.2.7	<i>Caracterização dos clones recombinantes.....</i>	65
4.2.7.1	Consumo de glicose em condições de aerobiose.....	66
4.2.7.2	Consumo de glicose em condições de restrição de oxigênio.....	67
4.2.7.3	Consumo de xilose em condições de aerobiose.....	68
4.2.7.4	Consumo de xilose em condições de restrição de oxigênio.....	69
4.2.7.5	Curvas de crescimento das leveduras recombinantes.....	70

4.2.7.6	Fermentação alcoólica das leveduras recombinantes.....	71
4.3	Amplificações dos alelos HXT5 e HXT7 das linhagens de levedura selvagens e das leveduras selvagens selecionadas.....	73
5	DISCUSSÃO.....	74
6	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXO A - Curva-padrão realizada com soluções contendo 0,0% - 5% de xilose para a determinação do consumo desse açúcar nos cultivos realizados.....	93
	ANEXO B - Curva-padrão realizada com soluções contendo 0,0% - 5% de etanol para a determinação da produção desse álcool nos cultivos realizados.....	94
	ANEXO C - Seqüenciamento do gene <i>HXT5</i> da linhagem de levedura S288C, obtido neste trabalho.....	95
	ANEXO D - Seqüenciamento do gene <i>HXT7</i> da linhagem de levedura S288C, obtido neste trabalho.....	96
	ANEXO E - Alinhamento dos genes <i>HXT5</i> e <i>HXT7</i> . Estes genes possuem similaridade de 70%.....	97
	ANEXO F - Fermentação em tubos Durhan com pré-inóculo em SD-2 THUAL e inóculo em SD-2 THUAL. O cultivo foi mantido por 72 horas. A: YPH 252 pMA91; B: YPH 252 pMAHXT5 clone 11; C: YPH 252 pMAHXT5 clone 13; D: YPH 252 pMAHXT5 clone 20; E: YPH 252 pMAHXT7 clone 3; F: YPH 252 pMAHXT7 clone 9; G: YPH 252 pMAHXT7 clone 20.....	98
	ANEXO G - Fermentação em tubos Durhan com pré-inóculo em SX-2 THUAL e inóculo em SX-2 THUAL. O cultivo foi mantido por 144 horas. A: YPH 252 pMA91; B: YPH 252 pMAHXT5 clone 11; C: YPH 252 pMAHXT5 clone 13; D: YPH 252 pMAHXT5 clone 20; E: YPH 252 pMAHXT7 clone 3; F: YPH 252 pMAHXT7 clone 9; G: YPH 252 pMAHXT7 clone 20.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Etanol celulósico

A formação de recursos fósseis é um processo que demora milhões de anos, entretanto a humanidade está acabando com as limitadas reservas de óleo em um período de alguns séculos, uma vez que o petróleo é utilizado na indústria para a fabricação de combustíveis e vários outros materiais derivados da indústria petroquímica. Além disso, a demanda de energia está projetada para crescer mais de 50% em 2025, em grande parte decorrente do crescimento de países em rápido desenvolvimento. Em virtude da já prevista escassez de petróleo nas próximas décadas e do aumento da poluição ambiental ocasionada pelo uso de combustíveis fósseis, a descoberta de fontes alternativas de energia tem despertado o interesse de cientistas, governos e da população em geral (ALPER et al., 2009).

O aumento da utilização de recursos renováveis, como a biomassa, reduz a dependência de petróleo, é uma importante contribuição para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável, promove a diminuição da emissão de gases do efeito estufa (RAGAUSKAS et al., 2006), uma vez que o CO₂ gerado pela queima de biocombustíveis é rapidamente absorvido pelas plantas. Também, produz menos CO, NO_x e poluentes fotoquímicos que a gasolina (WHEALS et al., 1999), além de poder proporcionar energia a milhões que ainda não acesso a esse recurso (LIN e TANAKA, 2006). A produção industrial de álcool combustível a partir de biomassa é uma excelente estratégia tanto do ponto de vista econômico quanto energético e ambiental (FARRELL et al., 2006; HILL et al., 2006; GOLDEMBERG, 2007).

No Brasil, quase a totalidade de etanol produzido é derivado da fermentação da sacarose de cana-de-açúcar. Em 1984, 7,9 milhões de litros de etanol foram produzidos (LIN e TANAKA, 2006). Em 2006, foram produzidos 17,8 bilhões de litros de etanol (GOLDEMBERG e GUARDABASSI, 2009) e a estimativa da safra de 2012/13 é de produção de 36 bilhões de litro de etanol, segundo a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA). Nos Estados Unidos, praticamente todo etanol combustível é produzido por fermentação de amido de milho e a produção em 2006 foi superior à produção brasileira, com 18,6 bilhões de litros tornando esse país o maior produtor mundial de etanol (GOLDEMBERG e GUARDABASSI, 2009). Entretanto, a expectativa de produção em 2012 deve ser inferior à brasileira, com 28,4 bilhões de litros (CORTEZ et al., 2010).

Outro aspecto relevante entre o etanol produzido nesses dois países refere-se ao balanço energético. Goldemberg et al. (2007) concluíram que o etanol brasileiro a partir de cana-de-açúcar possui um balanço energético de 10,2, enquanto que para o etanol de milho dos Estados Unidos este valor é de apenas 1,4. O que esses dados mostram é que, comparados com gasolina, o etanol de cana-de-açúcar emite 91% menos CO₂, e o etanol de milho emite 14% menos deste composto na atmosfera.

No futuro, qualquer país com uma significativa economia agrícola poderá se beneficiar das tecnologias atuais e em desenvolvimento para a produção de álcool combustível a partir de resíduos agrícolas (KATAHIRA et al., 2008). Além disso, existem culturas agrícolas não comestíveis como gramíneas e culturas de curta rotação que poderão ser utilizadas para objetivos energéticos (VAN MARIS et al., 2006). As plantações para produção de energia podem criar novas oportunidades de trabalho em áreas rurais contribuindo para o aspecto social da sustentabilidade (LIN e TANAKA, 2006).

Entretanto, a conversão da biomassa para uso como combustível só é viável economicamente se todo seu carbono, incluindo as frações de celulose (constituída por unidades de glicose), hemicelulose (composta majoritariamente de pentoses) e lignina forem utilizadas eficientemente no processo industrial (WYMAN, 2003; GRAY et al., 2006; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006, BETTIGA et al., 2008).

O bagaço de cana-de-açúcar representa um dos principais materiais lignocelulósicos a ser considerado na maioria dos países tropicais, uma vez que possui altos índices de carboidratos e baixo conteúdo de lignina e é facilmente disponível nas usinas de açúcar (MARTÍN et al., 2006). O etanol celulósico tem potencial de suprir quase todas, senão todas as necessidades de combustível líquido para o transporte. É uma fonte renovável de que pode ser facilmente usado por veículos atuais e distribuído pela infra-estrutura já existente em praticamente todos os países do mundo (SEDLAK e HO, 2001).

A biomassa lignocelulósica é um substrato alternativo (TAN et al., 2008) que oferece algumas características como fonte segura de abastecimento, pouco conflito entre o uso da terra para produção de alimentos e dispensa a entrada de energia fóssil (MARGEOT et al., 2009). Essas razões fazem desse substrato uma matéria-prima atrativa para produção de etanol, devido a abundância e a sua grande proporção de açúcares potencialmente fermentáveis (MATSUSHIKA et al., 2009). Materiais lignocelulósicos são geralmente

disponíveis localmente, podem ser encontrados em grandes quantidades e a baixo custo (LYND et al., 2005).

1.2 Biomassa lignocelulósica

Fibras vegetais como bagaço de cana-de-açúcar consistem, em média, em celulose cristalina (cerca de 45% do peso seco) entremeada por hemicelulose (cerca de 30% do peso seco) e lignina (cerca de 25 % do peso seco) (WHEALS et al., 1999). Na Tabela 1 é apresentada a composição típica em porcentagens do bagaço de cana-de-açúcar brasileiro. A celulose e hemicelulose são polissacarídeos compostos de açúcares de alta energia que podem ser convertidos a etanol (MATSUSHIKA et al., 2009). Esses dois polímeros são unidos em um composto reforçado pela lignina, um componente com características estruturais extremamente resistente, mas com capacidade de se flexionar e se desenvolver como um cristal líquido (GREER, 2005). A lignina é um material hidrofóbico com estrutura tridimensional, altamente ramificada (SILVA et al., 2009). Na Figura 1 são apresentados dois esquemas da parede celular vegetal, que evidencia a íntima relação da celulose e da hemicelulose com a lignina.

Tabela 1 - Composição típica do bagaço de cana-de-açúcar brasileiro.

Fração	% do bagaço (base seca)
Celulose	32-48
Hemicelulose	27-32
Lignina	19-24
Sílica	0,7-3,5
Cinzas	1,5-5

Fonte: Finguerut et al., 2006 apud Cortez et al. 2010.

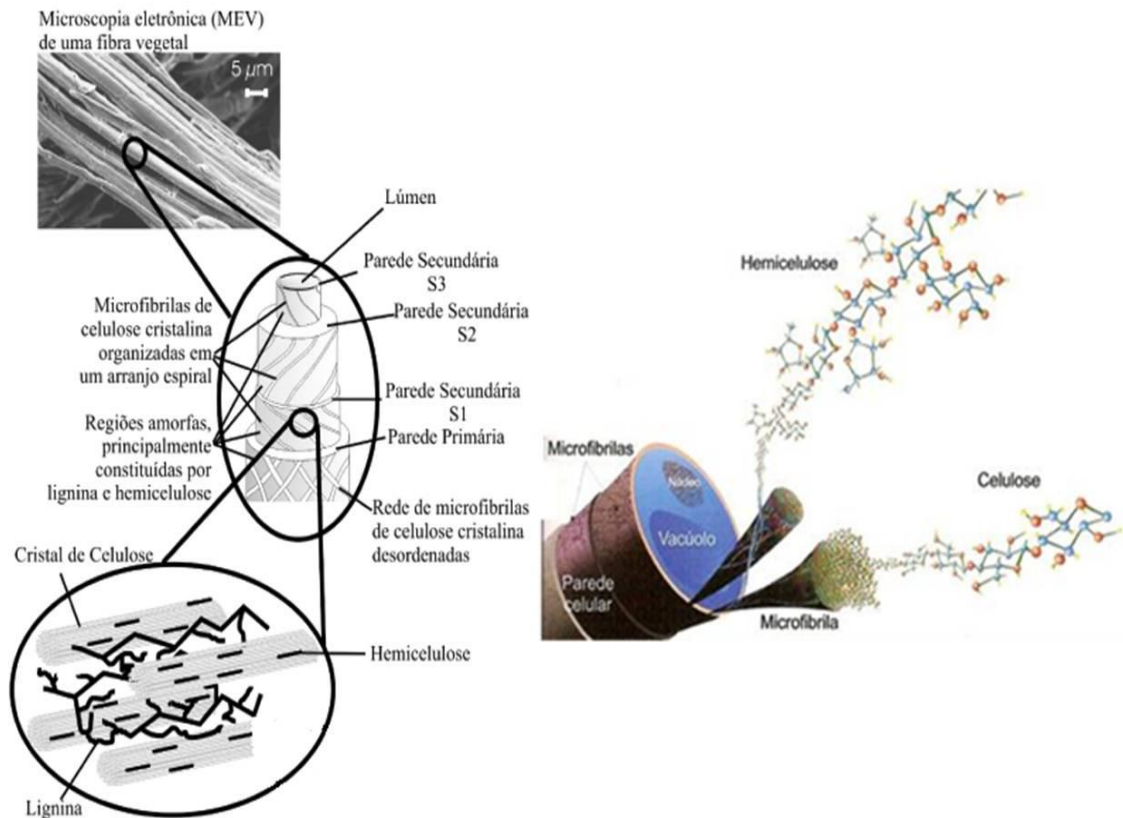


Figura 1. Esquemas da parede celular vegetal. À esquerda são evidenciados os cristais de celulose entremeados por hemicelulose e lignina. À direita, uma molécula de celulose se apresenta aumentada em prolongada, mostrando as unidades de glicose ligadas entre si. Uma das moléculas de hemicelulose também é mostrada.

Fonte: adaptado de Silva et al., 2009 e Buckeridge et al., 2010.

A conversão dos materiais lignocelulósicos em açúcares fermentáveis é um processo intensivo que envolve uma combinação de pré-tratamento (químico ou mecânico) e hidrólise (química ou enzimática) (JOJIMA et al., 2010) para promover a quebra dessas estruturas em seus monômeros. Os monômeros de celulose são principalmente glicose e celobiose. Já os monômeros de hemicelulose são altamente ramificados, constituídos por um heteropolímero complexo que contém hexoses (D-glicose, D-galactose, D-manose, L-ranmose e L-frutose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urânicos como D-ácido-glucurônico e D-ácido-galacturônico (KUMAR et al., 2008).

Pentoses são açúcares de cinco carbonos que se tornam disponíveis para a fermentação quando o material lignocelulósico é hidrolisado (PETSCHACHER e NIDETZKY, 2008). A composição da hemicelulose é fortemente dependente da espécie da planta (MATSUSHIKA et al., 2009). Na Tabela 2 é apresentada a porcentagem de açúcares presentes no bagaço de cana-de-açúcar. Os principais açúcares no hidrolisado de celulose e hemicelulose são glicose e xilose.

Tabela 2 - Composição dos principais açúcares de bagaço de cana-de-açúcar.

Carboidratos	% Bagaço
Glicose	39
Xilose	22,1
Arabinose	2,1
Galactose	0,5
Manose	0,4
Ácidos urônicos	2,2

Fonte: Van Maris et al., 2006

O objetivo do pré-tratamento é tornar a estrutura lignocelulósica suscetível ao ataque enzimático e solubilizar alguns dos constituintes, particularmente hemicelulose, que é quebrado em seus monômeros (WHEALS et al., 1999). É necessário para aumentar a área de superfície da matéria-prima e assim, tornar a lignocelulose acessível para hidrólise (MARTÍN et al., 2006). Os hidrolisados de lignocelulose contêm, além de monossacarídeos, oligossacarídeos originados da degradação parcial dos polissacarídeos e uma mistura complexa de compostos que inibem a bioconversão dos açúcares (WYMAN et al., 2003). Tais inibidores são compostos aromáticos (principalmente fenóis) e ácidos alifáticos, furfural, hidroximetil furfural e acetato (KARHUMAA et al., 2007b), que aumentam os custos do processo global. A natureza e concentração desses compostos dependem do tipo de matéria-prima (conteúdo percentual de celulose, hemicelulose e lignina, do pré-tratamento utilizado, das condições do processo (temperatura e tempo de reação) e do emprego ou não de catalisadores ácidos (BONOMI, 2010).

Um pré-tratamento eficiente do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol deve ao mesmo tempo produzir uma polpa celulósica com elevada acessibilidade e reatividade da fibra aos agentes hidrolíticos ácidos ou enzimáticos, garantir adequada recuperação das pentoses, além de limitar a geração de compostos inibidores aos microrganismos usados na fermentação e às enzimas. Os processos de pré-tratamento com vapor (“Steam Treatment”) autocatalíticos ou em presença de catalisador, água quente (“Hot Water”) e ácido sulfúrico diluído (“Dilute Sulfuric Acid”) são alternativas tecnológicas mais promissoras para a instalação de unidade de hidrólise anexa às plantas sucroalcoleiras (BONOMI, 2010).

A hidrólise ácida de hemicelulose ocorre sob condições menos drásticas que a da celulose porque a primeira é um polímero amorfo (Figura 2). Em princípio, a hidrólise ácida apresenta vantagens importantes sobre o processo enzimático, em virtude da disponibilidade,

garantia de fornecimento e menor custo dos reagentes, além da maturidade tecnológica e reduzidas restrições em termos de propriedade intelectual. Todavia existem desvantagens concernentes à necessidade de sistemas de recuperação de ácido e maiores custos dos materiais para construção de equipamentos (BONOMI, 2010).

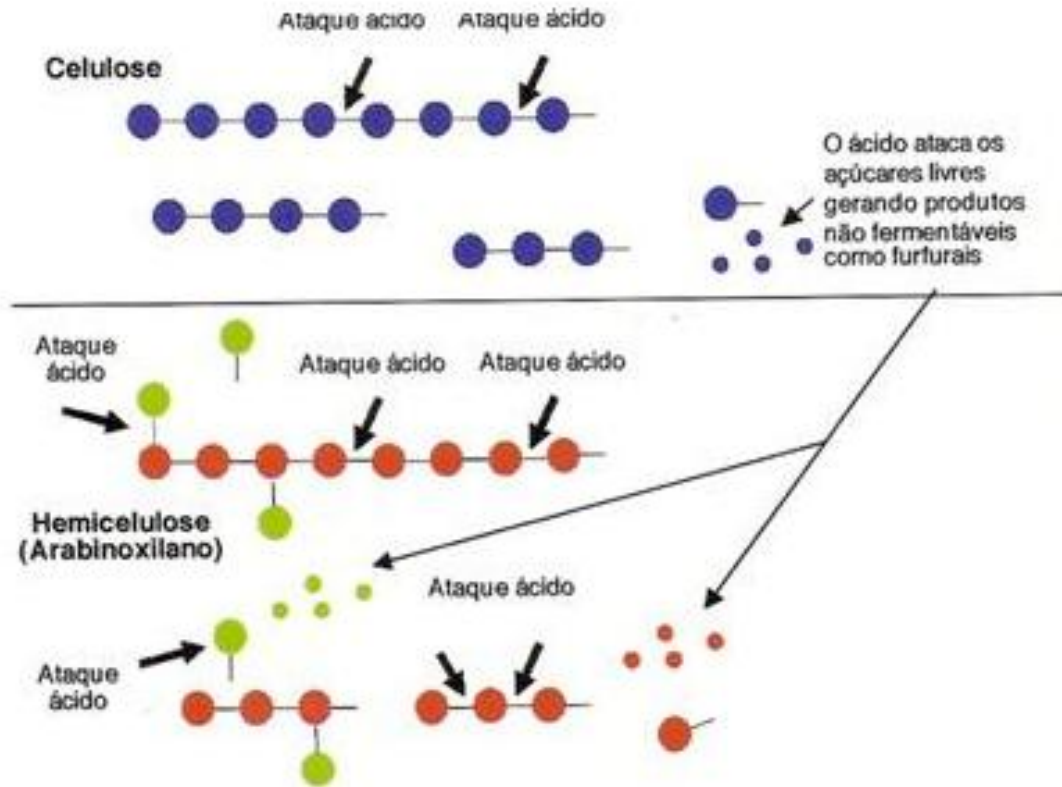


Figura 2. Representação esquemática da hidrólise ácida reagindo com a celulose e a hemicelulose.
Fonte: Buckeridge et al. 2010.

A hidrólise enzimática da hemicelulose é mais complicada que a da celulose, pois sua mistura de açúcares de cinco ou seis carbonos requer diferentes enzimas para quebrá-los como endoxilanase, betaxilanase, α -L-arabinofuranosidase entre outras (JORGENSEN, 2007). Esses pressupostos tornam difíceis e cara a hidrólise enzimática da hemicelulose (QUINTERO-RAMIREZ, 2010). Apesar disso, as rotas enzimáticas apresentam vantagens importantes sobre as rotas químicas, no contexto da produção de bioetanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar, como elevados rendimentos glicosídicos, ao mesmo tempo em que os hidrolisados possuem reduzida toxicidade aos microrganismos da fermentação. Um grande desafio consiste em tornar o processo enzimático viável. Os processos de hidrólise enzimática devem ser concebidos em função do tipo de substrato produzido, do pré-tratamento utilizado, bem como da estratégia de fermentação a ser adotada (BONOMI, 2010).

1.3 Utilização de pentoses por microrganismos

Inúmeros microrganismos são capazes de metabolizar pentoses (HAHN-HÄGERDAL e PAMMENT, 2004). Entre bactérias e fungos, as análises das vias metabólicas envolvidas neste processo revelaram duas formas distintas de utilização destes açúcares (Figura 3). Em bactérias fermentadoras de pentoses, a conversão de D-xilose em D-xilulose é catalizada pela enzima xilose isomerase (XI) (MARGEOT et al., 2009). A D-xilulose é fosforilada pela ação da xiluloquinase. Em seguida, a D-xilulose é convertida a D-xilulose-5-fosfato pela enzima xilulose quinase. Então a D-xilulose-5P é metabolizada pela via das pentoses (HAHN-HÄGERDAL et al., 2004).

Em leveduras e demais organismos eucariotos, a conversão de D-xilose a D-xilulose ocorre em duas etapas: inicialmente D-xilose é reduzida a D-xilitol, pela enzima xilose redutase (XR); em seguida, D-xilitol é oxidado a D-xilulose, pela enzima xilitol desidrogenase (XDH). D-xilulose é fosforilada pela enzima xilulose quinase (XK), a D-xilulose 5-P. A D-xilulose-5P é convertida da mesma maneira em bactérias e fungos, é convertida a gliceraldeído-3P e frutose-6P, ingressando na via da glicólise, chegando a piruvato que PE convertido a etanol e vários outros produtos (PITKÄNEN et al., 2003).

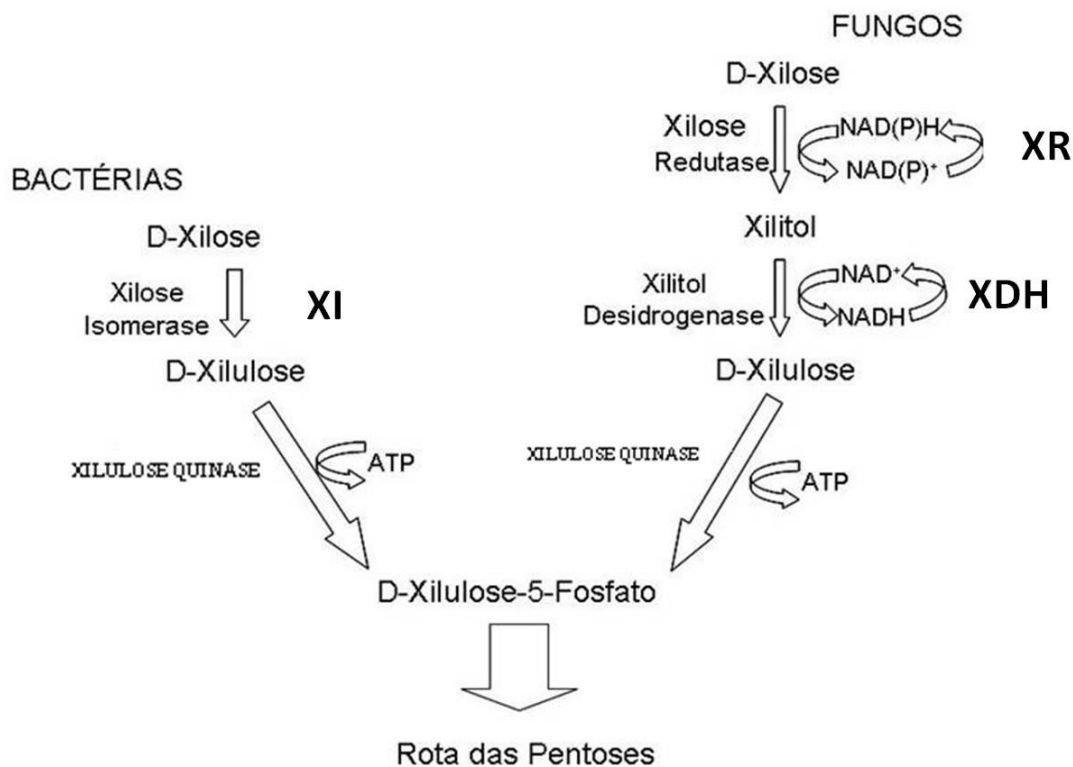


Figura 3. Rotas de conversão de D-xilose em D-xilulose-5-fosfato em bactérias e fungos.
Fonte: adaptado de Hahn-Hägerdal et al., 2004.

As duas primeiras enzimas dessa rota (XR e XDH) possuem cofatores distintos (redutases com preferência por NADPH e desidrogenases que utilizam apenas NAD⁺) (JEPPSON et al., 2002; SALEH et al., 2006) provocando, assim, um desequilíbrio redox e impedindo a utilização anaeróbica destes açúcares além de ser uma das principais causas de excreção de xilitol (PETSCHACHER e NIDETZKY, 2008). Por essa razão, em leveduras normalmente o metabolismo de pentoses ocorre por respiração ou a fermentação deve ocorrer em condições micro-aeróbicas com baixo rendimento, de difícil implantação em escala industrial (DAHN et al., 1996).

A construção de linhagens recombinantes de *E. coli* para produção de etanol foi uma das primeiras aplicações na engenharia metabólica, pois bactérias teriam várias vantagens para a produção de etanol, como a habilidade de fermentar um grande espectro de açúcares, não necessitar de fatores de crescimento complexos e vasto uso industrial conhecido, além de rápido metabolismo. Entretanto, produzem vários outros compostos como subprodutos, são pouco resistentes às condições industriais formando biofilmes que entopem as instalações, tem baixo rendimento de etanol, requerem pH neutro para crescimento, são menos robustas quando comparadas com leveduras e são tolerantes às altas concentrações de etanol (LIN e TANAKA, 2006). Essas desvantagens têm impossibilitado seu uso na produção de etanol industrialmente.

Pichia stipitis, *Candida shehatae* e *Pachysole tannophilus* são três leveduras reconhecidas como as melhores naturalmente fermentadoras de xilose. Entretanto, requerem níveis de oxigênio muito baixos e muito bem controlados para a produção máxima de etanol (DAHN et al., 1996). Também são muito sensíveis a inibidores metabólicos presentes em hidrolisados ricos em xilose, quando cultivadas nas condições ótimas de fermentação (SEDLAK e HO, 2001). Muitos microrganismos selvagens possuem rotas bioquímicas diferentes para a utilização de biomassa e conversão em produtos semelhantes aos biocombustíveis. Entretanto, tais seres vivos são muitas vezes distintos dos utilizados tradicionalmente e são ineficientes para utilização industrial (ALPER et al., 2009).

1.4 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

O principal organismo utilizado na produção industrial de álcool combustível é a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (INGLEDEW, 1993; SILVA-FILHO et al., 2005) por sua habilidade em produzir altas concentrações desse álcool, possuir alta tolerância a esse

composto (SALEH et al., 2006), resistência e robustez aos inibidores presentes nas altas concentrações de melão (BETTIGA et al., 2008; MATSUSHIKA et al., 2009), além de não exibir muitas das limitações fermentativas presentes nas bactérias (LIN e TANAKA., 2006).

A levedura *S. cerevisiae* é considerada segura para consumo humano (GRAS “generally recognized as safe”) pelo FDA (Food and Drug Administration) americano. Assim, pode ser utilizada como aditivo alimentício para humanos e animais, sendo ideal para produção de bebidas alcoólicas e para promover o crescimento de pães. No Brasil, durante o processo de produção de etanol nas usinas sucroalcooleiras foram selecionadas linhagens provavelmente entre linhagens inicialmente contaminantes que dominaram e persistiram no fermentador e que também se adaptaram ao processo de produção industrial de etanol. Estas linhagens apresentam ótimas habilidades fermentativas de sacarose de cana-de-açúcar e são chamadas leveduras residentes de dornas (WHEALS et al., 1999; BASSO et al., 2008).

De modo geral, leveduras consomem mono e dissacarídeos preferencialmente a qualquer outra fonte de carbono (LAGUNAS, 1993). *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* preferem realizar fermentação à respiração quando a concentração de glicose no meio excede 0,8 mM, mesmo sob condições aeróbicas (ROLLAND et al., 2002).

Embora vários microrganismos utilizem xilose como fonte de carbono (LIN e TANAKA, 2006), *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar a xilose (HAMACHER et al., 2002; MATSUSHIKA et al., 2009). Esta característica é surpreendente uma vez que o genoma desta levedura possui todos os genes necessários para a metabolização dessa pentose (TOIVARI et al., 2004) e já foi demonstrado que é possível selecionar linhagens de *S. cerevisiae* capazes de utilizar esta fonte de carbono (BATT et al., 1985; ATTFIELD e BELL, 2006). A incapacidade de *S. cerevisiae* em fermentar xilose foi atribuída à impossibilidade dessa levedura converter eficientemente esse substrato em xilulose, apesar de apresentar baixas atividades de XR e XDH (MATSUSHIKA et al., 2009).

Além disso, *S. cerevisiae* não reconhece xilose como uma fonte de carbono estritamente fermentável. Ao contrário, xilose é capaz de reprimir alguns genes que são reprimidos de forma catabólica, enquanto outros que são geralmente reprimidos em glicose mostram altos níveis de expressão na presença de xilose (HECTOR et al., 2008). Durante a evolução, *S. cerevisiae* não foi exposta à diferentes açúcares, à componentes aromáticos e às

condições adversas tipicamente presentes em meios resultantes da hidrólise de substratos lignocelulósicos (ALPER et al., 2009).

Os principais problemas observados em linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* construídas para fermentação de xilose foram: baixos teores de produção de etanol; necessidade de controle do metabolismo glicolítico; preferência por glicose; integração na utilização de cofatores necessários à fermentação eficiente, formação de diversos co-produtos, como xilitol (LIN e TANAKA, 2006), que competem com a produção de etanol; além do fato de que etapas importantes da conversão de piruvato a etanol ainda são pouco compreendidas (ELBING et al., 2004).

As inúmeras vantagens já apresentadas por *S. cerevisiae* para fermentação industrial de sacarose de cana-de-açúcar a etanol e a acessibilidade dos conhecimentos de sua genética (VAN MARIS et al., 2006), o emprego da engenharia metabólica para que esse microrganismo consiga realizar a fermentação de misturas de hexoses e pentoses, de forma eficiente, é uma estratégia bastante atrativa (JOJIMA et al., 2010).

1.5 Linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes para utilização da xilose

Em *S. cerevisiae*, a eficiente conversão de xilose em etanol é limitada por fatores como desbalanço redox intercelular, baixo fluxo de xilose para a rota da via das pentoses e falta de um eficiente transportador de xilose para dentro da célula (HECTOR et al., 2008). Uma vez que *S. cerevisiae*, é capaz de metabolizar xilulose, embora com baixa eficiência a primeira estratégia para melhorar a produção alcoólica a partir de xilose foi a inserção de genes codificadores de enzimas heterólogas, como xilose isomerase bacteriana (XI), capaz de converter xilose em xilulose, sem causar um desbalanço de cofatores. Essa estratégia já foi tentada muitas vezes com resultados decepcionantes (SARTHY et al., 1987; MOES et al., 1996; GARDONYI e HAHN-HÄGERDAL, 2003). A falta de sucesso dessas expressões heterólogas, com baixos níveis de atividade enzimática quando expressas, tem sido atribuída à modelação incorreta das proteínas, como modificações pós-transcricionais incorretas e formação de pontes dissulfeto e pH intracelular da levedura.

Uma exceção notável nessa linha de pesquisa foi a xilose isomerase da *Archaea Thermus thermophilus* (WALFRIDSSON et al., 1996). Essa foi a primeira XI funcionalmente expressa em *S. cerevisiae*. Entretanto, sua atividade enzimática em temperaturas que

permitiam o crescimento da levedura não é alta o bastante para uma eficiente fermentação de xilose. Mesmo quando todas as enzimas envolvidas na conversão de xilulose para a via glicolítica são superexpressas, a atividade da XI é muito baixa para o eficiente metabolismo de xilose (KARHUMAA et al., 2007b). Em outra pesquisa, o gene codificador de uma XI fúngica rara, de *Piromyces SP*, foi expresso em *S. cerevisiae*, resultando em altos níveis de atividade enzimática, quando comparada aos níveis de expressão das XI bacterianas (KATAHIRA et al., 2008). Todavia, mesmo sendo o organismo recombinante que tenha a maior velocidade de produção de etanol a partir de xilose como única fonte de carbono, misturas de glicose-xilose apresentam um padrão de diauxia, com baixo consumo da pentose na segunda fase exponencial (HARHANGI et al., 2003).

Após as tentativas com XI, muita atenção foi dada para a expressão de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XHD) de *P. stipitis* correspondendo aos genes *XYL1* e *XYL2*, em *S. cerevisiae* (GARDONYI e HAHN-HÄGERDAL, 2003a). Ao contrário das XI de *Archaea* e de *Bacteria*, esses genes eucarióticos poderiam ser funcionalmente expressos em *Saccharomyces*, possibilitando a essa levedura metabolizar xilose (KOTTER et al., 1990; KOTTER e CIRIACY, 1993). Entretanto, o rendimento de etanol da fermentação anaeróbica desse açúcar pelas linhagens recombinantes é cerca de uma a duas vezes menor quando em meio com glicose (JEFFRIES, 2006; MATSUSHIKA et al., 2009). Além disso, a fermentação anaeróbica de xilose é sempre acompanhada por considerável produção de xilitol, já que esse subproduto é a única forma das leveduras oxidar NAD(P)H nessas condições e a célula não consegue obter suficiente NAD⁺ para a atividade de XDH (TOIVARI et al., 2004).

Em condições de anaerobiose com xilose como fonte de carbono, não há regeneração de NAD⁺ suficiente para a reação da XDH (GARDONYI et al., 2003b; GUO et al., 2006). Se a célula não conseguir manter seu balanço redox, não irá fermentar tal substrato sob condições anaeróbicas. Além disso, sob condições aeróbicas, tal recuperação na mitocôndria, provavelmente, limita o metabolismo de xilose, quando não há glicose no meio (PITKÄNEN et al., 2003).

Uma elegante saída para este problema foi a expressão em *S. cerevisiae*, de uma XDH mutada com especificidade incrementada para o cofator NADP⁺ (WATANABE et al., 2004), ou de uma XR mutada, com maior especificidade para NADH (JEPPSSON et al., 2002). A introdução de uma XR dependente de NADH reduziu a excreção de xilitol, provavelmente, devido ao restabelecimento do balanço redox intercelular (SALEH et al., 2006). Petshacher et

al. (2005) foram capazes de mudar a preferência do cofator da XR de uma linhagem de *Candida tenuis*, de NADPH para NADH, empregando mutação sitio-dirigida. Verho et al., em 2003 obtiveram uma linhagem com múltiplas cópias de XDH com eficiência catalítica dependente de NADP⁺ que superou mais de 3.8 vezes a eficiência correspondente à linhagem selvagem que utiliza NAD⁺. Apesar dessas vantagens teóricas, a expressão destas enzimas resultou em grande impacto negativo no fluxo metabólico de produção de etanol por linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes (WAHLBOM et al., 2001; JIN e JEFFRIES, 2003).

Em outro trabalho, foi construída uma linhagem de *P. stipitis* que superexpressava xiluloquinase (XK - terceira enzima na via do metabolismo de xilose), pois nessa levedura a atividade dessa enzima é baixa. Esta linhagem recombinante que superexpressa essa enzima, comparada com a linhagem com expressão basal, aumentou drasticamente o nível de captação de xilose, além de aumentar também o rendimento de produção de etanol e diminuir a produção de xilitol (TOIVARI et al., 2001). Entretanto, altos níveis de XK na célula inibem o metabolismo para produção de etanol (JIN et al., 2003). Dessa maneira, é necessário conhecer a fisiologia da célula e quantificar o efeito que modificações genéticas individuais causam nas vias metabólicas (JOHANSSON et al., 2001).

Uma linhagem *S. cerevisiae* recombinante contendo cópias adicionais do gene da XK endógeno e os genes XR e XDH de *P. stipitis* (ELIASSON et al., 2000; JEPPSON et al., 2002) é capaz de fermentar xilose em etanol e também de realizar co-fermentação de xilose e glicose no meio, mas mesmo com a expressão bem sucedida das três enzimas em conjunto, a taxa de utilização de xilose é ainda baixa e o rendimento de conversão pobre, devido ao acúmulo de xilitol (SALEH et al., 2006).

A taxa de consumo de xilose da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* mais eficiente ainda é menor que de glicose e gradualmente diminui, com a diminuição da concentração de xilose (RUNQUIST et al., 2009). Como resultado, o consumo completo de xilose em substratos com açúcares mistos é difícil (JOJIMA et al., 2010). Isso é uma desvantagem já que nos hidrolisados de biomassa celulósica a composição de xilose é muito maior que a de glicose (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). Além disso, existem outros desafios microbiológicos para melhoria da produção de etanol, como a necessidade de se entender e manipular a tolerância por etanol e açúcar e a resistência aos inibidores gerados nos tratamentos de pressacarificação (RAGAUSKAS et al., 2006).

1.6 Sistema de transportadores de açúcares em *S. cerevisiae*

Em *S. cerevisiae* o transporte pela membrana plasmática é o primeiro e obrigatório passo para a utilização de hexoses (BOLES e HOLLENBERG, 1997). Essa levedura tem o maior número de transportadores de glicose de todos os microrganismos cujos genomas foram sequenciados (MAIER et al., 2002). Nesse organismo as hexoses entram para o metabolismo celular por difusão facilitada através da membrana plasmática, sem gasto de energia (LAGUNAS, 1993; KRUCKEBERG, 1996; VAN SUYLEKOM et al., 2007). O transporte desses açúcares é mediado por uma família de transportadores de monossacarídeos (RINTALA et al., 2008) pertencentes a superfamília (Major Facilitator Superfamily-MSF) de genes responsáveis pelo transporte de moléculas (ELBING et al., 2004).

Nessa classificação, estão presentes cerca de 20 genes dos quais *HXT1-HXT17*, *GAL2*, *SNF3* e *RGT2* foram identificados (BUZIOL et al., 2008; ROSSI et al., 2010). Sete das proteínas codificadas por esses genes estão ligadas ao metabolismo de captação de glicose, frutose e manose para o crescimento (*HXT1-7*), oito catalizam o transporte apenas em quantidades muito pequenas (*HXT8-11* e *HXT13-HXT17*) (VERWAAL et al., 2002); duas, codificadas pelos genes *SNF3* e *RGT2*, são sensores de glicose extracelular (SALUSJÄRVI et al., 2008) e estão envolvidas na regulação de expressão dos genes de transporte de hexoses (ROLLAND et al., 2002); duas estão envolvidas no processo pleiotrópico de resistência a drogas (*HXT9* e *HXT11*) (BOLES e HOLLENBERG, 1997).

As sequências das 20 proteínas de Hxt foram obtidas e alinhadas entre si, verificando-se que estas proteínas são conservadas em quase toda sua extensão. O grande número de genes da família *HXT* é claramente devido a múltiplas duplicações genéticas. Muitas dessas duplicações ocorreram por recombinação dentro das regiões subtelo méricas. Os genes *HXT1*, *HXT4* e *HXT5* são encontrados no braço direito do cromossomo VIII e os genes *HXT3*, *HXT6* e *HXT7* no braço direito do cromossomo IV. As proteínas codificadas pelos genes *HXT6* e *HXT7* são virtualmente idênticas (KRUCKEBERG, 1996). As proteínas Hxt apresentam 12 segmentos transmembrânicos altamente homólogos entre si (VERWAAL et al., 2004), tem regiões bastante hidrofóbicas intercaladas por regiões pouco hidrofóbicas ou hidrofílicas (KRUCKEBERG, 1996). Os terminais carboxila e amina são hidrofílicos e ficam no lado citosólico da membrana. As menores similaridades encontram-se nas regiões que permanecem intracelulares do terminal amina (VAN SUYLRKOM et al., 2007).

A etapa de captação de açúcares é o passo-chave da regulação no metabolismo desses compostos e a taxa de transporte é dependente do fluxo metabólico, disponibilidade de nutrientes e o número de proteínas presentes na membrana das células (KRUCKEBERG, 1996). Vários autores concluíram que a assimilação de substratos através da membrana é o passo limitante também na fermentação dos açúcares por *S. cerevisiae*, incluindo hexoses, maltose e maltotriose, normalmente fermentados de forma eficiente por esta levedura (ZASTROW et al., 2001; GOFFRINI et al., 2002; PEREZ et al., 2004). Além desses fatores, a captação é um dos maiores problemas a ser vencido para desenvolver leveduras capazes de fermentar eficientemente as pentoses (TOIVARI et al., 2001; GARDONY et al., 2003; HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; STEPHANOPOULOS, 2007). Mesmo na levedura *P. stipitis*, que é naturalmente capaz de fermentar xilose em etanol, a etapa limitante deste processo também é o transporte de xilose na célula (KIM et al., 1999).

Uma vez que ainda não foi descoberto um sistema de transporte específico para as pentoses (BERTILSSON et al., 2008), acredita-se que a captação de xilose por leveduras seja mediada de forma não específica pelos transportadores de hexoses (HAMACHER et al., 2002; RUNQUIST et al., 2010). Reifenberger et al. (1995) construíram uma linhagem *S. cerevisiae* com mutações nos genes *HXT1-HXT7* que era incapaz de crescer em glicose, frutose ou manose e não transportava glicose a taxas detectáveis. Entretanto, a expressão isolada de apenas um dos genes *HXT1*, *2*, *3*, *4*, *6* ou *7* foi suficiente para uma considerável utilização de glicose, mas a níveis de captação diferentes. Esse trabalho foi confirmado por outros pesquisadores (MAIER et al., 2002).

Em linhagens recombinantes *S. cerevisiae* com os genes *HXT* deletados que expressavam independentemente cada um dos diversos transportadores de hexoses, foi verificado que a expressão de *HXT5* ou de *HXT7* é substancialmente mais efetiva para promover a utilização de xilose. Assim, concluiu-se que os produtos gênicos de *HXT7* > *HXT5* > *GAL2* > *WT* > *HXT1* > *HXT4* captam xilose mais eficientemente para dentro das células (HAMACHER et al., 2002; SEDLAK e HO, 2004).

As leveduras, assim como outros organismos unicelulares de vida livre, se adaptam à concentração de fonte de carbono existentes no meio, através da expressão do sistema de transporte (PITKÄNEN et al., 2003). Os genes *HXT* diferem entre si quanto à regulação transcricional e pós-transcricional, especificidade de substrato e afinidade por glicose (BATISTA et al., 2004; KUYPER et al., 2006). As diferenças nas cinéticas das proteínas

refletem as afinidades pelo substrato de cada transportador de hexose sob diferentes concentrações de glicose ou de outros açúcares (YE et al., 2001).

Os parâmetros cinéticos de cada proteína transportadora de hexoses foi determinada em linhagem mutada com os genes *HXT* deletados. As proteínas Hxt1 e Hxt3 são transportadores de glicose de baixa-afinidade ($K_{m(\text{glicose})}$: 50-100mM); Hxt2 e Hxt7 são moderadamente baixos ($K_{m(\text{glicose})}$ cerca de 10mM) e Hxt6 e Hxt7, assim como Gal2, são transportadores de alta afinidade ($K_{m(\text{glicose})}$: 1-2mM) (REIFENBERGER et al., 1997; SEDLAK e HO, 2004). Hamacher et al. (2002) consideraram Hxt4 e Hxt5 como transportadores de afinidades moderadamente baixas para glicose, assim como Hxt2 e Hxt7. A preferência dos transportadores para xilose é bem menor que para glicose (KOTTER e CIRIACY, 1993; LEE et al., 2002), sendo cerca de 5-200 vezes mais baixo (BERTILSSON et al., 2009). De um modo geral, os valores de K_m para o transporte de xilose varia entre 130 mM a 1,5 mM (PITKÄNEN et al., 2005), e a captação de xilose é fortemente reprimida por glicose, por causa da competição pelo mesmo transportador (SEDLAK e HO, 2004).

Assim, é afirmado pelos pesquisadores que o consumo de xilose somente é iniciado quando a glicose é totalmente consumida do meio (BERTILSSON et al., 2008). Dessa forma, as afinidades dos transportadores para xilose pode ser um fator crucial para o consumo de xilose (KUYPER et al., 2005). Além disso, em diferentes linhagens de levedura, diferentes fatores podem contribuir para limitar a fermentação de xilose, e a captação de xilose pode ser um desses fatores (HAMACHER et al., 2002). Apesar do transporte de xilose em *S. cerevisiae* recombinante ser extensamente estudado, até este momento obteve-se apenas uma melhora moderada na capacidade fermentativa desse açúcar (RUNQUIST et al., 2009).

Hamacher et al. (2002), verificaram que a expressão de transportadores heterólogos não foi suficiente para restabelecer o crescimento de *S. cerevisiae* em meio sintético com 2% de xilose, indicando que essas proteínas não foram capazes de realizar a captação de xilose para dentro das células. Embora alguns transportadores de xilose heterólogos já tenham sido expressos com sucesso em *S. cerevisiae* permitindo o crescimento nesta fonte de carbono, até o presente não existem dados que permitam verificar que a eficiência da fermentação de xilose foi incrementada nestas linhagens recombinantes (LEANDRO et al., 2006; SALOHEIMO et al., 2007).

A partir desse conhecimento, foi realizado no presente trabalho a superexpressão de dois transportadores de monossacarídeos (*HXT5* e *HXT7*) sob regulação do promotor de expressão PGK fortemente expresso em linhagem de *S. cerevisiae*. A melhoria na captação de glicose e xilose, como fontes de carbono únicas e a produção de etanol foram analisadas. O conhecimento gerado consiste numa contribuição para a obtenção de novas linhagens selvagens de *S. cerevisiae* recombinantes com potencial de emprego na produção industrial de etanol, contribuindo para a otimização dos processos fermentativos atuais, e também futuros que venham a utilizar pentoses para produção de etanol a partir da fração hemicelulósica da biomassa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste projeto é isolar microrganismos naturalmente capazes de utilizar e fermentar pentoses e obter linhagens de levedura superexpressando transportadores endógenos de hexoses *HXT5* e *HXT7* e, assim, melhorar suas capacidades de fermentação de açúcares a etanol.

2.2 Objetivos específicos

- Isolamento e seleção de leveduras selvagens naturalmente capazes de crescer e fermentar xilose como fonte de carbono;
- Construção de vetores de expressão dos genes *HXT5* e *HXT7* de *S. cerevisiae*;
- Transformação genética de linhagens de levedura *S. cerevisiae* de laboratório;
- Análise do consumo de açúcares xilose e glicose e da produção de etanol dos clones recombinantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios e soluções

Para o preparo de meios e soluções foram utilizados reagentes de pureza analítica, dos fornecedores “Sigma” ou “Merck” e água deionizada. Foram esterilizados a 121 °C, durante 20 minutos, ou, quando necessário, filtrados em membrana do tipo “Millipore” de poro 0,22 µm. Todas as soluções foram preparadas de acordo com Sambrook e Russel (2001).

3.1.1 Meios para bactérias

Para a preparação de bactérias eletrocompetentes, foi utilizado o meio 2xYT (1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl). O meio utilizado para recuperação das bactérias após a eletroporação foi SOC (para volume de 100 ml: 1 ml de glicose 2M, 1 ml de Mg²⁺ e meio SOB para completar o volume). Para o meio SOB: 2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM de MgSO₄. As bactérias recombinantes foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) com ampicilina em concentração final de 100µl/ml. Para meios sólidos, acrescentou-se 2% de Bacto-ágar.

3.1.2 Meios para leveduras

Para o isolamento de leveduras selvagens capazes de crescer em xilose, foi utilizado o meio **SX-1** contendo 0,67% de YNB e 1% xilose. Para verificar a capacidade de fermentação e utilização do açúcar presentes foram utilizados os meios: **SX-2**, com 0,67% de YNB, 2% de xilose e 100µl/ml de; **SH-2** com 0,67% de YNB, 2% de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e 100µl/ml de ampicilina; **SX-1,5** com 0,67% de YNB, 1,5% de xilose e 0,5% de glicose e 100µl/ml de ampicilina.

O meio completo utilizado para leveduras foi **YPD** contendo 2% de peptona, 1% de extrato de levedura e 2% de glicose e **YPX** contendo 2% de peptona, 1% de extrato de levedura e 2% de xilose. Para a transformação e posteriores análises dos clones recombinantes, foram utilizados os meios **SD/SX-THUAL-2** (0,67% de YNB acrescidos dos aminoácidos triptofano, lisina, adenina e histidina e da base nitrogenada uracila e 2% da fonte de carbono - glicose ou xilose) ou **SD/SX-THUAL-5** (diferenciando-se pela concentração de 5% da fonte de carbono – glicose ou xilose).

Quando utilizados tubos Durhan, foi acrescentado ao meio o indicador de pH azul de bromotimol (BTB) com o objetivo de facilitar a verificação da ocorrência de fermentação. Com esse reagente é possível visualizar três mudanças em pH do meio. Quando a coloração é azul, o meio está alcalino, quando está verde, é neutro e meio amarelo, pH ácido.

Foi utilizado hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar rico em pentoses (principalmente xilose) cedido gentilmente pelo Dr. Daniel Atala, do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

3.1.3 Soluções

Para a preparação de bactérias eletrocompetentes foi utilizado solução de glicerol a 10%, a 4 °C. Para a extração de plasmídeos foram utilizadas três soluções: Solução I (5 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 8,0; 2 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0; 10 ml de glicose 0,5 M e água deionizada estéril para completar volume de 100 ml); Solução II (1 g de SDS, 20 ml de NaCl 1M e água deionizada estéril para completar volume de 100 ml) e Solução III (11,6 ml de Ácido Acético Glacial, 60 ml de Acetato de Potássio e água deionizada estéril para volume de 100 ml).

Para a extração de DNA total de levedura, foi utilizado o seguinte tampão de lise de célula: 2% Triton X-100; 1% SDS; 100mM NaCl; 10mM Tris-HCl pH 8,0 e 1mM EDTA pH 8,0. Para a transformação de leveduras, foram preparadas soluções de acetato de lítio a 1 M e a 0,1M. Os estoques dos aminoácidos triptofano, lisina, adenina e histidina e da base nitrogenada uracila de 3 mg/ml e utilizada concentração final de 40 ug/ml.

3.2 Plasmídeos utilizados

Para clonagem dos genes foram utilizados os plasmídeos comerciais pGEM-T (Vector Systems, Promega) e p.C.R. 2.1 TOPO (Invitrogen), como vetores intermediários. O plasmídeo bifuncional pMA91 foi utilizado na construção final para superexpressão dos genes. Este plasmídeo contém o promotor e o terminador do gene fosfoglicerato quinase (PGK) de *Saccharomyces cerevisiae*, um promotor constitutivo fortemente expresso nestas células. Todos os plasmídeos utilizados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Plasmídeos utilizados como vetores de clonagem e/ou transformação gênica.

Plasmídeos	Descrição	Referência/Procedência
pGEM-T	plasmídeo de clonagem comercial, <i>lacZ</i> , Ap ^R	Vector Systems, Promega
pCR 2.1 TOPO	plasmídeo de clonagem comercial, <i>lacZ</i> , Ap ^R	Invitrogen
pMA91	plasmídeo bifuncional de expressão de <i>S. cerevisiae</i> , Amp ^R , 2 μ , <i>LEU2</i> , pPGK e tPGK	MELLOR et al., 1983
pGEMTHXT5	plasmídeo de clonagem e expressão <i>E. coli</i> , contendo o gene <i>HXT5</i>	Este trabalho
pTOPOHXT7	plasmídeo de clonagem e expressão <i>E. coli</i> , contendo o gene <i>HXT7</i>	Este trabalho
pMAHXT5	plasmídeo bifuncional de expressão de <i>HXT5</i>	Este trabalho
pMAHXT7	plasmídeo bifuncional de expressão de <i>HXT7</i>	Este trabalho

3.3 Microrganismos utilizados

A linhagem bacteriana DH5 α (MESELSON e YAN, 1968) foi utilizada para hospedar as construções dos plasmídeos recombinantes. As linhagens laboratoriais de levedura utilizadas foram S288C, YPH 250, YPH 252 e YPH 274. As linhagens de leveduras isoladas em usinas brasileiras de álcool foram: PE-2, CAT-1, BG-1 e SA-1 (BASSO et al., 2008). Os meios inoculados com bactérias foram cultivados em temperatura de 37 °C e os meios inoculados com leveduras foram cultivados em 28 °C. As linhagens de microrganismos utilizadas neste trabalho encontram-se estocadas no banco de Linhagens do Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Todas as linhagens utilizadas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Microrganismos utilizados neste trabalho.

Linhagem de bactéria <i>E. coli</i>	Genótipo ou Descrição	Referência
DH5α	F ['] / <i>endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>glnV44 thi</i> ⁻¹ <i>recA1 gyrA</i> (Nal ^r) <i>relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR</i> (Φ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>LacZ</i>) M15	MESELSON e YAN, 1968
Linhagem de bactéria <i>E. coli</i>	Genótipo ou Descrição	Referência
S288C	MAT α <i>mal13 AGT1 MAL12 mal33 MAL31 MAL32 mel gal2 SUC</i>	MORTIMER e JOHNSTON, 1986
PE-2	Utilizada na produção de etanol combustível	BASSO et al., 2008
CAT-1	Utilizada na produção de etanol combustível	BASSO et al., 2008
BG-1	Utilizada na produção de etanol combustível	BASSO et al., 2008
SA-1	Utilizada na produção de etanol combustível	BASSO et al., 2008
YPH 250	MAT α , <i>ura3-52, lys2-801^{amber}, ade2-101^{ochre}, trp-Δ1, his2-Δ200, leu2-Δ1, CAN1, G418^s</i>	SIKORSKI e HIETER, 1989
YPH 252	MAT α , <i>ura3-52, lys2-801^{amber}, ade2-101^{ochre}, trp-Δ1, his2-Δ200, leu2-Δ1, CAN1, G418^s</i>	SIKORSKI e HIETER, 1989
YPH 274	MAT α /MAT α , <i>ura3-52/ura3-52, lys2-801^{amber}/lys2-801^{amber}, , ade2-101^{ochre}/ade2-101^{ochre}, trp-Δ1/ trp-Δ1, his2-Δ200/his2-Δ200, leu2-Δ1/leu2-Δ1, CAN1/CAN1, G418^s</i>	SIKORSKI e HIETER, 1989

3.4 Isolamento e seleção de levedura capazes de crescer ou fermentar xilose como fonte de carbono

Para o isolamento de leveduras de diversos substratos (solo, frutas e flores) da biodiversidade brasileira foi verificada a capacidade de crescer em meio mínimo, contendo xilose como principal fonte de carbono. As amostras foram incubadas em erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio SX-1 e incubados em shaker, a 28 °C, por 48 horas. Após esse período, 100 µl de cada amostra foram inoculados em 10 ml do mesmo meio e realizada incubação nas mesmas condições, por 48 horas. As amostras que apresentaram crescimento foram transferidas para meios sólidos SX-1, a fim de se obter colônias isoladas.

Para verificar a capacidade fermentativa de xilose ou do hidrolisado bagaço de cana-de-açúcar, cada uma das leveduras isoladas foi inoculada em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio SX-2, SH-2 e SX-1,5. As culturas foram monitoradas por até 72 horas para verificação da ocorrência de fermentação.

3.5 Extração do DNA total de levedura

As extrações de DNA total foram adaptado de Guimarães et al. (2005). As células foram crescidas em 5 ml de meio YPD líquido por 24 horas. Foram centrifugadas a 4.500 g durante 5 minutos. O pellet foi ressuspensão em 1,5 ml de água deionizada estéril e as células foram submetidas à nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. As células foram ressuspensas em 200 µl de tampão de lise; adicionado *glass beads* estéreis e 200 µl de solução fenol-clorofórmio (1:1). Os tubos foram agitados e foram acrescentados 200 µl de tampão Tris – EDTA pH 8,0 seguido de homogeneização por inversão. Foi realizada nova centrifugação a 10.000 g durante 5 minutos. A fase aquosa foi recolhida para um novo tubo e foram acrescentados 400 µl de clorofórmio. Foi realizada homogeneização por inversão. O processo de centrifugação foi repetido, nas mesmas condições anteriores. Foi recolhida a fase aquosa para um tubo novo. Foram acrescentados 1 ml de etanol absoluto, realizada homogeneização por inversão e nova centrifugação a 10.000 g durante 2 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspensão em 1 ml de etanol 70% (v/v) e centrifugado a 10.000 g, durante 2 minutos. Após secagem do DNA, este foi ressuspensão em 400 µL de solução tampão Tris – EDTA pH 8,0 contendo uma concentração final de 2 µg/ ml

RNaseA e incubado a 37 °C, durante 30 minutos. Este processo foi repetido desde a primeira etapa da adição do clorofórmio até a secagem completa do DNA. O DNA foi ressuspensão em 20 µl de solução tampão Tris – EDTA pH 8,0 e mantido a 4 °C.

3.6 Oligonucleotídeos iniciadores

Foram construídos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação das sequências estruturais dos genes *HXT5* e *HXT7* de *S. cerevisiae* a partir da sequência do genoma da levedura laboratorial S288C, disponível no sítio *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Esses oligonucleotídeos estão ladeados pelo sítio de restrição reconhecido pela enzima de restrição *BgIII*.

Para amplificação dos cassetes de expressão, oligonucleotídeos correspondentes ao início do promotor de PGK e ao final do terminador de PGK foram construídos. Para sequenciamento das construções, foram sintetizados oligonucleotídeos internos, nas sequências de *HXT5*, *HXT7*, do promotor de PGK e terminador de PGK. Todos os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5- Oligonucleotídeos utilizados e construídos neste trabalho.

Nome	Sequência (5'→3')	Finalidade	Tamanho do amplicon
<i>hxt5.1</i>	GGAAGATCTTTATTTTCTTTAGTGAACATCCT	Amplificação do gene <i>HXT5</i> , ladeado pela sequência da enzima de restrição <i>BgIII</i>	1.779 pb
<i>hxt5.2</i>	GGAAGATCTATGTCGGAACCTGAAAACGC		
<i>hxt7.1</i>	GGAAGATCTATGTCACAAGACGC	Amplificação do gene <i>HXT7</i> , ladeado pela sequência da enzima de restrição <i>BgIII</i>	1.713 pb
<i>hxt7.2</i>	GGAAGATCTTTATTTGGTGCTGAAC		
<i>hxt int.1</i>	CATTTGGCCATAATCTGG	Sequenciamento para análise dos genes amplificados	740 pb
<i>hxt int.2</i>	CGTGGAGACTCTGGAAC		
<i>PGK.1</i>	GTCGACAAGCTTTCTAACTGATCTATCCAAAACCTG	Sequenciamento para análise do promotor e terminador PGK	1.866 pb
<i>PGK.2</i>	GTCGACAAGCTTTAACGAACGCAGAATTTTCGAG		
<i>PGK int.1</i>	AGATCTTTTGGTTTTATATTTGTTG	Sequenciamento para análise do promotor e terminador PGK	815 pb
<i>PGK int.2</i>	CGAAATTGGAAGCTGCAATCAATAG		

3.7 Programas utilizados para Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

As condições de amplificação dos fragmentos de *HXT5* e *HXT7* foram: 1) um passo inicial de desnaturação a 94 °C, por 2 minutos; 2) 35 ciclos compostos por: desnaturação a 94 °C, por 30 segundos; anelamento a 45 °C (*HXT5*) ou 38 °C (*HXT7*), por 2 minutos; extensão a 68 °C, por 2 minutos; e 3) um passo final de 10 minutos, a 68 °C, para finalizar todas as extensões incompletas.

As condições de amplificação para os cassetes de expressão *pPGK*HXT(x)*tPGK* foram: 1) um passo inicial de desnaturação a 95 °C, por 5 minutos; 2) 30 ciclos compostos por: desnaturação a 95 °C, por 60 segundos; anelamento a 58 °C, por 1 minuto; extensão a 72 °C, por 2 minutos; e 3) um passo final de 10 minutos, a 72 °C, para finalizar todas as extensões incompletas.

3.8 Preparação de bactérias eletrocompetentes

Para a preparação de células de *E. coli* eletrocompetentes foi seguido o protocolo de Sambrook e Russel (2001). Células da linhagem de *E. coli* DH5 α foram inoculadas em meio 2xYT, e o cultivo foi incubado a 37° C em shaker, a 160 rpm. Desta pré-cultura 10 ml foram transferidos para 1 litro do mesmo meio e levado em agitador automático sob as mesmas condições até atingir Absorbância a 600 nm de 0,2 a 0,25.

Após esse período, as células foram centrifugadas a 13.000 g por 10 minutos a 4° C. O sedimento formado foi ressuspensão em 50 ml de glicerol 10% e centrifugado novamente a 13.000 g a 4° C por 30 minutos. Essa operação foi repetida três vezes. O sedimento da última etapa foi ressuspensão em 1 ml de glicerol 10% e acrescentado maior volume dessa solução até as células atingirem Absorbância a 600 nm de 0,15 ($Abs_{600}=0,15$). A suspensão foi dividida e armazenada em ultra-refrigeração, a -70 °C.

3.9 Transformação de *E. coli*

Para transformações de *E. coli*, foi empregado o protocolo de Taketo et al. (1988). O método utilizado para transformação de bactérias foi eletroporação. As bactérias competentes preparadas conforme descrito no item anterior foram retiradas do ultrarefrigerador a -70 °C e incubadas em gelo por 10 minutos para descongelamento. Foram adicionados às células, 3 µl de plasmídeo ou da mistura de ligação a ser utilizada. Foi realizado controle negativo, no qual não foi colocado DNA. Após 5 minutos, cada mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação (previamente esterilizada com luz ultravioleta e refrigerada). Foi aplicado um pulso de 2,5 mV.

Após a eletroporação, as células foram recuperadas em 1 ml de meio SOC e incubadas em estufa, a 37 °C, por 1 a 2 horas. Em seguida, as células foram semeadas em meio sólido seletivo adequado e incubadas em estufa, a 37 °C, por 16-18 horas.

3.10 Extração de DNA plasmidial

Para a extração de DNA plasmidial foi empregado protocolo de Sambrook e Russel (2001). Para a extração de plasmídeos de bactéria, as linhagens contendo os plasmídeos desejados foram inoculadas em 5 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de. As culturas foram incubadas com agitação em shaker, a 37 °C por 24 horas. As culturas foram transferidas para tubos estéreis de microcentrífuga e centrifugadas por 5 minutos, a 10.000 g, a temperatura de 4 °C.

Em seguida, as células foram ressuspensas em 300 µl de solução I. Foram adicionados 300 µl de solução II, realizada incubação por 5 minutos, a temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 300 µl de solução III, realizada homogeneização, seguida de incubação em gelo por, no mínimo, 15 minutos. Então, as células foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 g a 4 °C. Os sobrenadantes foram recuperados para novo tubo de microcentrífuga estéril e a cada tubo foi adicionado 1 µl de solução de Ribonuclease A (10 µg/ml) para cada 100 µl de sobrenadante. Essas misturas foram incubadas em estufa, a 37 °C, por 30 minutos.

Posteriormente, foram adicionados 400 µl de solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), misturado vigorosamente e realizada centrifugação por 5 minutos a 10.000 g a 4 °C. A fase aquosa superior foi transferida para novo tubo de microcentrífuga estéril. A este material recuperado foram adicionados 700 µl de isopropanol. As misturas foram incubadas em -20 °C por no mínimo, 30 minutos. Após esse período, foram centrifugadas por 30 minutos, a 10.000 g a 4 °C. Os sedimentos foram lavados com álcool 70%, secos e ressuspensos em 20 µl de água deionizada estéril.

3.11 Tratamento de DNA plasmidial com enzimas de restrição

As misturas de digestão de DNA com enzimas de restrição foram realizadas em volumes finais de 10 µl ou 100 µl. Utilizou-se, em média, 1 a 2 U de enzima para cada µg de DNA. As incubações foram realizadas na temperatura de 37 °C, com incubação de 3 horas (mínimo) a 16 horas (máximo). As enzimas de restrição e outras empregadas neste trabalho para manipulação de DNA (T4 DNA ligase, fosfatase alcalina) foram adquiridas das empresas Fermentas®, Invitrogen®. Todas as enzimas foram utilizadas com seus respectivos tampões, de acordo com os protocolos enviados pelos fabricantes.

3.12 Análise de fragmentos de DNA em gel de agarose

Para analisar a pureza ou o tamanho de fragmentos de DNA, foram realizadas análises dos seus perfis de migração em géis de agarose submetidos a corridas eletroforéticas. Foram empregados géis de agarose “Ultra pure” Sigma (Cod A4718) 0,8% em tampão de TBE 0,5 X (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) e 0,2 µg/ml de brometo de etídeo. As corridas eletroforéticas foram realizadas com tampão de corrida TBE 0,5 X. A visualização das bandas foi realizada empregando-se transluminador contendo lâmpada ultravioleta, e a fotodocumentação empregando-se o aparelho “Eagle-Eye” da “Stratagene”, modelo “Eagle-Eye II”.

Os marcadores de tamanho molecular de DNA, utilizados como referência nas corridas eletroforéticas para as análises dos fragmentos de DNA, obtidos após a digestão com as enzimas de restrição, foram de procedência da Fermentas ®.

3.13 Purificação de fragmentos de DNA de gel de agarose

Os fragmentos de DNA obtidos por digestão ou por amplificação por PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose. O fragmento de DNA que apresentava o perfil de migração desejado foi recortado e transferido para tubo de microcentrífuga. Para purificação do fragmento de DNA desejado, empregou-se o “Kit Prep – A Gene – DNA Purification System/Bio-Rad Laboratories”.

3.14 Ligação entre fragmentos de DNA

As ligações entre os fragmentos de DNA foram realizadas empregando-se a enzima DNA ligase do fago T4, que catalisa a ligação fosfodiéster entre a terminação 5'-fosfato e a terminação 3'-hidroxi das fitas de DNA, promovendo a recircularização do plasmídeo, ou a ligação entre fragmentos de DNA.

As concentrações de DNA (vetor/inserto) utilizadas nos sistemas de ligação variaram de acordo com o experimento. Normalmente, a proporção molecular de inserto foi de três vezes a do vetor. A mistura de ligação foi preparada e incubada empregando-se as recomendações do fabricante da enzima DNA ligase de fago T4, Invitrogen®.

3.15 Seqüenciamento de DNA

Para obter a seqüência de fragmentos de DNA o fragmento de DNA foi obtido a partir de extrações plasmidiais, ou resultado de amplificação por PCR e oligonucleotídeos iniciadores especificamente desenhados neste trabalho para essa finalidade.

As reações de amplificação por PCR para seqüenciamento e o seqüenciamento foram realizadas no Centro de Genoma Humano da USP. Para tanto, em cada caso, foram enviados o fragmento de DNA desejado e os oligonucleotídeos iniciadores específicos para obtenção do amplicon.

3.16 Transformação de levedura *S. cerevisiae*

Para transformação de levedura *S. cerevisiae* foi empregado protocolo de Gietz et al. (2002). Para a transformação das linhagens de levedura laboratoriais, uma colônia de cada linhagem de interesse foi inoculada em 5 ml de meio YPD e a cultura foi incubada em shaker a 28 °C por 24 horas. Após esse período, 20 µl do pré-cultivo foram inoculados em 10 ml do mesmo meio de cultura, até atingir a Absorbância a 600 nm de 0,4-0,5. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3.800 g, por 5 minutos, a temperatura ambiente.

O sedimento foi ressuspensão em 1 ml de água estéril e a suspensão foi centrifugada a 10.000 g, por 30 segundos, em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 1 ml de acetato de lítio 0,1M, seguido de centrifugação a 10.000 por 30 segundos em temperatura ambiente. Esta etapa foi repetida uma vez. Ao sedimento de células foram adicionados 240 µl de solução PEG 4.000 50%, 36 µl de solução de acetato de lítio 1M, 25 µl de DNA de esperma de salmão e 50 µl da suspensão de DNA do plasmídeo de interesse.

A suspensão foi agitada vigorosamente em “vortex” e incubada a 28 °C, por 30 minutos, sem agitação. Em seguida, foi realizado choque térmico a 42 °C, por 30 minutos, sem agitação. Foi realizada centrifugação a 10.000 g por 30 segundos a temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 500 µl de água estéril. As células foram semeadas em meio sólido seletivo SD-2 THUAL.

3.17 Análise da capacidade de fermentação dos clones em tubos Durhan

Para analisar rapidamente e de forma qualitativa a capacidade de fermentação de glicose dos clones transformantes que superexpressavam as proteínas transportadoras de açúcares, colônias das linhagens *S. cerevisiae* foram pré-cultivadas em meio SD-2 THUAL líquido e incubadas a 28 °C em shaker. Após cerca de 30 horas, 600 µl desta pré-cultura foram inoculados em tubos Durhan com 6 ml de meio SD-2 THUAL acrescidos de azul de bromotimol (BTB). A capacidade fermentativa em cada tubo foi monitorada por 72 horas e caracterizada pela formação de bolhas, além da mudança de coloração do meio.

Para testar a capacidade de fermentação de xilose dos clones, o mesmo procedimento foi realizado empregando-se o meio SX-2 THUAL também acrescido de BTB.

3.18 Análise da capacidade de fermentação dos clones em meio sólido contendo púrpura de bromocresol

Para se comparar a capacidade fermentativa dos clones recombinantes, de forma qualitativa, 1 ul de cada cultivo foi inoculado em placas contendo os meios sólidos YPD-2, YPD-5, YPX-2, YPX-5, acrescidos com púrpura de bromocresol (BCP), um indicador de pH. Esse possui coloração violeta bastante escuro quando o pH do meio está acima de 6.8 e cor amarela em pH abaixo de 5.2.

3.19 Condições de cultivo dos clones e das leveduras isoladas

O cultivo dos clones recombinantes de *S. cerevisiae* que superexpressam transportadores de açúcares foi realizado de quatro maneiras diferentes, a fim de se avaliar a produção de etanol e o consumo de fonte de carbono. Em todos os cultivos, os clones foram pré-cultivados por cerca de 30 horas.

Na condição 1, as células foram previamente cultivadas em 5 ml de meio SD-2 THUAL líquido, a 28 °C, com aeração em shaker; e 500 µl desta pré-cultura foram inoculados em meio SD-2 THUAL e esta cultura foi cultivada em agitação, em shaker a 170 rpm, a 28 °C. Na condição 2, as células foram previamente cultivadas em 5 ml de meio SD-2 THUAL líquido, a 28 °C, com aeração em shaker; e 500 µl desta pré-cultura foram inoculados em meio SX-2 THUAL e esta cultura foi cultivada em agitação, em shaker a 170 rpm, a 28 °C.

Os dois experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 ml com volume de 50 ml do meio mínimo (1/5 do volume final do frasco). As leveduras isoladas foram cultivadas da mesma maneira que as condições citadas, mas os meios utilizados foram SD-2 para condição 1 e SX-2 para condição 2.

Na condição 3, as células foram previamente cultivadas em meio SD-2 THUAL e inoculadas em meio SD-5 THUAL. Na condição 4, o pré-cultivo utilizado foi SD-2 THUAL e o cultivo foi o meio SX-5 THUAL. Os dois experimentos foram realizados em erlenmeyers de 250 ml com volume de 150 ml do meio mínimo (10/6 do volume final do frasco). As células foram mantidas em condições de limitação de oxigênio, em shaker, a 50 rpm, a 28 °C.

Os cultivos foram realizados por até 72 horas. As células das pré-culturas foram concentradas 10X e lavadas duas vezes com solução salina 0,9%, com o objetivo de se iniciar o experimento com alta densidade de células. A perda de volume do meio de cultura, por conta da retirada de amostras, nunca ultrapassou 10% do volume inicial do cultivo. Os experimentos foram realizados em duplicata e as amostras retiradas em intervalos regulares até o final do cultivo.

3.20 Análise de consumo dos açúcares xilose e glicose dos clones e das leveduras isoladas

A análise do consumo de fonte de carbono foi realizada por testes enzimáticos com glicose oxidase (para consumo de glicose) e quantidade de açúcar redutor no meio de cultura (para consumo de xilose).

A glicose foi determinada empregando-se “kit” enzimático comercial da BioSystems de acordo com as instruções deste fabricante. Para essa análise, 10 µl de cada amostra reagiram com 1 ml do reagente de cor desse “kit” (composto pelas enzimas glicose oxidase e peroxidase) sob incubação de 10 minutos, a 37 °C. Em seguida, o composto quinonimina (produto de cor avermelhada) produzido na reação foi estimado a 500 nm, permitindo a determinação da concentração de glicose em cada amostra através da correlação informada pelo fabricante com a absorbância apresentada pela solução padrão.

A quantificação de consumo de xilose no meio foi determinada pela quantidade de açúcar redutor presente, utilizando o ácido dinitrosalicílico (DNS). Para isso, a 100 µl de cada amostra foram adicionados 190 µl de água destilada estéril e 3 ml de DNS. Em seguida, levou-se a mistura ao banho-maria, com a água em ebulição por 5 minutos. Após esse período, as amostras foram resfriadas em água com gelo a fim de paralisar a reação. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Foi realizado ensaio em branco, contendo exclusivamente água destilada estéril na amostra. A quantidade de xilose no meio

foi determinada pela correlação do valor de absorvância apresentada para cada amostra com a equação da reta extraída de uma curva padrão construída com soluções padrões de 0,0% a 5% de xilose (ANEXO A).

3.21 Análise da produção de etanol dos clones e das leveduras isoladas

A produção de etanol foi determinada enzimaticamente utilizando as enzimas álcool oxidase (AOD, extraída de *Pichia pastoris*, Sigma) e peroxidase (enzima extraída da planta raiz forte, Sigma) seguindo metodologias adaptadas dos protocolos descritos por Salgado et al. (2000), Rodionov et al. (2002) e Alves et al. (2007). Para a determinação de etanol, 10 µl de amostra foram incubados com 200 µl do reagente enzimático (0,5 U de AOD/ml, 4,0 U/ml de POD, 14 mM de 4-aminoantipirina e 60 mM de Fenol em Tampão Fosfato de Sódio 0,1 M pH 7,5), por uma hora, a 37 °C. Após esse período, a Absorvância foi medida em espectrofotômetro a 420 nm e a concentração de etanol foi determinada pela correlação do valor da Absorvância apresentada para cada amostra com a equação de reta extraída de uma curva padrão construída com soluções padrão de etanol (1,0 – 10 g/l) (ANEXO B).

O etanol, produzido pelas células, junto com o oxigênio, quando reage com a AOD forma acetoaldeído e peróxido de hidrogênio. Este último junto com aminoantipirina e hidroxiquinolina forma o composto quinonimina, que possui Absorvância máxima a 500 nm (Figura 4).

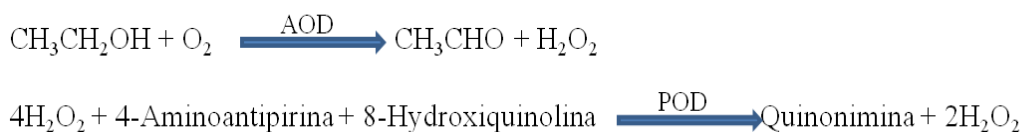


Figura 4. Equações das reações enzimáticas para determinação bioquímica de etanol no sobrenadante dos cultivos.

3.22 Análise do crescimento dos clones e das leveduras isoladas

Para analisar o crescimento dos clones recombinantes obtidos, foram retiradas alíquotas durante os cultivos realizados em meio líquido e foi feita a determinação da Absorvância a 600 nm.

4 RESULTADOS

4.1 Seleção de leveduras com capacidade de bioconversão de pentoses

4.1.1 Isolamento de leveduras selvagens capazes de crescer em xilose como única fonte de carbono

Foram coletadas amostras de solo, frutas, folhas e flores de diferentes cidades dos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, que se encontravam tanto na área urbana quanto em regiões rurais. As amostras foram coletadas de diversas fontes: solo rico ou pobre em nutrientes; flores, folhas e frutos verdes ou em decomposição ou secos. Destas amostras, foram obtidas 79 isolados de leveduras capazes de crescer em meio mínimo contendo xilose como única fonte de carbono SX-1 (Material e Métodos, item 3.1.2). Colônias de algumas destas leveduras isoladas cultivadas em meio mínimo sólido estão mostrados na Figura 5. Este trabalho também resultou no isolamento de bactérias, que estão sendo mantidas no laboratório, em geladeira para trabalhos futuros.

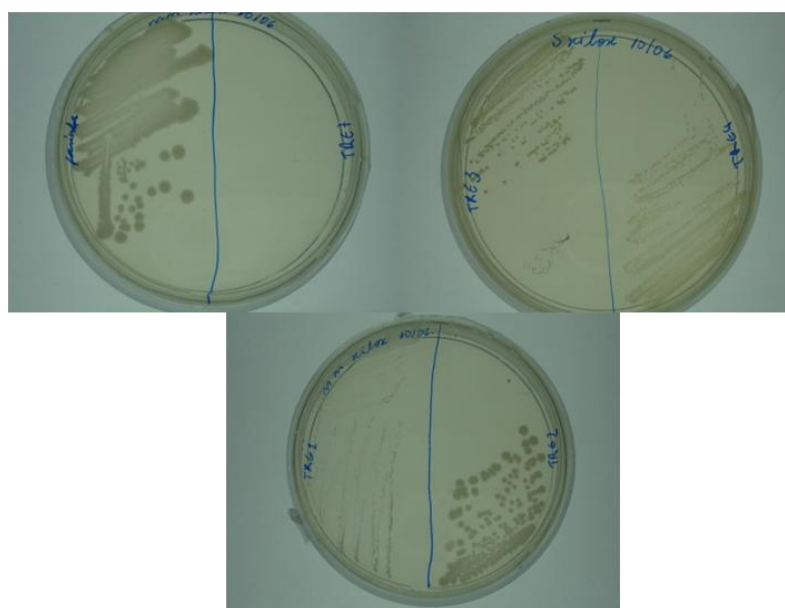


Figura 5. Crescimento de leveduras isoladas em meio mínimo sólido contendo xilose (SX-1).

4.1.2 Seleção de leveduras selvagens capazes de fermentar xilose

Para analisar a capacidade de fermentação de xilose das 79 leveduras isoladas, estas foram inoculadas em tubos Durham contendo meio mínimo com diferentes concentrações de xilose (SX-2, SH-2 e SX-1,5; Material e Métodos item 3.1.2). A formação de bolhas durante o ensaio e a mudança de coloração do meio, pela presença do indicador azul de bromotimol, de

verde (pH neutro) para amarelo (pH ácido), foi tomado como indicativo de fermentação positiva (Figura 6). Assim, das 79 linhagens de levedura capazes de crescer em xilose como única fonte de carbono, apenas 7 foram selecionadas como fermentadoras de xilose, denominadas **LX6**, **LX12**, **LX34**, **LX41**, **LX43**, **LX57** e **LX58**. Na Tabela 6 são apresentados os locais onde cada linhagem de levedura foi coletada.

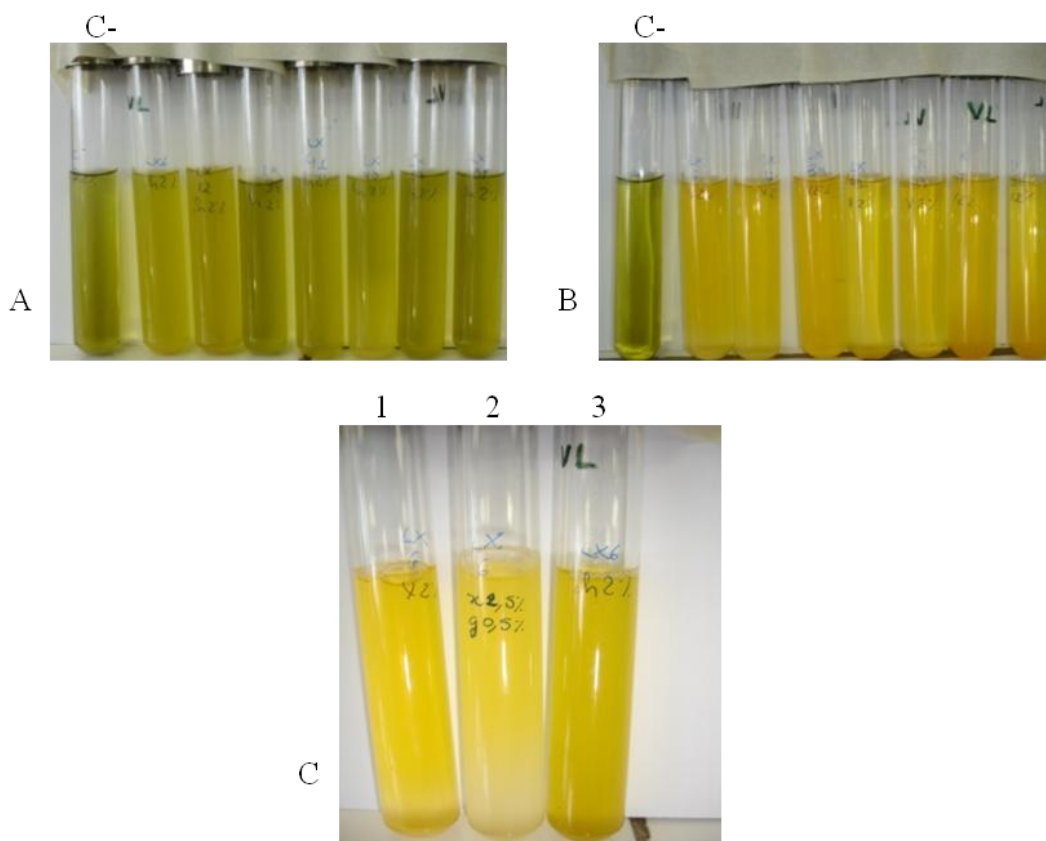


Figura 6. Ensaio de fermentação de xilose de leveduras selvagens isoladas neste trabalho. A) fermentação em meio mínimo com 2% de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar; C': controle negativo; B) fermentação em meio mínimo com 2% de xilose; C': controle negativo; C) comparação da fermentação do isolado LX6 nos meios mínimos de cultura contendo 2% xilose (1), 1,5% xilose com 0,5% glicose (2) e 2% hidrolisado de cana-de-açúcar (3).

Tabela 6- Locais de coleta das de leveduras selvagens fermentadoras de xilose.

Linhagem selecionada	Localidade	Tipo de amostra	Data da coleta
LX6	Três Lagoas/MS	Flor	Junho de 2008
LX12	Jundiaí/SP	Solo (horta)	Junho de 2008
LX34	São Paulo/SP	Folha	Agosto de 2008
LX41	São Paulo/SP	Folha	Agosto de 2008
LX43	São Paulo/SP	Fruto	Agosto de 2008
LX57	São Paulo/SP	Flor	Setembro de 2008
LX58	São Paulo/SP	Flor	Setembro de 2008

4.1.3 Análises do consumo de açúcares, produção de etanol e verificação da curva de crescimento das leveduras isoladas

As leveduras selvagens isoladas foram cultivadas em meio mínimo (Material e Métodos, item 31.2) contendo apenas glicose ou xilose como fontes de carbono. As células foram cultivadas por 72 horas e determinados os consumos desses dois açúcares, produção de etanol e suas curvas de crescimento.

4.1.3.1 Consumo de glicose pelas leveduras isoladas

A partir de uma concentração inicial de 2%, o consumo dessas linhagens foi baixo, inferior a 30% (Figura 7). As linhagens com melhor desempenho foram **LX41**, **LX43** e **LX58**. A linhagem **LX41** teve maior consumo inicial de glicose, em 24 horas, estabilizando-se até o final do cultivo. A linhagem **LX58**, a partir de 48 horas, apresentou rápida queda da glicose presente no meio. A linhagem **LX43** foi a que se manteve mais estável, pois manteve seu consumo constante durante todo o cultivo, seguido das linhagens **LX41** e **LX58**. A linhagem **LX57** diminuiu a concentração inicial de glicose rapidamente nas primeiras 24 horas e a partir de 60 horas, teve diminuição brusca na quantidade de açúcar, até 72 horas. As piores leveduras consumidoras dessa hexose foram **LX6**, **LX12** e **LX34**.

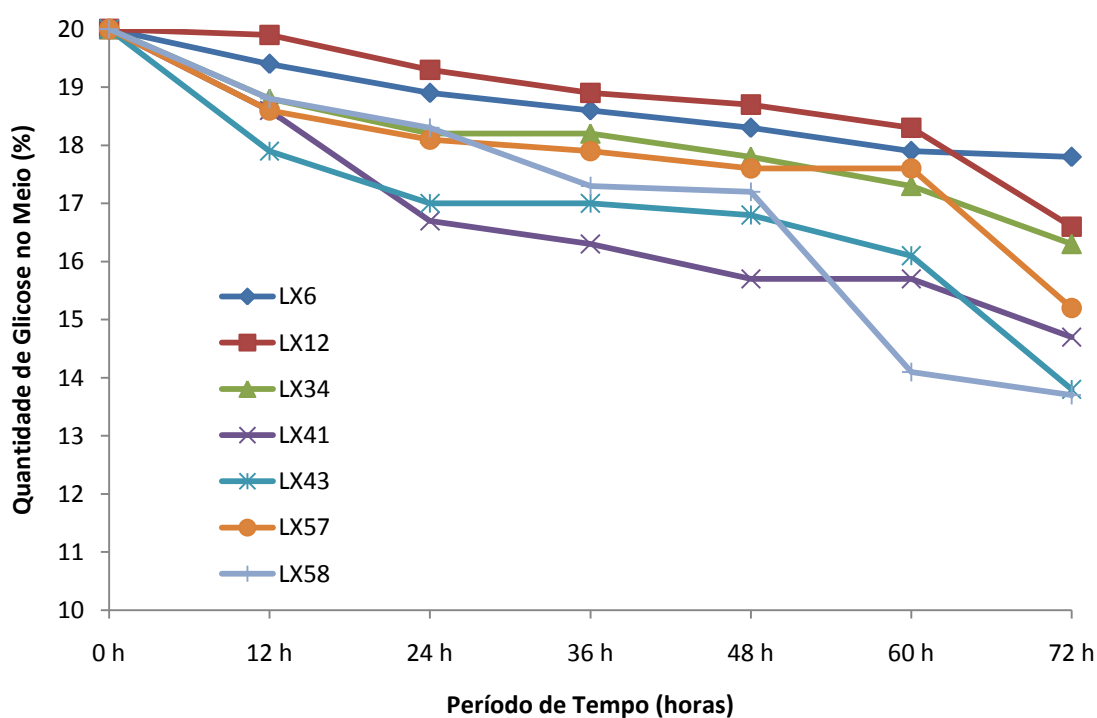


Figura 7. Consumo de glicose em meio mínimo contendo 2% de glicose (SD-2), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.

4.1.3.2 Consumo de xilose pelas leveduras isoladas

O consumo de xilose pelas leveduras isoladas (Figura 8) foi maior. As leveduras chegaram a consumir até 80% dos 2% de xilose inicialmente presente. As leveduras com melhor desempenho foram **LX41**, **LX43** e **LX57**. Entretanto, **LX6** consumiu mais rapidamente a xilose nas primeiras 12 horas, 10 g/l, ou seja, metade do açúcar inicialmente presente no meio, entretanto, a captação não aumenta muito durante o resto do cultivo, e após 72 horas, **LX6** consumiu 14,7 g/l. Após 24 horas de cultivo, **LX41** atingiu o mesmo patamar que **LX6**, sendo que este isolado apresenta maior consumo final de xilose. **LX41** em 12 horas, consumiu 7 g/l de xilose; em 24 horas, 12 g/l; mantendo o consumo constante até 72 horas; consumindo ao todo 17,2 g/l de xilose.

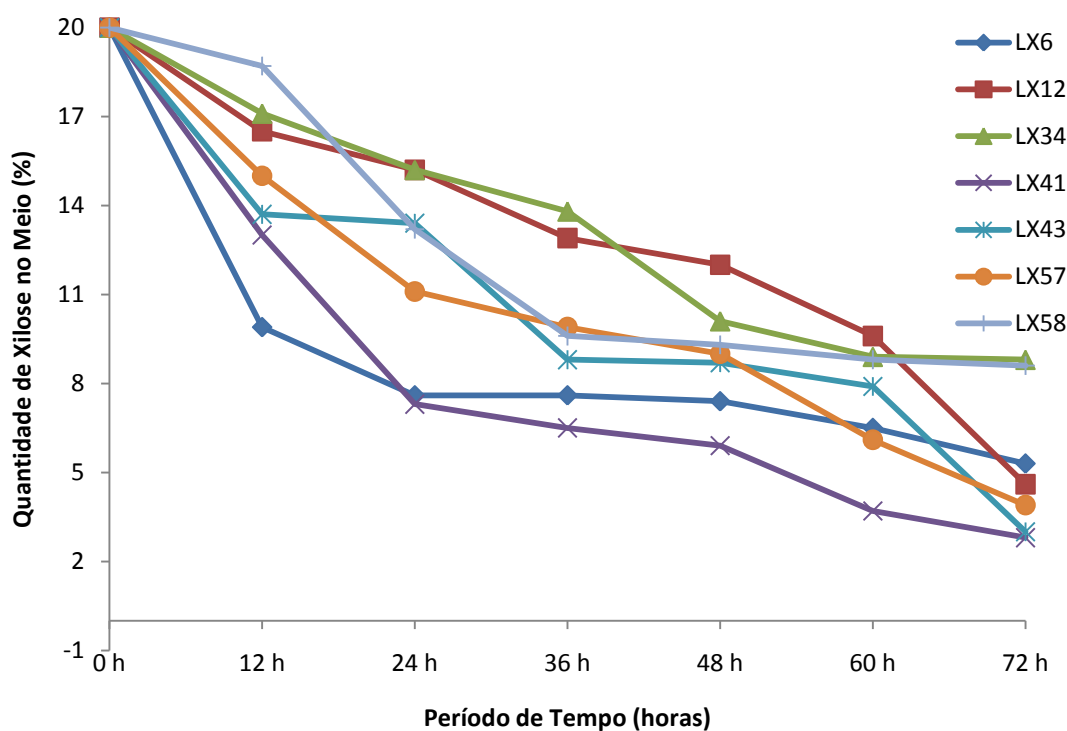


Figura 8. Consumo de xilose em meio mínimo contendo 2% de xilose (SX-2), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.

A levedura **LX43** tem um consumo moderado de xilose até 60 horas, consumindo rapidamente o açúcar nas últimas 12 horas (17 g/l em 72 horas). Foi **LX57** que manteve a interiorização de xilose mais equilibrada durante todo o cultivo, sem quedas bruscas da quantidade de açúcar no meio, tendo consumido ao final do cultivo 16,1 g/l.

A levedura isolada que apresentou o pior consumo de xilose foi **LX34**, tendo consumido 11,2 g/l ao final do cultivo. Comparando o consumo das leveduras com melhor

desempenho com **LX34**, que menos consumiu, observa-se que: o consumo de xilose por **LX6** foi superior em 31%; o de **LX41**, 53%; o de **LX43**, 51%.

4.1.3.3 Crescimento das leveduras isoladas em glicose e em xilose

Também foram analisados os perfis de crescimento das leveduras isoladas selecionadas durante os ensaios relacionados nos dois itens anteriores. O resultado obtido foi um crescimento celular bastante baixo das leveduras quando cultivadas com as duas fontes de carbono investigadas (Figuras 9 e 10). A levedura **LX6** obteve o maior crescimento microbiano em ambos os açúcares, comparado com as demais, porém ainda baixo. Assim, o consumo de xilose das leveduras isoladas não foi refletido em produção de biomassa.

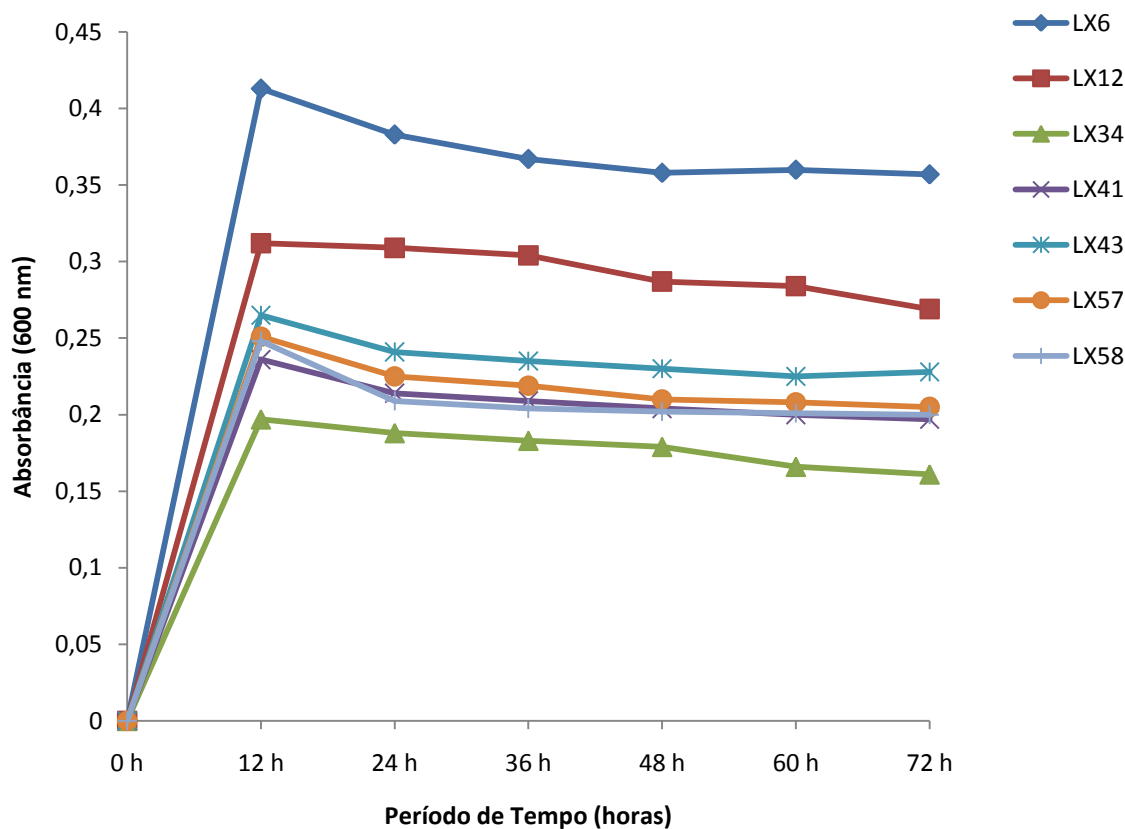


Figura 9. Curva de crescimento em meio mínimo contendo 2% de glicose (SD-2), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.

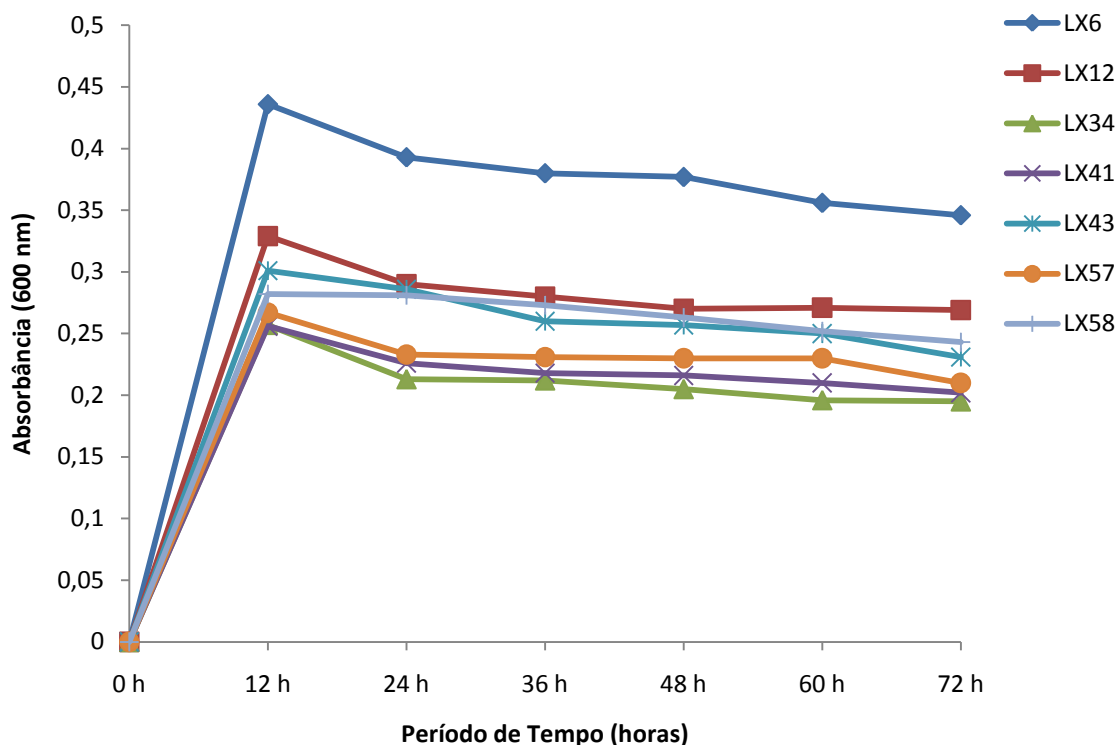


Figura 10. Curva de crescimento em meio mínimo contendo 2% de xilose (SX-2), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.

4.1.3.3 Análise de produção de etanol pelas leveduras isoladas

A produção de etanol também foi investigada nos cultivos realizados pelas leveduras selvagens (dados não apresentados). Infelizmente, a bioconversão a produto não foi alta suficiente para a detecção pelos métodos enzimáticos realizados, ou o tipo de álcool ou metabólito produzido não reagiu com as enzimas álcool oxidase e peroxidase utilizadas (Material e Métodos, item 3.21).

4.2 Construção de linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes que superexpressam *HXT5* e *HXT7*

Como as proteínas transportadoras de hexoses *HXT5* e *HXT7* são sabidamente envolvidas no transporte também de pentoses para o interior da célula da levedura *S. cerevisiae*, buscou-se obter linhagens recombinantes que superexpressam os genes *HXT5* e *HXT7*.

Para tanto, os genes *HXT5* e *HXT7* foram amplificados por PCR a partir do DNA total da linhagem S288C. As sequências estruturais destes genes foram clonados em vetores que se

mantém em múltiplas cópias em *S. cerevisiae*; e estes vetores foram inseridos em linhagens hospedeiras.

4.2.1 Obtenção dos genes *HXT5* e *HXT7*

As seqüências estruturais dos genes *HXT5* e *HXT7* foram obtidos por amplificação por PCR, a partir do DNA total da linhagem laboratorial S288C, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores e as condições mencionadas em Material e Métodos (item 3.7) (Figuras 11 e 12).

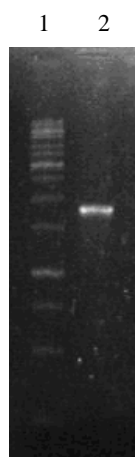


Figura 11. Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio do amplicon correspondente ao gene *HXT5* (1.779 pb) obtido por reação de PCR, a partir do DNA genômico da levedura S288C; 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng).

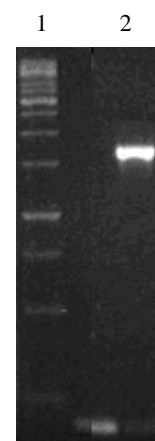


Figura 12. Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio do amplicon correspondente ao gene *HXT7* (1.713 pb) obtido por reação de PCR, a partir do DNA genômico da levedura S288C; 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng).

4.2.2 Sequenciamento e alinhamento dos genes *HXT5* e *HXT7*

Os produtos de PCR dos genes *HXT5* e *HXT7* foram seqüenciados e as seqüências obtidas mostram 100% de identidade com as seqüências dos genes disponíveis no sítio *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A seqüência do gene *HXT5* é apresentada no ANEXO C e do gene *HXT7* no ANEXO D.

As seqüências dos genes *HXT5* e *HXT7* apresentam 70% de similaridade (ANEXO E). Apesar disso, os dois genes apresentam expressões diferentes durante o ciclo celular e as proteínas codificadas também apresentam cinéticas diferentes (BUZIOLO et al., 2002; VERWAAL et al., 2002).

4.2.3 Construção do plasmídeo de expressão pMAHXT5

O gene *HXT5* foi clonado no vetor comercial, pGEM-T (Promega, Material e Métodos, item 3.2), para se obter o plasmídeo pGEMTHXT5 (Figura 13). A mistura de ligação do amplicon *HXT5* (1.779 pb) e pGEM-T foi empregada na transformação genética da linhagem DH5 α de *E. coli*. Clones Amy^R escolhidos ao acaso foram cultivadas e tiveram o seu plasmídeo extraído e digerido com *Bgl*III. A digestão de pGEMTHXT5 com a enzima de restrição *Bgl*III, resulta na liberação do gene *HXT5* (Figura 14). A confirmação da clonagem do amplicon *HXT5* no vetor pGEM-T, foi realizada por análise de restrição com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Acc*I. Essas enzimas reconhecem apenas um sítio neste gene e nenhum no plasmídeo, assim, o vetor recombinante é linearizado (Figura 15). Esta construção possui tamanho de 4.779 pares de bases. A confirmação desta construção também foi realizada por PCR, utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores usados para a amplificação primária dos genes e pGEMTHXT5 como DNA molde (Figura 16).

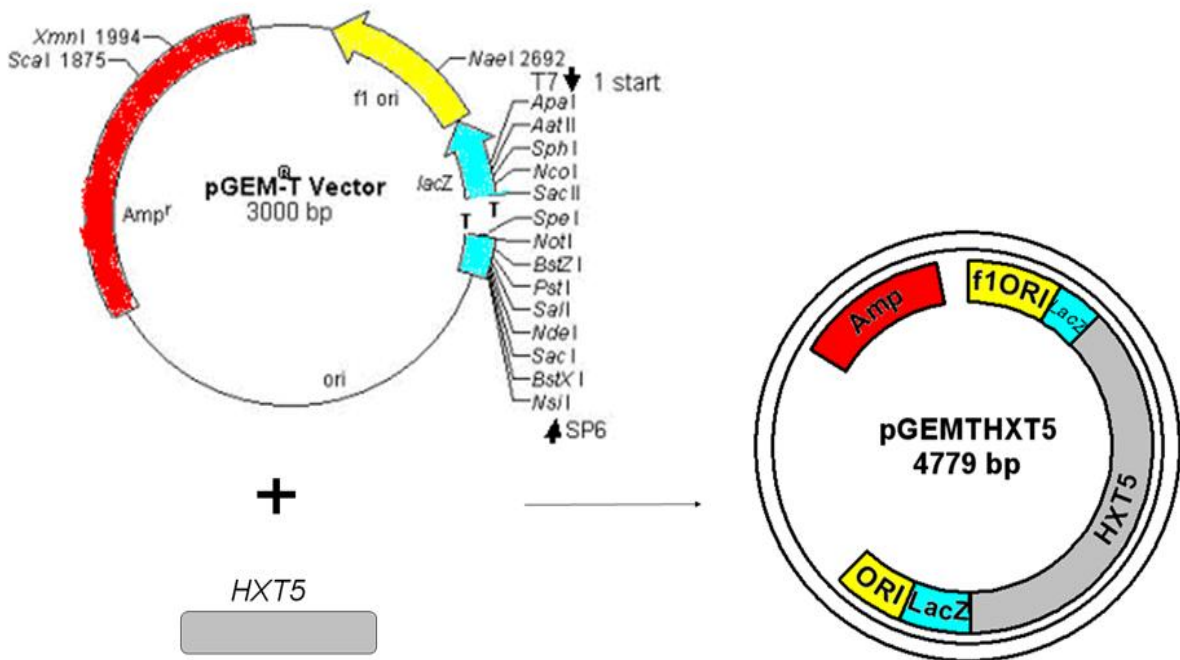


Figura 13. Representação esquemática da construção do vetor intermediário pGEMTHXT5.

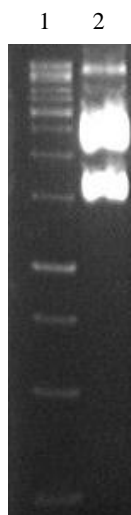


Figura 14. Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio de: 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) digestão do plasmídeo intermediário construído pGEMTHXT5 com a enzima de restrição *Bgl*III, liberando o gene *HXT5* (1.779 pares de base).

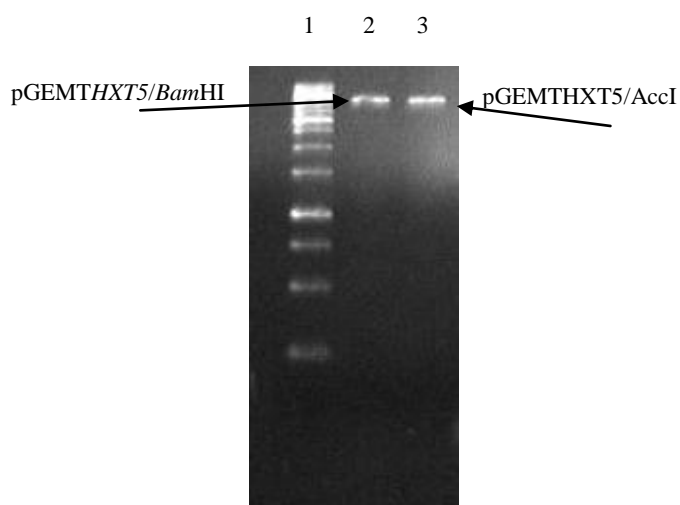


Figura 15. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio: 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) pGEMTHXT5/*Bam*HI; 3) pGEMTHXT5/*Acc*I).

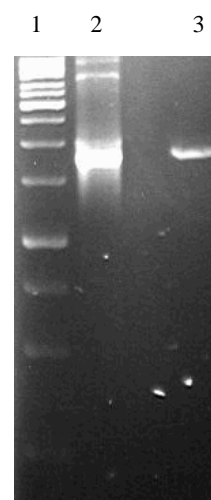


Figura 16. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio: 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) plasmídeo pGEMTHXT5; 3) fragmento *HXT5*, produto de PCR empregado como DNA molde o plasmídeo pGEMTHXT5.

O gene *HXT5* foi extraído do plasmídeo pGEMHXT5 por digestão com a enzima de restrição *Bgl*III, e foi inserido no sítio de clonagem *Bgl*III do plasmídeo pMA91, entre o promotor e o terminador de transcrição PGK, dando origem ao plasmídeo pMAHXT5 (Figura 17). Na Figura 18 é mostrado o perfil de migração dos fragmentos de DNA resultantes da

digestão desse plasmídeo com a enzima *Bgl*III, liberando o vetor linearizado (cerca de 9.500 pares de bases) e o gene *HXT5* (1.779 pb).

A clonagem do gene *HXT5* foi confirmada com a amplificação do cassete de expressão *pPGK*HXT5*tPGK* por PCR. A correta orientação da inserção de *HXT5* foi confirmada por tratamento com as enzima de restrição *Acc*I, *Bam*HI e *Kpn*I (Figura 19). Este procedimento levou à confirmação da construção do vetor de expressão pMAHXT5.

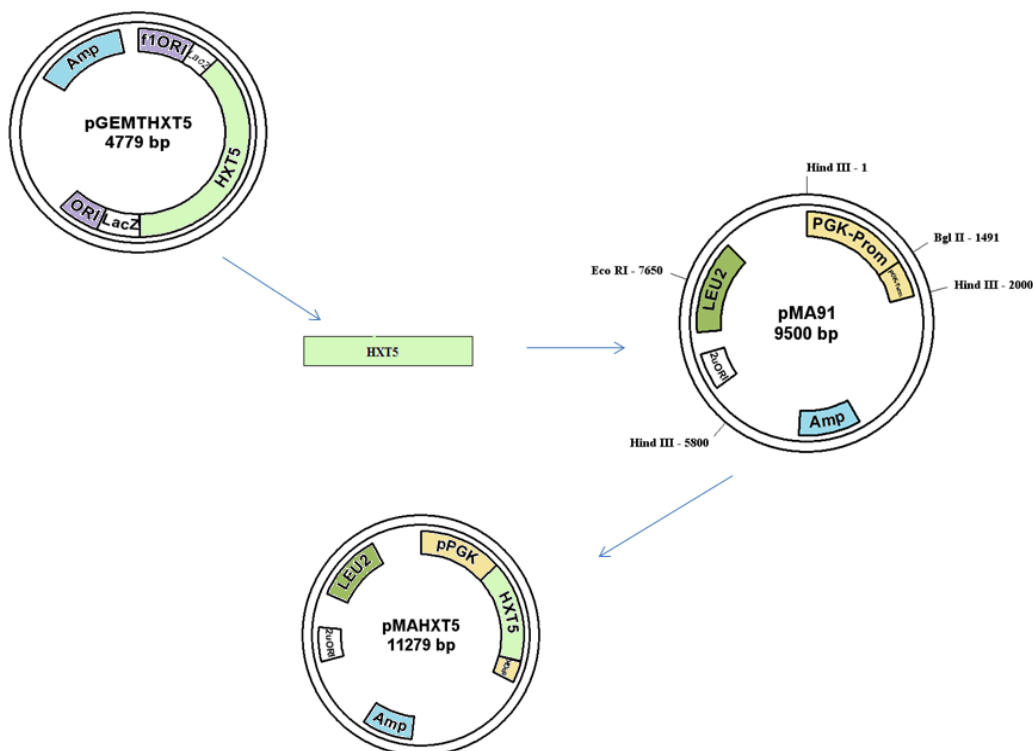


Figura 17. Representação esquemática da construção do plasmídeo pMAHXT5.

1 2

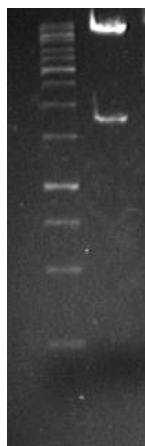


Figura 18. Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio plasmídeo pMAHXT5 digerido com a enzima *Bgl*III, liberando o vetor linearizado (cerca de 9.500 pb) e o gene *HXT5* (1.779 pb); 1) marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) Digestão de pMAHXT5 com *Bgl*III.

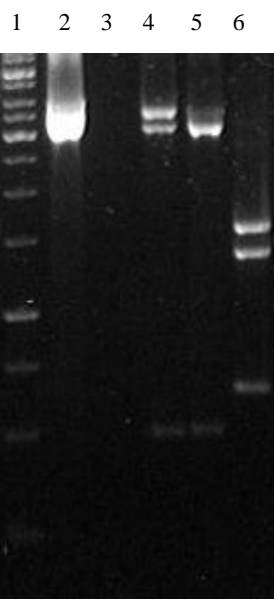


Figura 19. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio da amplificação do cassete de expressão *pPGK*HXT5*tPGK* (3.636 pb) e da análise de restrição: 1) marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) *pPGK*HXT5*tPGK* amplificado por PCR; 3) Controle negativo da amplificação; 4) *pMAHXT5/AccI* (3.238 e 477 pb); 5) *pMAHXT5/BamHI* (3.248 e 467 pb); 6) *pMAHXT5/KpnI* (1.676, 1.374 e 630 pb).

4.2.4 Construção do plasmídeo de expressão *pMAHXT7*

O gene *HXT7* foi inserido no plasmídeo comercial p.C.R 2.1 TOPO (Invitrogen, Material e Métodos, item 3.2), obtendo-se o plasmídeo pTOPOHXT7 (Figura 20). A confirmação da construção de pTOPOHXT7 foi realizada empregando-se digestão com a enzima de restrição *BglII*, resultando na liberação do gene *HXT7* (1.713 pb) (Figura 21) e com as enzimas *HindIII*, *HpaI* e *NcoI*. Estas enzimas clivam em dois sítios o gene *HXT7* e em nenhum sítio no vetor utilizado; assim, este procedimento resulta em duas bandas de migração no gel, permitindo a identificação da orientação da inserção do gene de interesse no plasmídeo utilizado (Figura 22). A inserção de *HXT7*, também foi confirmada empregando-se amplificação por PCR, utilizando o mesmo par de oligonucleotídeo iniciadores usados na amplificação primária do gene e o plasmídeo pTOPOHXT7 como DNA molde (Figura 23).

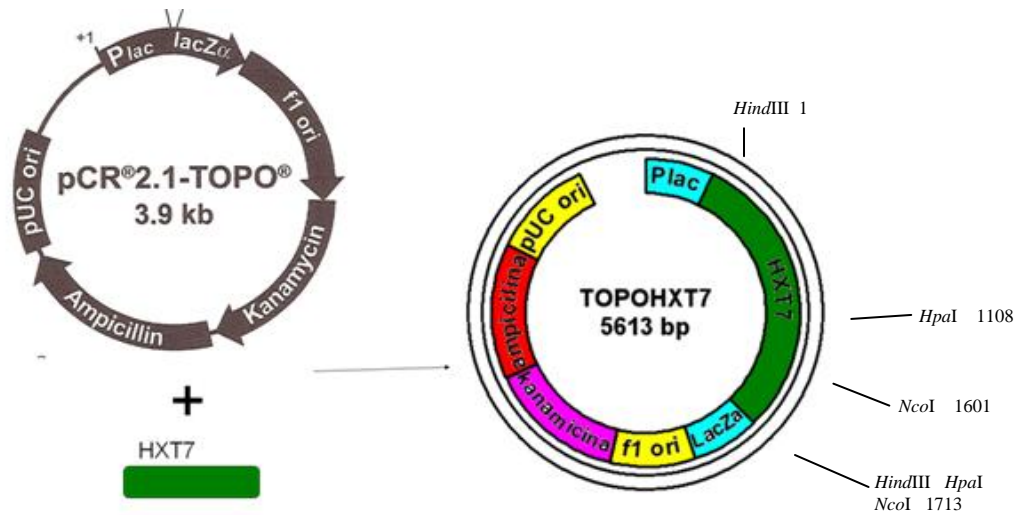


Figura 20: Representação esquemática da construção do vetor intermediário pTOPOHXT7.

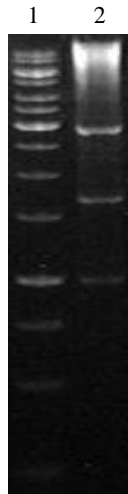


Figura 21. Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio da digestão do plasmídeo intermediário construído pTOPOHXT7 com a enzima de restrição *Bgl*III, liberando o fragmento *HXT7* (1.713 pb). 1) marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng).

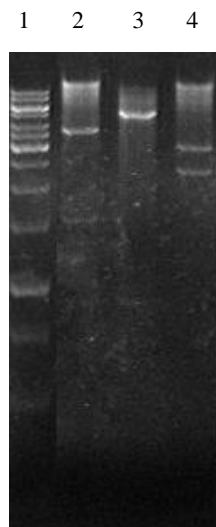


Figura 22. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio: 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) pTOPOHXT7/*Hind*III; 3) pTOPOHXT7/*Hpa*I; 4) pTOPOHXT7/*Nco*I.

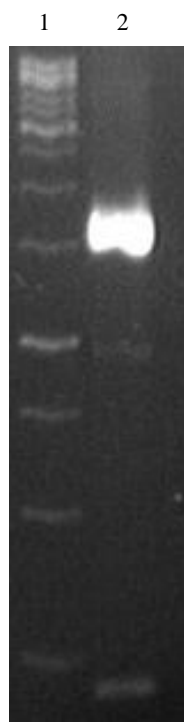


Figura 23. Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio: 1) marcador 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) amplificação do fragmento *HXT7*, por PCR a partir do plasmídeo pTOPO.

O gene *HXT7* foi extraído do plasmídeo pTOPO*HXT7* e inserido no sítio de clonagem *Bgl*III do plasmídeo pMA91, obtendo o vetor de expressão pMA*HXT7* (Figura 24). A análise desta construção foi realizada empregando-se digestão com a enzima *Bgl*III, que resulta na liberação do gene (1.713 pares de base) e de pMA91 linearizado (Figura 25).

A orientação correta da inserção do fragmento *HXT7* no plasmídeo foi analisada empregando-se amplificação do cassette de expressão *pPGK***HXT7***tPGK* por PCR (empregando-se os oligonucleotídeos iniciadores e o plasmídeo como DNA molde) e posterior tratamento com as enzimas de restrição *Hind*III, *Hpa*I e *Nco*I (Figura 26). Este procedimento levou a confirmação da correta construção do vetor de expressão pMA*HXT7*.

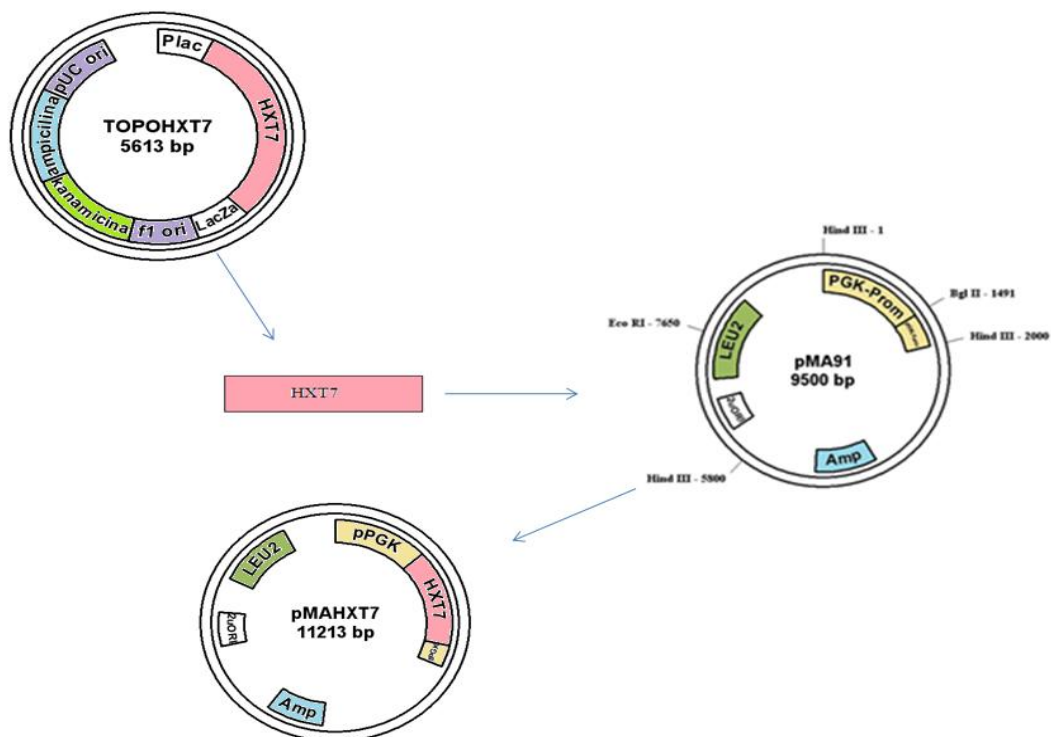


Figura 24. Representação esquemática da do plasmídeo pMAHXT7.

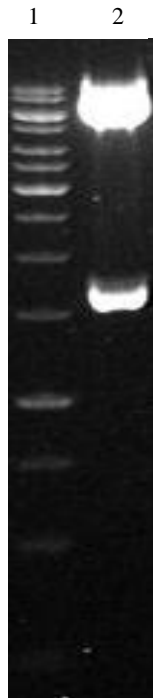


Figura 25. Perfil de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio: 1) marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) digestão plasmídeo pMAHXT7 com a enzima *Bg*II, liberando o vetor pMA91 linearizado (9.483 pb) e o gene *HXT7* (1.713 pb).

1 2 3 4 5 6

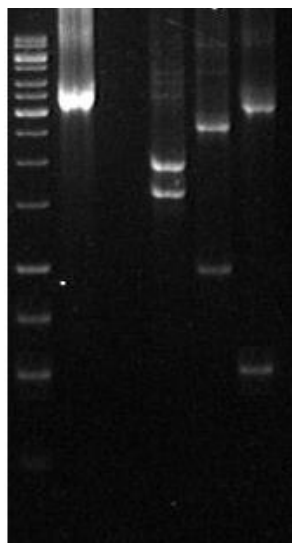


Figura 26. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio: 1) marcador 1 kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2) *pPGK*HXT7*tPGK* amplificado; 3) controle negativo da amplificação; 4) *pMAHXT7/HindIII* (1.960 e 1.613 pb); 5) *pMAHXT7/HpaI* (2.603 e 976 pb); 6) *pMAHXT7/NcoI* (3.96 e 483 pb).

4.2.5 Transformação de leveduras com os plasmídeos recombinantes construídos

As linhagens de *S. cerevisiae* YPH 250, YPH252 e YPH 274 foram transformadas com os plasmídeos recombinantes *pMAHXT5*, *pMAHXT7*, e com o plasmídeo *pMA91* (controle), utilizando-se 3 µg de cada plasmídeo. Os clones transformantes foram selecionados por complementação gênica do fenótipo *Leu*⁺ em meio mínimo (SD-THUAL) (Tabela 7).

Tabela 7- Eficiência de transformação das leveduras com o plasmídeos recombinantes construídos.

Linhagem	Plasmídeos	Quantidade	Número de Transformantes	Eficiência de Transformação (nºTransformantes/ µg DNA)
YPH 250	<i>pMAHXT5</i>	3 µg	3.457	1,152 x 10 ³
	<i>pMAHXT7</i>	3 µg	3.986	1,328 x 10 ³
	<i>pMA91</i>	3 µg	3.885	1,295 x 10 ³
YPH 252	<i>pMAHXT5</i>	3 µg	4.665	1,555 x 10 ³
	<i>pMAHXT7</i>	3 µg	6.254	2,084 x 10 ³
	<i>pMA91</i>	3 µg	3.066	1,022 x 10 ³
YPH 274	<i>pMAHXT5</i>	3 µg	4.332	1,444 x 10 ³
	<i>pMAHXT7</i>	3 µg	3.987	1,329 x 10 ³
	<i>pMA91</i>	3 µg	3.122	1,040 x 10 ³

4.2.6 Análise qualitativa da capacidade fermentativa das leveduras recombinantes

As linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes YPH252/pMAHXT5, YPH252/pMAHXT7 e YPH 252/pMA91 (controle) foram submetidos a ensaios de fermentação de glicose e xilose.

4.2.6.1 Análise em tubos Durham

No ensaio de fermentação de glicose, os transformantes foram pré-inoculados em SD-2 THUAL (Material e Métodos, item 3.1.2) e inoculados no mesmo meio. Em 24 horas os tubos inoculados com clones recombinantes YPH252/pMAHXT5 YPH252/pMAHXT7 apresentavam maior formação de bolhas que o controle (YPH252/pMA91) (Figura 27). Observa-se que na linhagem YPH252/pMAHXT5, o tubo Durham está suspenso devido à quantidade de gás carbônico formado. A fermentação foi acompanhada até 72 horas (fotos de 48 e 72 horas no ANEXO F) sendo que a reação atingiu seu ápice em 48 horas. Após a realização deste teste, os melhores clones recombinantes foram selecionados para serem empregados nos testes seguintes de fermentação em pequena escala e análises posteriores.

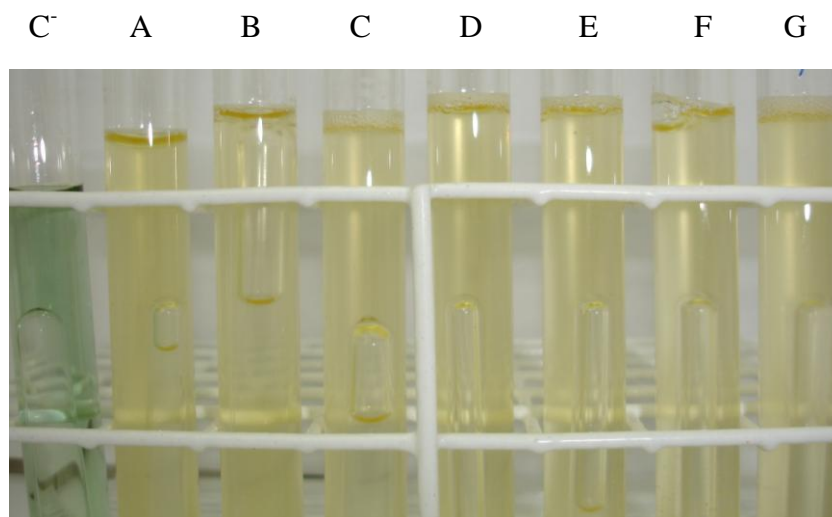


Figura 27. Ensaio de fermentação de glicose em tubos Durham com o meio SD-2 THUAL dos clones recombinantes YPH252/pMAHXT5, YPH252/pMAHXT7 e YPH252/pMA91: **A:** YPH 252/pMA91; **B:** YPH252/pMAHXT5 clone 11; **C:** YPH252/pMAHXT5 clone 13; **D:** YPH252/pMAHXT5 clone 20; **E:** YPH252/pMAHXT7 clone 3; **F:** YPH252/ pMAHXT7 clone 9; **G:** YPH252/pMAHXT7 clone 20.

No ensaio de fermentação de xilose, os transformantes foram pré-inoculados em SX-2 THUAL (Material e Métodos, item 3.1.2) e inoculados em SX-2 THUAL. Nessa condição não se observou nenhum tipo de reação, ou seja, não houve mudança entre os tubos inoculados com os clones recombinantes e os controles YPH252/pMA91 e o tubo que não foi

inoculado. Os tubos se mantiveram com a coloração verde inicial, sem formação de bolhas até o final do cultivo, que foi de 144 horas (ANEXO G).

4.2.6.2 Análise em meio sólido

Com o objetivo de futura seleção de clones sem um marcador auxotrófico (como manipulação gênica de linhagens industriais de leveduras) buscou-se desenvolver uma estratégia rápida e eficaz que permitisse a visualização de um grande número de clones com capacidade aumentada de fermentação, utilizando-se placas com meio YPD sólido com indicador de pH púrpura de bromocresol (Material e Métodos, item 3.18). Dessa maneira, os clones que utilizam o açúcar mais rapidamente devido à superexpressão dos transportadores de açúcares *HXT5* e *HXT7* formariam um halo decorrente da alteração do pH para ácido, com conseqüente mudança da coloração de violeta para amarelo.

Três clones YPH252/pMAHXT5, três clones YPH252;pMAHXT7 e um clone YPH252/pMA91 foram inoculados em placas de YPD-2 BCP e YPD-5 BCP. Após 30 horas, foi possível observar a formação de halos em torno dos clones recombinantes, sendo dois deles mais expressivos: YPH252/pMAHXT5 clone 20 e YPH252/pMAHXT7 clone 20 (Figura 28).

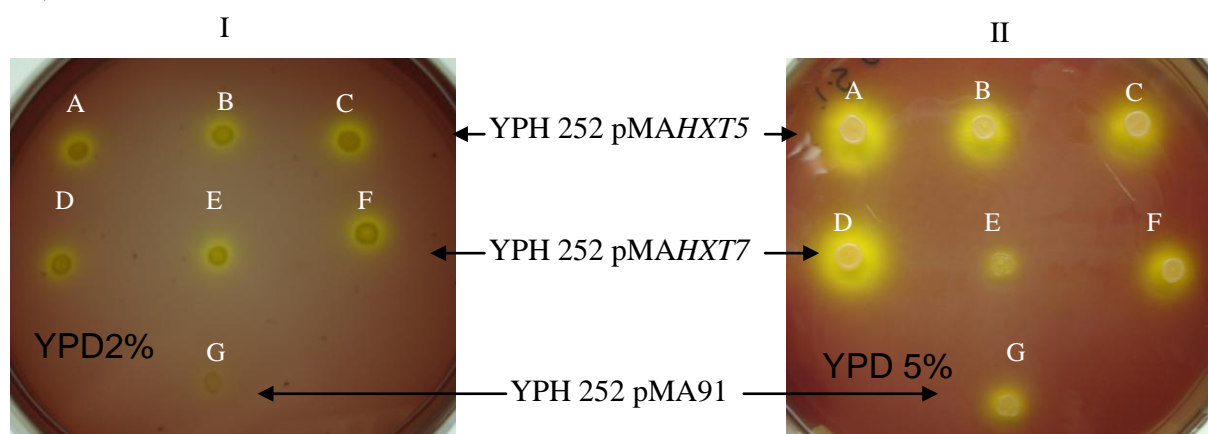


Figura 28. Cultivo de clones recombinantes em meio completo sólido após cultivo por 30 horas, a 28 °C: I) YPD-2 BCP; II) YPD-5 BCP. A: YPH252/pMAHXT5 clone 20; B: YPH252/pMAHXT5 clone 13; C: YPH252/pMAHXT5 clone 11; D: YPH252/pMAHXT7 clone 20; E: YPH252/pMAHXT7 clone 9; F: YPH252/pMAHXT7 clone 3; G: YPH252/pMA91.

4.2.7 Caracterização dos clones recombinantes

Foram realizados cultivos com três clones YPH252/pMAHXT5 e três clones YPH252/pMAHXT7. Foram cultivados dois clones YPH252/pMA91, que não possui um gene codificador de proteína transportadora de açúcares. Os gráficos foram desenhados obtendo-se

a média dos três clones de cada plasmídeo, inserindo o desvio padrão nas curvas, a fim de se observar as diferenças dos clones. O consumo de glicose e xilose em duas concentrações (2% e 5%) foram investigados. O consumo de glicose foi mais rápido nos clones recombinantes que na linhagem controle, mais uma vez evidenciando a correta expressão dos genes *HXT5* e *HXT7* inseridos no plasmídeo entre o promotor de expressão forte e o terminador de transcrição da enzima fosfoglicerato quinase (PGK).

4.2.7.1 Consumo de glicose em condições de aerobiose

De uma maneira geral, os clones que expressam o gene *HXT7* tiveram um consumo um pouco mais rápido de glicose que os clones que expressam *HXT5*. A maior diferença de consumo em cultivos de glicose é evidenciada nas primeiras horas de cultivo, mantendo consumo constante até a total depleção da fonte de carbono presente nos cultivos com 20 g/l e também 50 g/l.

O consumo de glicose contendo 20 g/l e sob condições aeróbicas foi completado praticamente em 36 horas de cultivo (Figura 29). Comparando os clones recombinantes YPH252/pMAHXT5 e YPH252/pMAHXT7 com o controle YPH252/pMA91 durante todo o cultivo, é possível observar a superioridade de captação de açúcar dos novos clones recombinantes construídos neste trabalho. Em 12 horas, YPH252/pMAHXT5 já havia consumido 13 g/l de glicose e YPH252/pMAHXT7, 12 g/l, enquanto que o controle YPH252/pMA91 havia consumido apenas 9 g/l. O clone YPH252/pMAHXT5 consumiu nas primeiras 12 horas 44% a mais de glicose que o controle, e YPH252/pMAHXT7 33%.

No cultivo em condições aeróbicas, em 24 horas, YPH252/pMAHXT5 consumiu 18,36 g/l, YPH252/pMAHXT7 17,7 g/l e o controle YPH252/pMA91 16,48 g/l. Nesse período, a diferença de captação entre os clones e o controle é menor. YPH252/pMAHXT5 consumiu 11% e YPH252/pMAHXT7 7% a mais que o controle. Em 36 horas, YPH252/pMAHXT5 já havia consumido praticamente todo o açúcar, sobrando apenas 0,006 g/l de glicose, enquanto que no cultivo de YPH252/pMAHXT7 faltavam 0,1 g/l da hexose a ser consumida e no controle, 0,6 g/l.

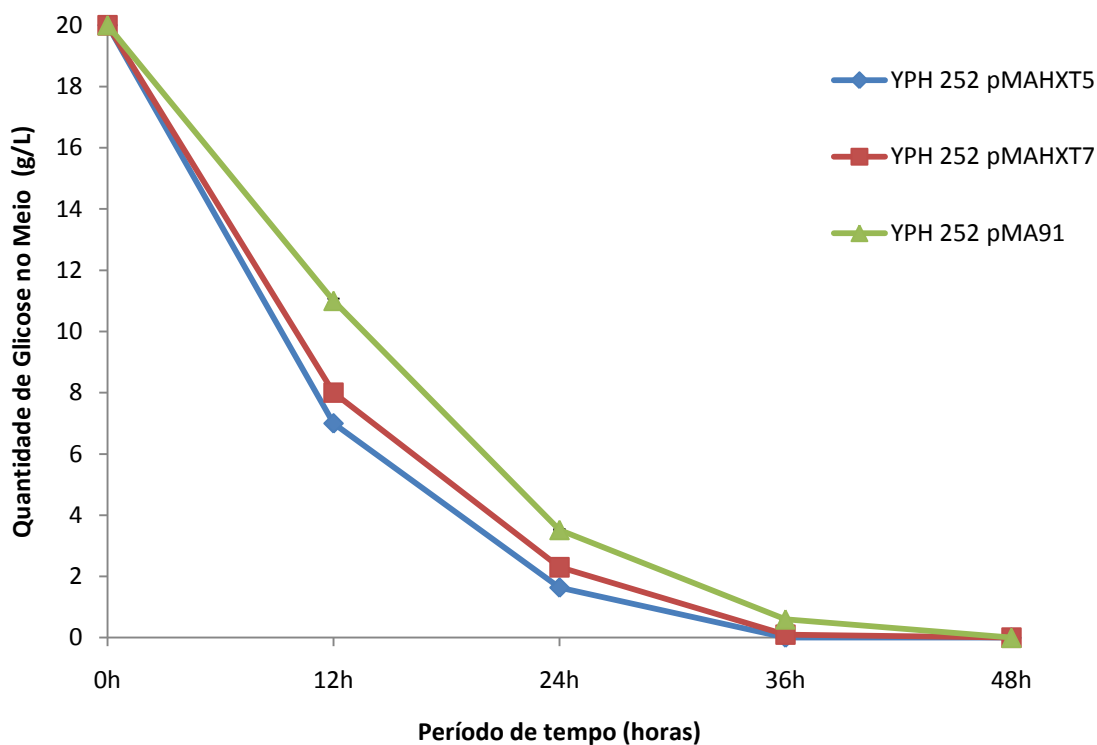


Figura 29. Consumo de glicose em meio mínimo contendo 2% de glicose (SD-2 THUAL), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.

4.2.7.2 Consumo de glicose em condições de restrição de oxigênio

No cultivo em condições de restrição de oxigênio, com 50g/l de glicose as diferenças de consumo são melhores evidenciados. Em 12 horas de cultivo, YPH252/pMAHXT5 consumiu 10 g/l, YPH252/pMAHXT7 16 g/l e o controle apenas 1,48 g/l. O clone que superexpressava o gene *HXT5* consumiu 576% ou 5,7 vezes mais glicose que YPH252/pMA91 e o clone com superexpressão do gene *HXT7* 981% ou 9,8 vezes (Figura 30).

Em 24 horas de cultivo, a diferença ainda é notável, apesar de bem menor que nas primeiras 12 horas. YPH252/pMAHXT5 consumiu 29 g/l, YPH252/pMAHXT7 25 g/l e o controle 20 g/l. Em porcentagem, esses valores equivalem a 25% a mais de consumo pelo YPH252/pMAHXT5 e 45% a mais em YPH252/pMAHXT7 comparando-se com o controle. Já em 36 horas e no resto do cultivo, mesmo havendo diferenças de consumo entre os clones recombinantes e o controle, essas são menores que nas horas iniciais. Os dois clones recombinantes consumiram cerca de 42 g/l, ou seja, 17% a mais que o controle, que consumiu apenas 36 g/l.

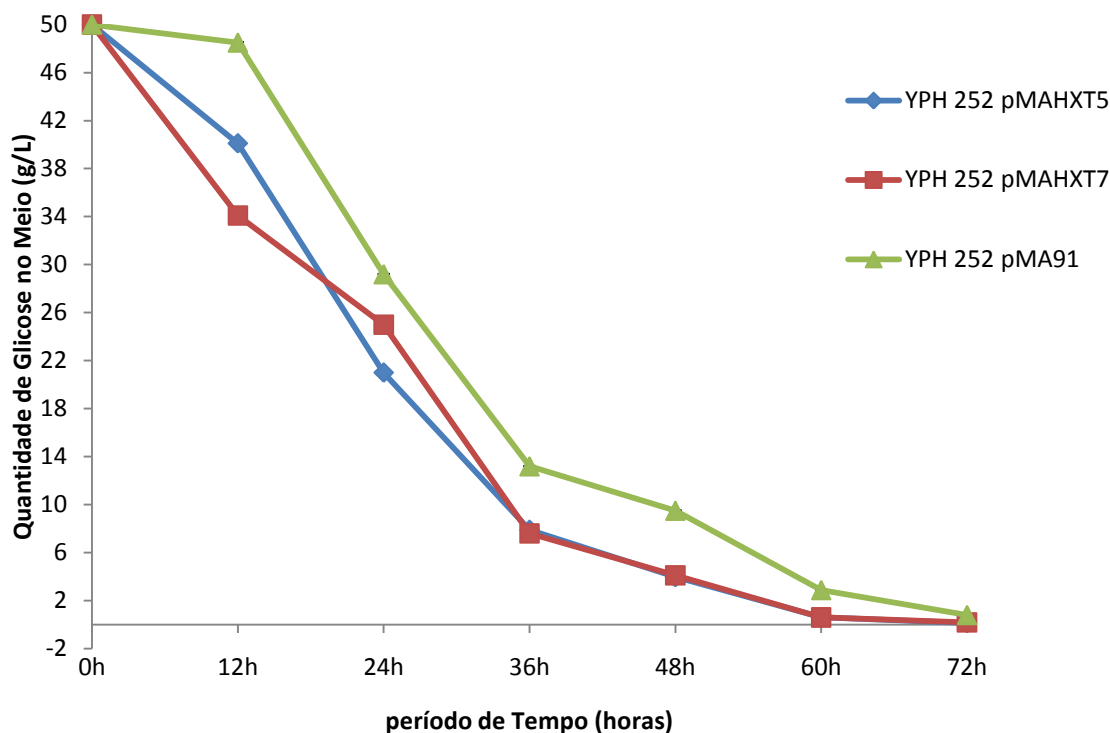


Figura 30. Consumo de glicose em meio mínimo contendo 5% de glicose (SD-2 THUAL), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 50 rpm.

4.2.7.3 Consumo de xilose em condições de aerobiose

Nos cultivos aeróbicos contendo xilose como fonte de carbono foi possível observar maior captação nos clones recombinantes comparando-se ao transporte desse açúcar do clone controle, sendo também possível observar a melhora na captação do açúcar nas primeiras horas. O consumo de xilose pelos clones e pelo controle não foi total restando açúcar ao final do cultivo. Retiraram-se pontos de amostras até 72 horas, porém foram considerados os dados até 36 horas. Apesar do consumo não ter sido completo, os clones captaram mais xilose que o controle, mesmo que isso não tenha sido refletido em biomassa celular. O maior consumo de xilose foi do clone YPH252/pMAHXT7, de 90% da xilose presente. Em 12 horas de cultivo, YPH252/pMAHXT5 teve captação de 7,5 g/l do total de 20 g/l. YPH252/pMAHXT7 captou mais que o primeiro clone, 13,3 g/l do açúcar enquanto que o controle consumiu 7,3 g/l. em porcentagens, e somente o consumo de YPH252/pMAHXT7 foi consideravelmente maior que o do controle, de 82% (Figura 31).

Em 24 horas, YPH252/pMAHXT5 consumiu 11,1 g/l e YPH252/pMAHXT7 14,1 g/l de xilose, enquanto que o controle consumiu 8,5 g/l. Nesse período, é maior a diferença de

consumo, sendo de 31% em YPH252/pMAHXT5 e 66% em YPH252/pMAHXT7 comparando-se ao controle. Em 36 horas ocorre o maior consumo de xilose nos clones recombinantes. Para YPH252/pMAHXT5, foi de 15,2 g/l, em YPH252/pMAHXT7 de 18 g/l e o controle de 9,7 g/l. Esse consumo equivale a 57% maior que o controle em YPH252/pMAHXT5 e 86% em YPH252/pMAHXT7.

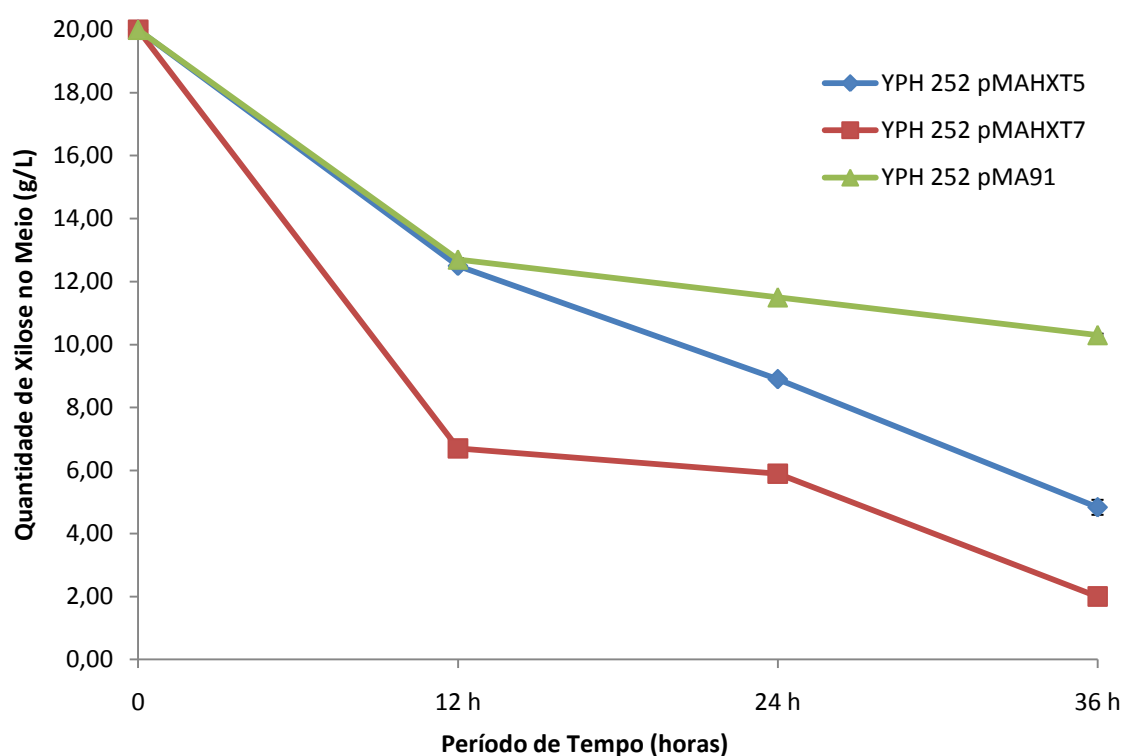


Figura 31. Consumo de xilose em meio mínimo contendo 2% de xilose (SX-2 THUAL), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.

4.2.7.4 Consumo de xilose em condições de restrição de oxigênio

No cultivo em condições anaeróbicas, sem agitação e com 50 g/l de xilose, o consumo dessa pentose pelos clones recombinantes e o controle foi menor, devido à maior quantidade desse açúcar presente e da restrição de oxigênio. Nas primeiras 12 horas, somente o clone YPH252/pMAHXT7 teve consumo de xilose superior ao controle, tendo captado 9,6 g/l, enquanto o controle YPH/pMA91 transportou 5,7 g/l e o clone YPH252/pMAHXT5 4,1 g/l. assim, o consumo de açúcar de YPH252/pMAHXT7 foi de 68% maior que o transporte do controle (Figura 32).

Em 24 horas, o consumo de xilose por YPH252/pMAHXT5 foi maior que do controle, com 8,7 g/l enquanto o YPH252/pMA91 teve consumo de 6,3 g/l e YPH252/pMAHXT7 12,3 g/l. Em porcentagens, o último teve 95% maior consumo que o controle e YPH252/pMAHXT5, 38% maior. Em 36 horas, YPH252/pMAHXT5 atingiu seu máximo de consumo (14,9 g/l) comparado a YPH252/pMA91 (9,4 g/l), sendo em porcentagem 58% maior e YPH252/pMAHXT7 teve consumo de 17,1 g/l ou 82% comparado ao controle.

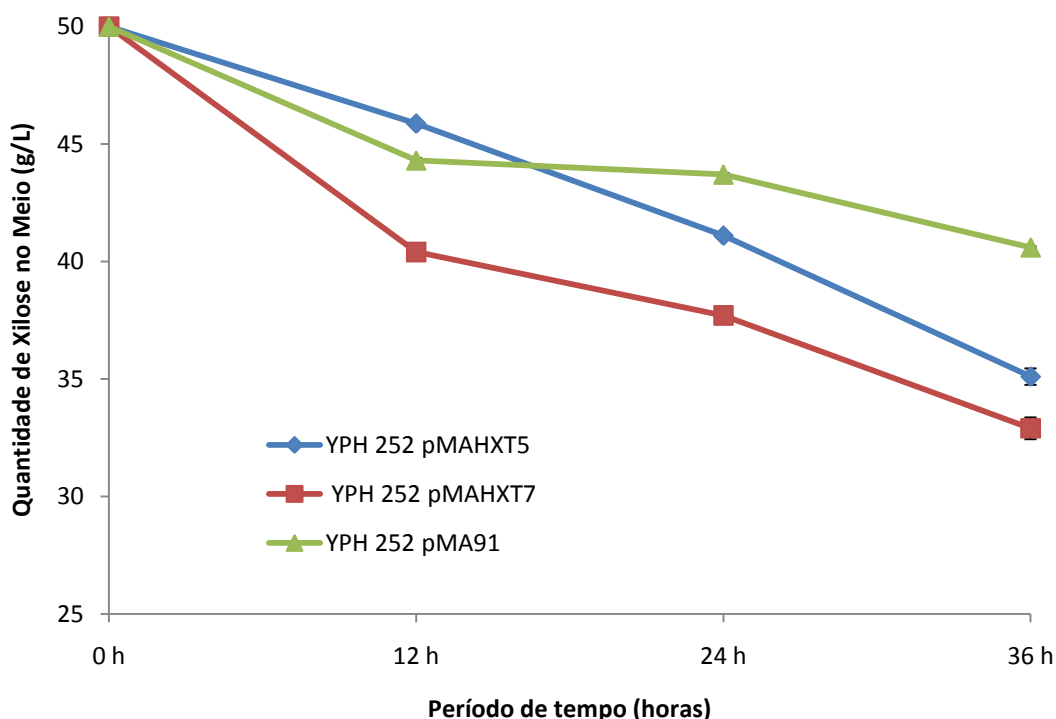


Figura 32. Consumo de xilose em meio mínimo contendo 5% de xilose (SX-5 THUAL), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.

4.2.7.5 Curvas de crescimento das leveduras recombinantes

A curva de crescimento dos clones recombinantes também foi investigada nas condições aeróbicas, com 20 g/l de glicose e xilose. No cultivo contendo 20 g/l de glicose (Figura 33), a biomassa dos clones e do controle chegou a uma absorbância (600 nm) de 5. É possível observar que apesar dos clones terem captado mais glicose e mais rapidamente que o controle, isso não refletiu em maior produção de biomassa, pois as três curvas apresentam, de maneira geral, o mesmo perfil. Isso também ocorreu nos cultivos com 20 g/l de xilose (Figura 34), mas com crescimento celular muito abaixo que com glicose, sendo que a absorbância não ultrapassou 0,4 (a 600 nm).

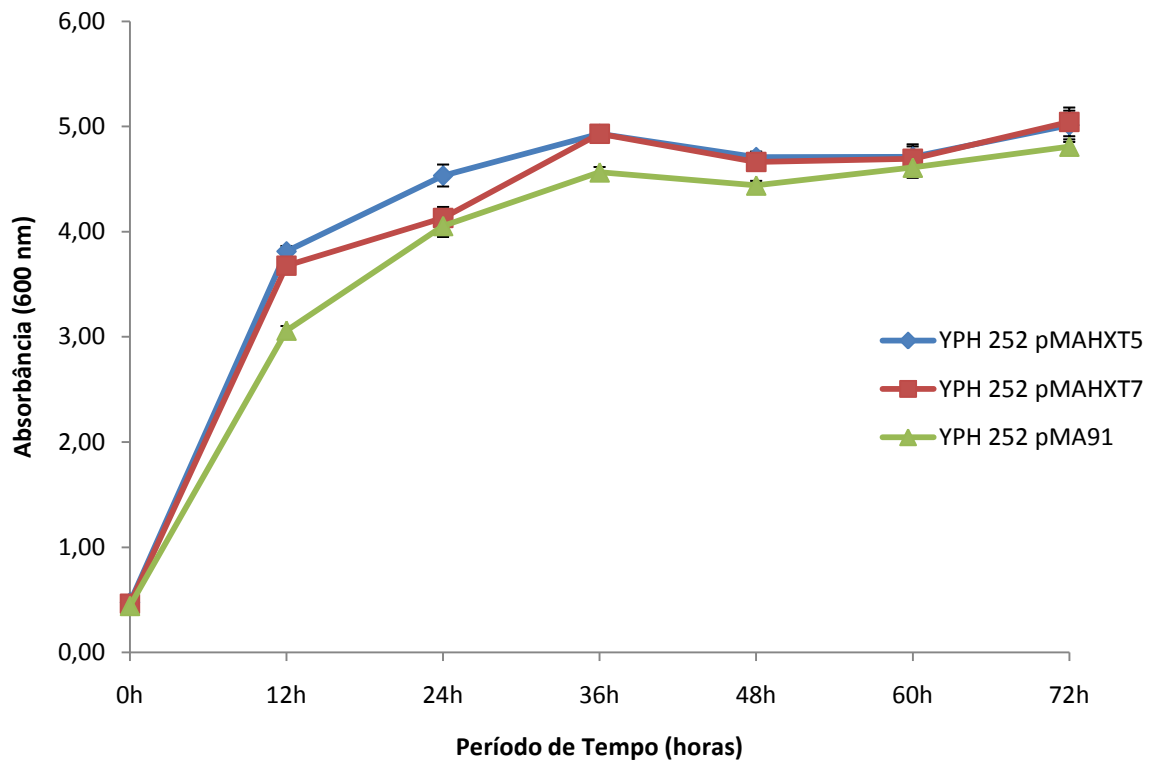


Figura 33. Curva de crescimento em meio mínimo contendo 2% de glicose (SD-2 THUAL), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.

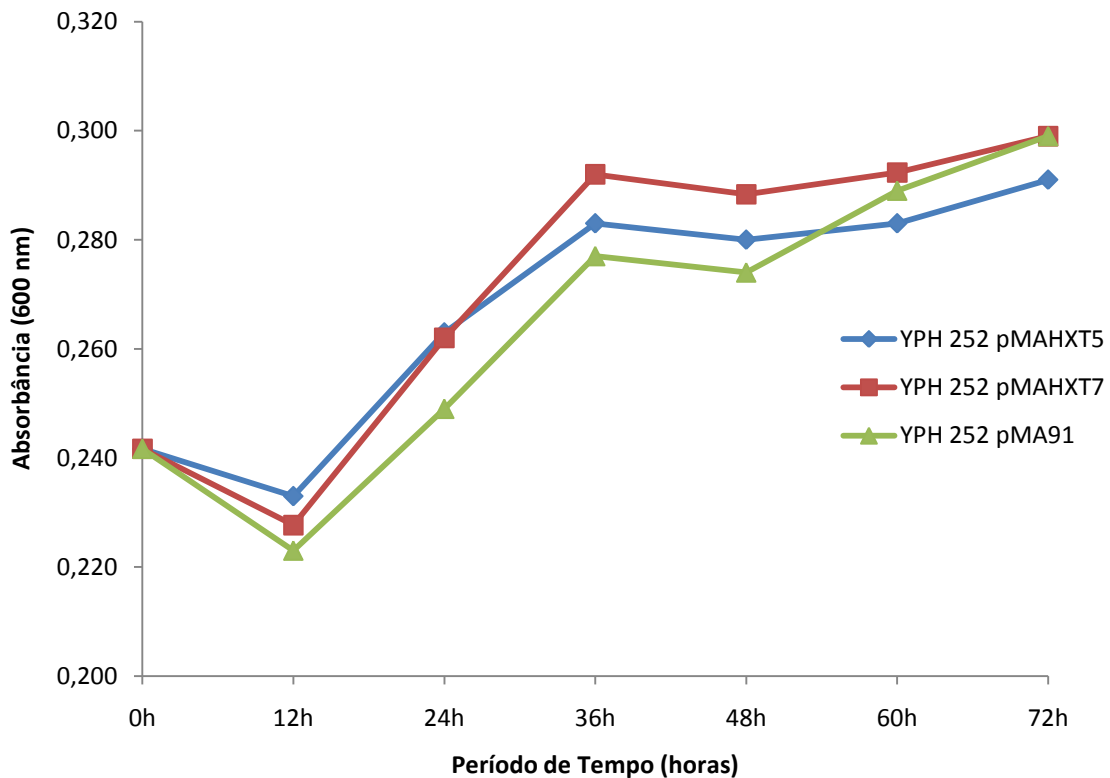


Figura 34. Curva de crescimento em meio mínimo contendo 2% de xilose (SX-2 THUAL), durante incubação em frascos agitados em “shaker”, com agitação de 170 rpm.

4.2.7.6 Fermentação alcoólica das leveduras recombinantes

A produção de etanol foi investigada em todos os tipos de cultivo realizados. Entretanto somente os resultados do cultivo de glicose com 50 g/l, em condições de restrição de oxigênio (Figura 35) são apresentados, devido ao baixo nível de produção de etanol nos outros cultivos, por conta das limitações de detecção dos métodos enzimáticos utilizados. A Tabela 8 mostra a quantidade de etanol produzido pelos clones recombinantes YPH252/pMAHXT5 e YPH252/pMAHXT7 e pelo controle YPH252/pMA91.

Tabela 8 – Produção de etanol pelas linhagens recombinantes construídas neste trabalho.

Linhagem recombinante	Produção de etanol (g/l)			Porcentagem de produção de etanol, comparando com o controle (%)		
	24 horas	36 horas	48 horas	24 horas	36 horas	48 horas
YPH252/pMAHXT5	2,08	2,36	2,4	11	12	11
YPH252/pMAHXT7	1,99	2,07	2,28	7	-1,9	5
YPH252/pMA91 (controle)	1,85	2,11	2,17	-	-	-

É preciso salientar que a detecção de etanol nos ensaios não reflete com 100% de fidelidade a produção obtida, uma vez que o etanol é perdido rapidamente do meio de cultura e armazenamentos até a quantificação.

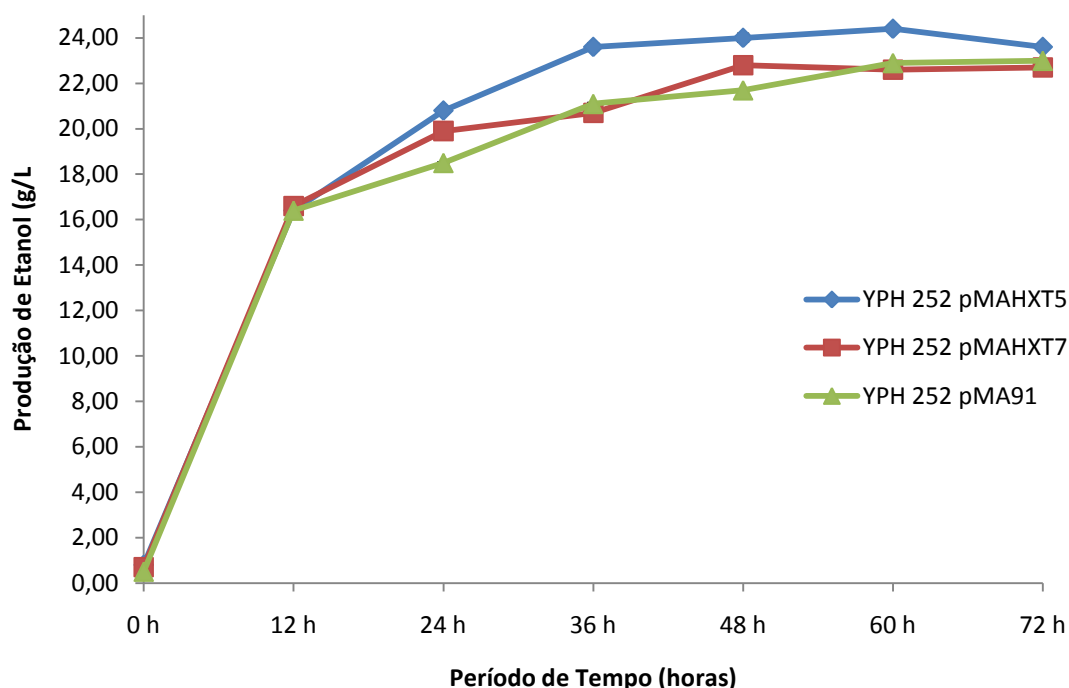


Figura 35. Produção de etanol a partir de glicose pelos clones recombinantes selecionados em meio SD-5 THUAL em “shaker” a 50 rpm.

4.3 Amplificações dos alelos *HXT5* e *HXT7* das linhagens de levedura selvagens e das leveduras selvagens selecionadas

Na Figura 36 são apresentados os perfis de migração em gel de agarose dos *amplicons* obtidos correspondentes aos alelos *HXT5* (1.779 pares de base) e *HXT7* (1713 pares de bases) da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* S288C, linhagem da qual a sequência dos genes foi utilizada para fazer os oligonucleotídeos iniciadores para a PCR. As outras canaletas correspondem às tentativas de amplificações desses genes nas linhagens selvagens isoladas (**LX6**, **LX12**, **LX34**, **LX41** e **LX43**) selecionadas como fermentadoras de xilose.

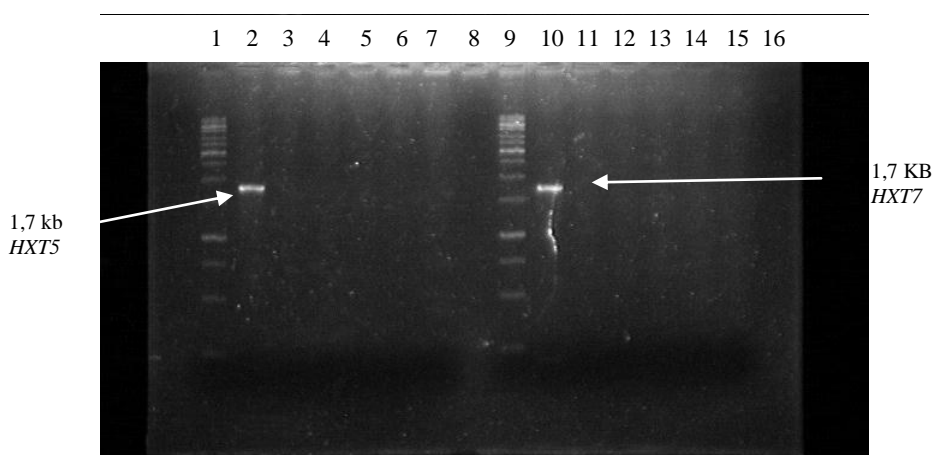


Figura 36. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%, submetido à eletroforese e corado com brometo de etídio de produtos de PCR de alelos de *HXT5* e *HXT7* da levedura S288C: 1 e 9) marcador de 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) (150 ng); 2).*HXT5* de S288C; 3-8) resultado da amplificação; 10) *HXT7* de S288C; 11-16) resultado da amplificação.

Foi testada a amplificação dos alelos *HXT5* e *HXT7* das linhagens industriais (Material e Métodos, item 3.3), com o objetivo de comparar essas sequências com a da linhagem laboratorial SC288C. Todavia, não foi alcançado sucesso.

5 DISCUSSÃO

Muitas das características necessárias para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, como habilidade em degradar este substrato, pouca inibição a substratos e produtos presentes, além de alto rendimento de biocombustíveis, podem ser encontradas em linhagens selvagens isoladas do meio ambiente. Dessa forma, a bioprospecção é uma alternativa de pesquisa interessante para obter resultados em busca da melhoria na fermentação com hidrolisados da biomassa lignocelulósica.

Nos ensaios de fermentação e cultivos aeróbicos realizados neste trabalho com as leveduras isoladas da biodiversidade brasileira foram utilizados apenas meios mínimos para que não houvesse dúvida de que as células estavam utilizando a xilose ou hidrolisado de cana-de-açúcar (esta fonte de carbono, utilizada apenas nos ensaios fermentativos em tubos de ensaio). Pela coloração dos meios e a produção de bolhas, foi possível observar que a melhor condição de fermentação de xilose foi obtida com SX1,5 (0,5% de glicose e 1,5% de xilose). Tal situação demonstra que a glicose auxiliou a utilização de xilose, durante a fermentação nos isolados. Nos tubos com meio SX2 (2% de xilose), a fermentação de xilose pelas leveduras isoladas também foi confirmada, demonstrando a capacidade das leveduras isoladas de utilizar a xilose em condições de microaerofilia.

A menor atividade observada foi nos tubos contendo o meio SH-2 (2% de hidrolisado de cana-de-açúcar). Esse hidrolisado foi analisado por cromatografia gasosa e contém 35,1% de xilose, 10,3% de glicose, 7,9% de arabinose e 46,7% de outros açúcares. Além da presença de maior quantidade de xilose no hidrolisado de cana-de-açúcar, estão presentes compostos fenólicos, furaldeídos e ácidos alifáticos que atuam como inibidores de crescimento das leveduras (MARTÍN et al., 2006).

Goffrini et al. (2002), assim como vários outros autores, utilizaram em seu trabalho o mesmo indicador de pH que o usado nesse trabalho, azul de bromotimol, para facilitar a visualização da fermentação. Guo et al. (2006) selecionaram linhagens de levedura para produção de xilitol utilizando meio completo (YPX) para a fermentação, mas este meio possui nutrientes como a peptona que servem como fonte nutricional auxiliar da fermentação. No trabalho citado, foi confirmado que em YPX o metabolismo dos microrganismos foi direcionado para o crescimento celular e não para a produção de álcool.

Nigam et al. (1985) fizeram isolamento de leveduras de diversos substratos como formigueiros e exudatos de árvores, mas não foi observado produção de gás em condições anaeróbicas tendo a xilose como fonte de carbono. No nosso trabalho, foi observada a produção de gás em condições de restrição de oxigênio, pois os inóculos foram mantidos em estufa a 28 °C, sem agitação, contendo 15 ml do meio em um tubo de ensaio.

Nos cultivos aeróbicos realizados neste trabalho, maior quantidade de xilose foi captada pelas leveduras isoladas do que glicose; entretanto, a produção de biomassa foi igual nos dois cultivos. Isso pode ter acontecido porque esses microrganismos não conseguem obter a mesma quantidade de energia a partir de xilose que obtém a partir da glicose (WAHLBOM et al., 2002), por isso precisam internalizar mais xilose para atingir o mesmo padrão de crescimento. Nigam et al. (1985), isolaram leveduras que produziam mais de 1 grama etanol/l a partir de 20 gramas de xilose/l, sob condições aeróbicas. Em nosso trabalho, observações mais detalhadas mostraram que os tempos de consumo de xilose são diferentes nas diversas leveduras isoladas. Algumas dessas produziram mais biomassa que etanol e, entre estas, o etanol produzido a partir da xilose pode ter sido rapidamente utilizado para crescimento para manter a viabilidade celular. Semelhante constatação já foi observada por (BUZIOL et al., 2008).

Nas leveduras isoladas no presente trabalho, a quantificação de etanol foi realizada nos cultivos aeróbicos, com produção variando apenas entre 0,2 g/l a 0,8 g/l de etanol a partir de 2% de glicose e nos cultivos com 2% de xilose, não foi possível determinar a produção desse álcool. Esse fato é intrigante e mais pesquisas devem ser realizadas com essas leveduras, uma vez que as leveduras foram capazes de consumir até 80% do açúcar presente no meio, demonstrando boa capacidade de transporte intracelular desse açúcar. A identificação das sete leveduras mais promissoras (Tabela 4) ainda não foi realizada. Dessa forma não é possível afirmar se estes isolados são do gênero *Saccharomyces*. O insucesso da amplificação dos genes *HXT5* e *HXT7* desses isolados sugerem que tenham seqüências diferentes da de *S. cerevisiae* S288C.

Os isolamentos de leveduras que fermentam xilose são limitados aos microrganismos capazes de crescer em meios de cultura convencionais e existe pouco conhecimento sobre a significância ecológica da fermentação de xilose. Dessa maneira, podem existir leveduras com bom consumo de xilose, possuindo uma rota bioquímica distinta das conhecidas atualmente, mas que não são cultiváveis em meios laboratoriais conhecidos. Apesar de essa possibilidade

diminuir as chances de isolamento de um novo microrganismo com estas características desejáveis, através da bioprospecção é possível identificar novos genes que podem ser transferidos para microrganismos mais usualmente utilizados em laboratório, como *E. coli* e *S. cerevisiae*, tornando-os capazes de degradar biomassa lignocelulósica ou produzir maior quantidade de etanol a partir deste substrato (ALPER et al., 2009). Assim, a bioprospecção deve focar mais a descoberta de novas funções biológicas, empregando, por exemplo, a metagenômica, do que a descoberta de novas linhagens de microrganismos.

A expressão dos principais genes *HXT* (1, 2, 3, 4, 6 e 7) é regulada pela concentração de glicose extracelular (VERWAAL et al., 2002). Diferentemente, a expressão de *HXT5* é determinada pelo decréscimo da taxa de crescimento das células e quando há pouco nitrogênio disponível (VAN SUYLEKOM et al., 2007). Entretanto, há resultados controversos, já que alguns trabalhos relatam que a concentração de glicose no meio não afeta a expressão de *HXT5* (VERWAAL et al., 2004), outros que a expressão de *HXT5* só ocorre quando há pouca ou nenhuma disponibilidade de glicose (BUZIOL et al., 2002). Além dessas regulações, em condições de estresse como mudanças de temperatura, adição de compostos nocivos às células, aumento da osmolaridade e presença de fontes de carbono não fermentescíveis como etanol e glicerol, a expressão de *HXT5* é aumentada (WAHLBOM et al., 2002).

Segundo Rintala et al. (2008), *HXT5* é mais expresso quando há pouco oxigênio disponível juntamente com limitação de glicose no meio. Em mutantes *hxt5*, as células exibem uma fase lag relativamente longa antes de começar o crescimento exponencial, após a depleção desse açúcar e sua readministração. Isso sugere que a proteína Hxt5 tem um papel na adaptação para condições de crescimento, quando a glicose é utilizada como fonte de carbono e energia (VAN SUYLEKOM et al., 2007). Dessa forma, Hxt5p pode ser considerada um transportador de reserva (BUZIOL et al., 2008). No trabalho de Sedlak e Ho (2004), a expressão de *HXT5* foi severamente reprimida por glicose, mas o nível de transcrição aumentou continuamente com a fermentação na presença de xilose.

Transportadores de alta afinidade, como Hxt6 e Hxt7, são necessários para boa fermentação em condições de baixa concentração de glicose (ÖZCAN et al., 1999). Essas condições aparecem durante a fase exponencial tardia de culturas em batelada em hexoses; durante culturas em batelada alimentada ou em quimiostato com limitação de hexose; e, durante crescimento em açúcares como sacarose ou rafinose, que são hidrolisados em hexoses

fora das células (YE et al., 2001). Os genes *HXT6* e *HXT7* são induzidos em meio contendo baixa concentração de glicose e reprimidos, quase totalmente, em altas concentrações deste açúcar, sendo que concentrações maiores que 5 g/l são suficientes para reprimir suas expressões. O gene *HXT7* tem seu maior nível de expressão quando xilose está sendo consumida (SEDLAK e HO, 2004).

Segundo Rintala et al., (2008), *HXT7* foi mais expresso em condições de pouco oxigênio disponível ou aeróbicas do que em anaerobiose. Perez et al. (2005) concluíram que esse gene, apesar de ser um transportador de alta afinidade, tem sua expressão induzida por estresse, pois é expresso em condições não-ideais, como na falta de nitrogênio. Foi observado, também, que *HXT7* é expresso em meio contendo galactose, etanol e glicerol (YE et al., 2001). O transportador de alta afinidade de glicose *HXT7* apresenta a maior afinidade por xilose que os demais transportadores de hexoses; entretanto, ainda esta afinidade é cerca de 100 vezes menor comparada à afinidade por glicose (SALOHEIMO et al., 2007). Segundo Rintala et al. (2008), os promotores de *HXT7* e *HXT6* não são co-regulados e são apenas 51% idênticos, em contraste com os próprios genes que são 99% idênticos.

A levedura *S. cerevisiae* não reconhece xilose como uma fonte de carbono estritamente fermentescível (JIN et al., 2004), assim esse açúcar é considerado um substrato estranho para a célula, não sendo reconhecida nem como fermentativa nem como oxidativa (PITKÄNEN et al., 2005). Quando esses microrganismos são cultivados em meios contendo xilose, alguns genes que são reprimidos por glicose têm alto nível de expressão (BELINCHON e GANCEDO, 2003). Ou seja, o metabolismo de *S. cerevisiae* crescendo em xilose não corresponde ao metabolismo quando totalmente reprimido observado quando cultivado em glicose, nem ao metabolismo não-reprimido por glicose, sendo que o fluxo até piruvato é mais baixo que quando o crescimento ocorre naquela hexose (SALUSJÄRVI et al., 2008). Isso pode ser uma das razões para a fermentação em xilose não ser tão rápida quanto é em glicose, mesmo em linhagens *S. cerevisiae* recombinantes, uma vez que células crescendo em xilose não têm níveis de expressão suficientes de certos genes.

Observamos que não há na literatura trabalhos realizados de superexpressão dos transportadores endógenos de hexoses de *S. cerevisiae* para captação de xilose com o promotor PGK. Nos trabalhos com expressão dessas proteínas, estas foram superexpressas em linhagens com os genes *HXT* previamente mutados ou deletados. As melhores linhagens com capacidade aumentada de metabolizar xilose tem o gene xiluloquinase (XK) de *S. cerevisiae* e

os genes xilose desidrogenase (XDH) e xilose redutase (XR) de *Pichia stipitis* expressos, compondo a rota de utilização de xilose KDR.

Os clones recombinantes obtidos em nosso trabalho foram capazes de transportar mais rapidamente glicose que a linhagem controle. A linhagem expressando o gene *HXT5* transportou 576% mais glicose que a controle; e a linhagem expressando *HXT7* teve aumento de 981% após 12 horas de cultivo em meio mínimo com 2% de glicose. No trabalho de Sedlak e Ho (2004) em que as linhagens expressavam os genes da rota de utilização de xilose KDR e apenas um transportador de hexose, os clones transportaram de 53% a 121% mais glicose que o controle (que expressava apenas os genes KDR). Em Rossi et al. (2010), que inseriram no genoma de *S. cerevisiae* uma cópia adicional de *HXT1* e *HXT7*, o aumento de consumo de glicose em relação à linhagem controle foi de apenas 8% para *HXT1* e 7% para *HXT7*.

A produção de etanol a partir de glicose pelos clones do nosso trabalho foi próxima ao máximo teórico, e obteve-se maior produção de etanol pelos clones, sendo que a linhagem recombinante expressando *HXT5* produziu 11% e a linhagem expressando *HXT7* produziu 7% comparados ao controle. Já em Rossi et al. (2010) a produção de etanol foi de 17% quando expresso o gene *HXT1* e 21% quando expresso o gene *HXT7*. A menor diferença de produção de etanol pelos clones do nosso trabalho, comparada com Rossi et al. (2010) pode ser devido às condições de cultivo realizadas, que não foram estritamente anaeróbicas e possível perda de etanol para quantificação pela manipulação do meio.

Em nosso trabalho, os clones recombinantes foram capazes de internalizar quantidades maiores de xilose que o controle. O consumo de xilose no clone expressando *HXT7* (86% maior que o controle) foi maior que o clone expressando *HXT5* (57% maior que o controle). Já no trabalho de Sedlak e Ho (2004) o consumo de xilose comparado ao controle foi de 133% a 189%. O maior consumo de xilose comparado ao presente trabalho pode ser atribuído à expressão da rota de utilização de xilose KDR, expresso juntamente com um dos transportadores endógenos como *HXT5* e *HXT7*. No trabalho de Hector et al. (2008) com expressão da rota KDR e um transportador heterólogo de *Arabidopsis thaliana*, o consumo de xilose foi 50% superior que o controle, após o consumo total de glicose. O sucesso do aumento de consumo de xilose por um transportador heterólogo nesse trabalho pode ser devido ao fato de que os transportadores endógenos *HXT* também estavam sendo expressos. Já em outra linhagem expressando apenas a rota KDR (sem a superexpressão de um

transportador) o consumo de xilose chegou apenas à metade (GARDONYI et al., 2003), enquanto que nesse trabalho, o consumo chegou a 90% da xilose presente.

Em nosso trabalho, o aumento de consumo de xilose não foi convertido em maior produção de biomassa ou etanol pelos clones recombinantes que superexpressam Hxt5 e Hxt7. Tal situação pode ter acontecido porque as células não conseguem metabolizar a quantidade aumentada de xilose que é internalizada, uma vez que os clones não possuem os genes da rota de utilização de xilose com expressão alterada. Segundo Gardonyi et al. (2003) a inibição da concentração intracelular ocorre mesmo em baixos níveis, uma vez que o transportador deve ser liberado conforme o açúcar se movimenta pela rota de consumo. Assim, deve ter ocorrido um acúmulo intracelular de xilose, comprometendo a captação total desse monossacarídeo do meio. As leveduras se mantiveram viáveis até o final do cultivo, talvez porque utilizaram o etanol produzido, por respiração. Maier et al. (2002) relatam em seu trabalho que transportadores de difusão facilitada são capazes de realizar efluxo do substrato transportado, quando a concentração intracelular torna-se maior que no meio extracelular. Tal fenômeno pode ter ocorrido com os clones recombinantes, pois a quantidade de xilose no meio diminuiu progressivamente até 36 horas, quando deve ter acontecido o máximo de acúmulo intracelular desse monossacarídeo e o congestionamento dos transportadores e, conseqüentemente, efluxo da xilose. Foi observado que após o período citado de 36 horas, a quantidade de xilose no meio aumentava (dados não mostrados), o que corrobora com a hipótese de efluxo deste açúcar.

É preciso salientar que os vários trabalhos já realizados visando a construção de linhagens *S. cerevisiae* capacidade aumentada de captação e/ou fermentação de xilose, tem inúmeras condições variáveis diferentes. As pesquisas foram realizadas com células diferentes, sob condições e estados fisiológicos distintos, além de terem sido submetidas a diferentes manipulações genéticas, como integração das informações no genoma, ou recebem informações em plasmídeos episomais. Do mesmo modo, o uso de diferentes promotores torna as construções mais ou menos eficientes nestas diferentes linhagens. Tais diferenças são consideradas em vários trabalhos como Saloheimo et al. (2007) e Runquist et al. (2009), que ressaltam que possam ser conseqüências das características particulares dos diferentes promotores de expressão utilizados, mas também podem ser reflexos das propriedades das linhagens hospedeiras. Sedlak e Ho (2004) e Hamacher et al. (2002), também, atribuem as diferenças dos resultados aos diferentes estágios fisiológicos utilizados.

Como nós observamos, diversos autores também observaram em seus resultados aumento no consumo de açúcares utilizados, sem resultar em melhor produção de etanol, ou maior produção de biomassa (HAMACHER et al., 2002; WALHBOM et al., 2002; SEDLAK e HO, 2004; GUTIÉRREZ-LOMELÌ et al., 2008; ROSSI et al., 2010). Hamacher et al. (2002) expressaram em linhagem de *S. cerevisiae* os genes *HXT4*, *HXT5* ou *HXT7* sob regulação do promotor de *HXT7*. Os autores não conseguiram detectar etanol no sobrenadante das culturas e o crescimento celular foi baixo, não atingindo valor de Absorbância a 600 nm maior que 0,5. Esses autores concluíram que a maior captação de xilose não determina aumento do fluxo de metabolização desse açúcar, pelo menos não como único passo na utilização da xilose. Essa conclusão vem de encontro com os nossos resultados e com os resultados de Kuyper et al., (2004) e Kuyper et al. (2005b). Também, Gardonyi et al (2003) concluíram que o transporte tem pouca influência sob a taxa específica de utilização de xilose, a menos que a rota do metabolismo de xilose seja dramaticamente aumentada. Assim, um dos requerimentos para que a superexpressão de transportadores resulte em crescimento celular e produção de etanol é que o açúcar se movimente pela sua rota, sendo consumido e assim, liberando o transportador. É provável que na medida em que o metabolismo de xilose em *S. cerevisiae* seja melhorado, a captação desse açúcar para dentro da célula torne-se uma limitação crescente para atingir a produtividade máxima de etanol a partir de matérias-primas lignocelulósicas (HECTOR et al., 2008; KATAHIRA et al., 2008).

Foi sugerido por Kotter e Ciriacy (1993) que o transporte é um passo crítico em baixas concentrações de xilose, porque as enzimas da rota de utilização desse açúcar como XR, XDH e XK têm baixa afinidade por seu substrato. Outra estratégia sugerida por Gardonyi et al. (2003), que vai de encontro com a possibilidade de bioprospecção de novos microrganismos e novas funções biológicas, é a expressão de um transportador ativo de xilose que seja capaz de captar esse monossacarídeo contra um gradiente de concentração de substrato, possibilitando a utilização do açúcar abaixo de 1 g/l. Tais transportadores são comuns entre linhagens naturalmente capazes de utilizar xilose. Além disso, é vantajoso expressar um transportador específico para xilose não inibido por glicose, dessa maneira, tal transportador iria possibilitar a fermentação de xilose e de glicose. Saloheimo et al. (2007) sugerem que os genes *HXT* precisem de mutações adaptativas para conferir às leveduras eficiente utilização de xilose. Esses autores salientam também que fatores auxiliares de transcrição são necessários para a expressão de vários outros transportadores, mas até o presente, ainda não foi identificado nenhum desses fatores para *HXT*. Com essas observações apresentadas, é possível concluir

que é necessário realizar diversas pesquisas no campo de transporte de utilização de xilose para que este substrato seja tão eficiente quanto é a glicose para a produção de etanol por *S. cerevisiae*.

Dessa maneira, para que *S. cerevisiae* realize a fermentação de açúcares diferentes de glicose, existem critérios que precisam ser levados em consideração como a presença de transportadores funcionais destes açúcares na membrana, capazes de captá-los grande quantidade; presença de enzimas que conectem o seu metabolismo para a via glicolítica (como os genes da rota KDR), além do cuidado da manutenção do equilíbrio de oxi-redução celular. Além disso, é necessário o uso de linhagens industriais robustas (adaptadas às condições industriais) como hospedeiras para a construção destes recombinantes, que devem ter estabilidade para resistir à inibições de altas concentrações de contaminantes, como as presentes no hidrolisado lignocelulósicos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- Na biodiversidade brasileira existem linhagens de levedura ou funções biológicas a serem isoladas relevantes para biotecnologia e de interesse para desenvolvimento de processos industriais;
- As linhagens de levedura isoladas da biodiversidade brasileira são capazes de utilizar xilose como fonte de carbono único presente no meio, apesar de não ter sido detectado a produção de etanol, nas condições de cultivo realizadas e pelos métodos de quantificação utilizados;
- Essas linhagens captam mais rapidamente xilose que glicose presente no meio, entretanto, as células não conseguem obter a mesma quantidade de energia da pentose que obtém da hexose, evidenciada pela produção de biomassa celular;
- Os plasmídeos de expressão pMAHXT5 e pMAHXT7 foram construídos com sucesso, permitindo a transformação genética de diferentes linhagens *S. cerevisiae*;
- Os clones *S. cerevisiae* recombinantes superexpressando as proteínas Hxt5 ou Hxt7 captam mais rapidamente glicose e xilose, quando comparados à linhagem controle;
- A maior capacidade de captação de xilose para o interior das células, dos clones superexpressando os genes *HXT5* e *HXT7* não foi refletida em maior produção de biomassa celular, e não foi possível detectar produção de etanol a partir dessa pentose por estes clones pelo método enzimático utilizado;
- Os clones recombinantes *S. cerevisiae* construídos neste trabalho, quando cultivados em glicose e em condições de restrição de oxigênio, são capazes de produzir significativamente mais etanol que o controle;
- Foi possível desenvolver dois métodos de análises qualitativas para rápida seleção de clones que transportem açúcares de maneira mais eficiente para o interior da célula. Com esses testes, é possível selecionar clones sem marcas auxotróficas de modo eficaz, sem a necessidade de grandes quantidades de testes empregando-se biologia molecular, como a reação de polimerase em cadeia, que são mais caros e mais demorados.

REFERÊNCIAS*

- ALVES, S. L. JR; HERBERTS, R. A.; HOLLATZ, C.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Maltose and maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 65, p. 99-104, 2007.
- ALPER, H.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? **Nature Reviews**, v. 7, p. 715-723, 2009.
- ATTFIELD, P. V.; BELL, P. J. Use of population genetics to derive non-recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source. **FEMS. Yeast Res.**, v. 6, p. 862–868, 2006.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS. Yeast Res.**, v. 8, p. 1155–1163, 2008.
- BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* lacking hexose transport. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 8, p. 26-33, 2004.
- BATT, C. A.; CARVALLO, S.; EASSON-JR, D. D.; AKEDO, M.; SINSKEY, A. J. Evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 28, p. 549-553, 1985.
- BELINCHON, M. M.; GANCEDO, J. M. Xylose and some non-sugar carbon sources cause catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Microbiol.**, v. 180, p. 293-297, 2003.
- BERTILSSON, M.; ANDERSSON, S.; LIDEN, G. Modeling simultaneous glucose and xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* from kinetics and gene expression of sugar transporters. **Bioprocess Biosyst Eng.**, v. 31, p. 369-377, 2008.
- BERTILSSON, M.; OLOFSSON, K.; LIDEN, G. Prefermentation improves xylose utilization in simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated spruce. **Biotechnol. Biofuels** v. 2, n. 8, 2009. doi: 10.1186/11754-6834-2-8.
- BETTIGA, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnol. Biofuels**, v. 1, n. 16, 2008. doi:10.1186/11754-6834-1-16.
- BOLES, E.; HOLLENBERG, C. P. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 1, p. 85-111, 1997.
- BONOMI, A. Workshop Hidrólise de material lignocelulósico. In: CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. p. 679-695.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICA. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. p. 365-380.

BUZIOL, S.; BECKER, J.; BAUMEISTER, A.; JUNQ, S.; MAUCH, K.; REUSS, M.; BOLES, E. Determination of in vivo kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res.**, v. 2, n. 3, p. 283-291, 2002.

BUZIOL, S.; WARTH, L.; MAGARIO, I.; FREUND, A.; SIEMANN-HERZBERG, M.; REUSS, M. Dynamic response of the expression of hxt1, hxt5 and hxt7 transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae* to perturbations in the extracellular glucose concentration. **J. Biotechnol.**, v. 134, p. 203-210, 2008.

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

DAHAN, K. M.; DAVIS, B. P.; PITTMAN, P. E.; KENEALY, W. R.; JEFFRIES, W. Increased xylose reductase activity in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by over expression of *XYL1*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 57/58, p. 267-276, 1996.

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*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 9, p. 5324-5330, 2004.

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

FARRELL, A. E.; PLEVIN, R. J.; TURNER, B. T.; JONES, A. D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D. M. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**, v. 311, p. 506-508, 2006.

FINGUERUT, J. **Workshop de hidrólise de bagaço e palha de cana para produção de etanol**. [S.l.]: CTC, 2006.

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

GARDONYI, M.; JEPSSON, M.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Control of xylose consumption by xylose transport in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 82, p. 818-824, 2003b.

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

GOFFRINI, P.; FERRERO, I.; DONNINI, C. Respiration-dependent utilization of sugars in yeasts: a determinant role for sugar transporters. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 427-432, 2002.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**. v. 315, p. 808-810, 2007.

GOLDEMBERG, J e GUARDABASSI, P. Are biofuels a feasible option? **Energy Policy**. v. 37, p.10-14, 2009.

GRAY, K. A.; Zhao, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 10, p. 141–146, 2006.

GREER, D. Creating cellulosic ethanol: spinning straw into fuel. **Biocycle eNews Bulletin**. Disponível em: <http://www.harvestcleanenergy.org/enews/enews_0505/enews_0505_Cellulosic_Ethanol.htm>. Acesso em: 26 nov. 2008.

GUIMARÃES TM. **Isolamento, Identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GUO, C.; ZHAO, C.; HE, P.; LU, D.; SHEN, A.; JIANG, N. Screening and characterization of yeasts for xylitol production. **J. Appl. Microbiol.**, v. 101, p. 1096-1104, 2006.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol: the fuel of tomorrow with the residues of today. **Trends. Biotechnol.**, v. 24, p. 549-555, 2006.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards Industrial Pentose-fermenting Yeast Strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 937-953, 2007.

HAHN-HÄGERDAL, B.; PAMMENT, N. Microbial pentose metabolism. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 113–116, p. 1207–1209, 2004.

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

HARHANGI, H. R.; AKHMANOVA, A. S.; EMMENS, R.; VAN DER DRIFT, C.; DE LAAT, W. T.; VAN DIJKEN, J. P.; JETTEN, M. S.; PRONK, J. T.; OP DEN CAMP, H. J. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces sp.* strain E2 follows the bacterial pathway. **Arch. Microbiol.**, v. 180, p. 134-141, 2003.

HECTOR, R.; 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. Microb. Cell. Physiol.**, v. 80, p. 675-684, 2008.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D.; POLASKY, S.; TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, p. 11206-1110, 2006.

INGLEDEW, W. M. Yeasts for production of fuel ethanol. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). **The Yeasts**. San Diego, USA: Academic Press, 1993. v. 5, p. 245-291.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts of xylose metabolism. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 17, p. 320–326, 2006.

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

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

JIMENEZ, A.; DAVIS, J. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. **Nature**, v. 287, p. 869-871, 1980.

JIN, Y. S.; JEFFRIES, T. W. Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 105–108, p. 277–286, 2003.

JIN, Y. S.; LAPLAZA, J. M.; JEFFRIES, T. W. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 6816-6825, 2004.

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

JOHANSSON, B.; CHRISTENSSON, C.; HOBLEY, T.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylulokinase over expression in two strains of *Saccharomyces cerevisiae* also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosic hydrolysate. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p.4249-4255, 2001.

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

JORGENSEN, H.; KRISTENSE, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts Biorefining**, v. 1, n.2, p. 119-134, 2007.

KARHUMAA, K.; FROMANGER, R.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 73, p. 1039–1046, 2007a.

KARHUMAA, K.; SANCHEZ, R.G.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORGWA-GRAUSLAND, M. F. Comparison of the xylose reductase-xylytol dehydrogenase and the xylose isomerase pathways for xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Cell Fact.**, v. 6, n. 5, 2007b. doi: 10.1186/1475-2859-6-5.

KATAHIRA, S.; ITO, M.; TAKEMA, H.; FUJITA, Y.; TANINO, T.; TANAKA, T.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Improvement of ethanol productivity during xylose and glucose co-fermentation by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of glucose transporter Sut1. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 43, p.115-119, 2008.

KIM, Y. S.; KIM, S. Y.; KIM, J. H.; KIM, S. C. Xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing multiple xylose reductase genes at chromosomal delta-sequences. **J. Biotechnol.**, v. 67, p. 159-171, 1999.

KOTTER, P.; AMORE, R.; HOLLENBERG, C. P.; CIRIACY, M. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* dehydrogenase gene *XYL2* and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. **Curr. Gen.**, v. 18, p. 493-500, 1990.

KOTTER, P.; CIRIACY, C. P. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, p. 776-783, 1993.

KRUCKEBERG, A. L. The hexose transport family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Arch. Microbiol.**, v. 166, p. 283-292, 1996.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

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

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

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

LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 3, p. 229-242, 1993.

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. **Biochem. J.**, v. 395, p. 543-549, 2006.

- LEE, W. J.; KIM, M. D.; RYU, Y. W.; BISSON, L. F.; SEO, J. H. Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, p. 186–191, 2002.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 69, p. 627–642, 2006.
- LYND, L. R.; VAN ZYL, W. H.; MCBRIDE, J. E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 16, p. 577-583, 2005.
- MAIER, A.; VÖLKER, B.; BOLES, E.; FUHRMANN, G. F. Characterization of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. **FEMS Yeast Res.**, v. 2, p. 539-550, 2002.
- MARGEOT, A.; HAHN-HÄGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 20, p. 372-380, 2009.
- MARTÍN, C.; MARCET, M.; ALMAZAN, O.; JÖNSSON, L. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. **Bioresour. Technol.**, v. 9, p.1763-1773, 2006.
- MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 84, p. 37-53, 2009.
- MELLOR, J.; DOBSON, M. J.; ROBERTS, N. A.; TUIE, M. F.; EMTAGE, J. S.; WHITE, S.; LOWE, P. A.; PATEL, T.; KINGSMAN, A. J.; KINGSMAN, S. M. Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 24, p. 1-14, 1983.
- MESELSON, M.; YAN, R. DNA restriction enzyme from *E. coli*. **Nature**, v. 217, p. 1110-1114, 1968.
- MOES, C. J.; PRETORIUS, I. S.; VAN ZYL, W. H. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomed. Lif. Scien.**, v. 18, p. 269-274, 1996.
- MORTIMER, R. K.; JOHNSTON, J. R. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. **Genetics**, v. 113, p.35-43, 1986.
- NIGAM, J. N.; IRELAND, R. S.; MARGARITIS, A.; LACHANCE, M. A. Isolation and screening of yeasts that ferment D-xylose directly to ethanol. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 50, p. 1486-1489, 1985.
- ÖZCAN, S.; JOHNSTON, M. Function and regulation of yeast hexose transport. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 554-569, 1999.

- PETSCHACHER, B.; NIDETZKY, B. Altering the coenzyme preference of xylose reductase to favor utilization of NADH enhances ethanol yield from xylose in a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Cell Fact.**, v. 7, n. 9, 2008. (doi: 10.1186/1475-2859-7-9).
- PITKÄNEN, S. P.; ARISTIDOU, A.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTILLÄ, M. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metab. Eng.**, v. 5, p. 16-31, 2003.
- PITKÄNEN, J. P.; RINTALA, E.; ARISTIDOU, A.; RUOHONEN, L.; PENTILLÄ, M. Xylose chemostat isolates of *Saccharomyces cerevisiae* show altered metabolite and enzymes levels compared with xylose, glucose, and ethanol metabolism of the original strain. **Appl. Microb. Cell. Physiol.**, v. 67, p. 827-837, 2005.
- QUINTERO-RAMIREZ, R. Hidrólise da biomassa lignocelulósica. In: CORTEZ, L. A. B. Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher, 2010. p. 717-731.
- RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK JR, W.J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**, v. 311, p. 484-489, 2006.
- 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. **Eur. J. Biochem.**, v. 245, 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. **Mol. Microbiol.**, v. 16, p. 157-167, 1995.
- RINTALA, E.; WIEBE, M. G.; TAMMINEN, A.; RUOHONEN, L.; PENTILLÄ, M. Transcription of hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* is affected by change in oxygen provision. **BMC Microbiol.**, v. 8, n. 53, 2008. doi: 10.1186/1471-2180-8-53.
- RODIONOV, Y. V.; KEPPEN, O. I.; SUKHACHEVA, M. V. A photometric assay for ethanol. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v. 38, n. 4, p. 395-396, 2002.
- ROLLAND, F.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M. Glucose-sensing and -signaling mechanisms in yeast. **FEMS Yeast Res.**, v. 2, p. 183-201, 2002.
- ROSSI, G.; SAUER, M.; PORRO, D.; BRANDUARDI, P. Effect of *HXT1* and *HXT7* hexose transporter overexpressing on wild-type and lactic acid producing *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Microb. Cell Fact.**, v. 9, n. 15, 2010.
- RUNQUIST, D.; FONSECA, C.; RÅDSTRÖM, P.; SPENCER-MARTINS, I.; HAHN-HÄGERDAL, B. Expression of the Gxf1 transporter from *Candida intermedia* improves fermentation performance in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 82, p. 123-130, 2009.

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

SALEH, A. A.; WATANABE, S.; ANNALURU, N.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Construction of various mutants of xylose metabolizing enzymes for efficient conversion of biomass to ethanol. **Nucleic. Acid. Symp. Ser.**, v. 50, p. 279-280, 2006.

SALGADO, A. M.; FOLLY, R. O. M.; VALDMAN, B.; COS, O.; VALERO, F. Colorimetric method for the determination of ethanol by Flow Injection Analysis. **Biotechnol. Lett.**, v. 22, p. 327-330, 2000

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

SALUSJÄRVI, L.; KANKAINEN, M.; SOLIYMANI, R.; PITKÄNEN, J-P.; PENTILLÄ, M.; RUOHONEN, L. Regulation of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Cell Fact.**, v.7, n. 8, 2008. doi: 10.1186/1475-2859-7-18.

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

SARTHY, A. V.; MCCONAUGHY, B. L.; LOBO, Z.; SUNDSTROM, J. A.; FURLONG, C. E.; HALL, B. D. Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p. 1996-2000, 1987.

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

SEDLAK, M.; HO, S. M. Y. Expression of *E. coli* *araBAD* operon encoding enzymes for metabolizing L-arabinose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 28, p. 16-24, 2001.

SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K.; RESENDE, A. D. O. M.; MORAIS, J. O.; MORAIS, M. A. JR.; SIMOES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 13-23, 2005.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. H.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SIKORSKI, R. S.; HIETER, P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 122, n. 1, p. 19-27, 1989.

STEPHANOPOULOS, G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. **Science**, v. 315, p. 801-804, 2007.

TAKETO, A. DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. **Biochem Biophys Acta.**, v. 949, p. 318-324, 1988.

TAN, K. T.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Role of energy policy in renewable energy accomplishment: The case of second-generation bioethanol. **Energ. Polic.**, v. 36, p. 3360-3365, 2008.

TOIVARI, M. H.; ARITIDOU, A.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Conversion of Xylose to Ethanol by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of Xylulokinase (*XKS1*) and Oxygen Availability. **Metab. Engin.**, v. 3, p. 236-249, 2001.

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

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Ecopress**. Disponível em: <<http://www.ecopress.org.br/noticias+com+baixa+repercussao/pode+sobrar+11+bilhoes+de+litros+de+etanol+em+2012>>. Acesso em: 16 set. 2010.

VAN MARIS, A. J. A.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A. H.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONCK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 391-418, 2006.

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

VERHO, R.; LONDESBOROUGH, J.; PENTTILÄ, M.; RICHARD, P. Engineering Redox Cofactor Regeneration for Improved Pentose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 5892-5897, 2003.

VERWAAL, R.; ARAKO, M.; KAPUR, R.; VERKLEIJ, A. S.; VERRIPS, T.; BOONSTRA, J. *HXT5* expression is under control of *STRE* and *HAP* elements in the *HXT5* promoter. **Yeast**, v. 21, p. 747-757, 2004.

VERWAAL, R.; PAALMAN, J. W. G.; HOGENKAMP, A.; VERKLEIJ, A. S.; VERRIPS, C. T. *HXT5* expression is determined by growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 13, p. 1029-1038, 2002.

WAHLBOM, C. F.; ELISSON, A.; HAHN-HÄGERDAL, B. Intracellular fluxes in a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cultivated anaerobically at different dilution rates and feed concentrations. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 72, p. 289-296, 2001.

WAHLBOM C. F.; OTERO, R. R. C.; VAN ZYL, W. H.; HAHN-HÄGERDAL, B. JÖNSSON, L. J. Molecular analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with improved ability to utilize xylose shows enhanced expression of proteins involved in transport, initial xylose metabolism, and the pentose phosphate pathway. **Appl. Environ. Microb.**, v. 69, p. 740-746, 2002.

WALFRIDSSON, M.; BAO, X.; ANDERLUND, M.; LILIUS, G.; BULOW, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Ethanol fermentation of xylose with *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Thermus thermophilus* xylA gene, which expresses an active xylose (glucose) isomerase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 12, p. 4648-4651, 1996.

WATANABE, S.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Various mutations by using yeast gene for protein engineering. **Nucleic. Acid Symp.**, v. 48, p. 197-198, 2004.

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

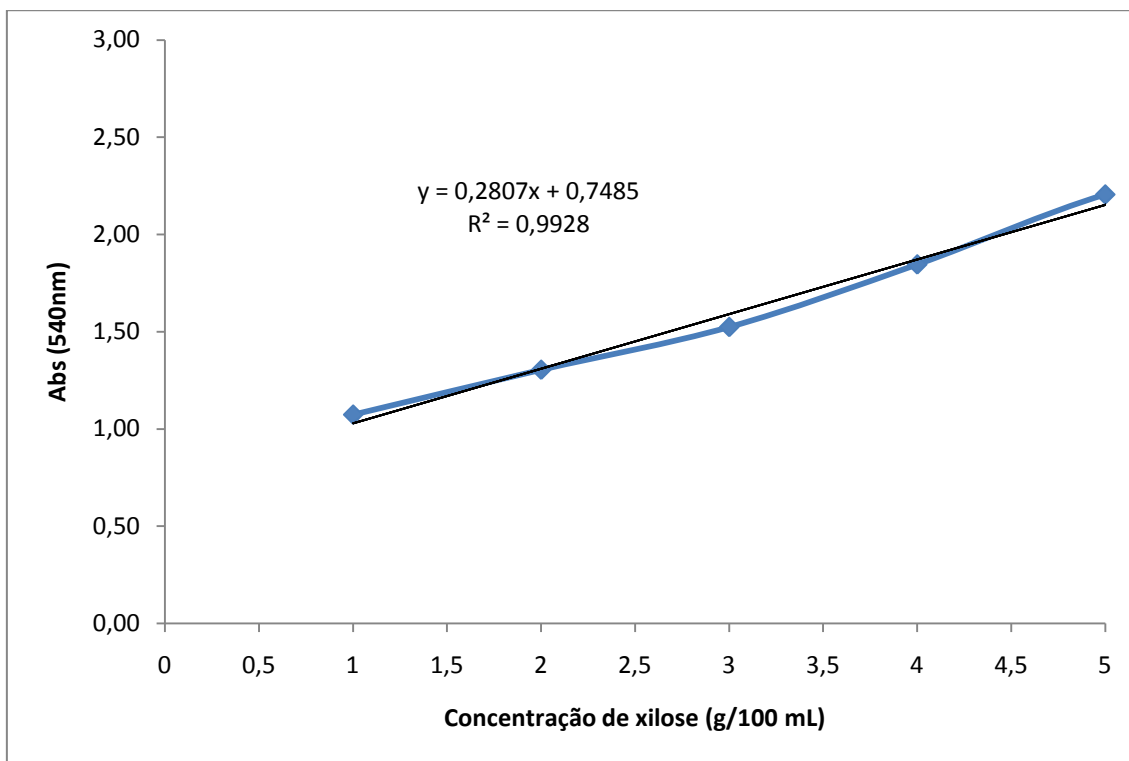
WYMAN, C. E. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power. **Biotechnol. Progr.**, v. 19, p. 254-262, 2003.

YE, L.; BERDEN, J. A.; VAN DAM, K.; KRUCKEBERG, A. L. Expression and activity of the *HXT7* high-affinity hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 18, p. 1257-1267, 2001.

ZASTROW, C. R.; HOLLATZ, C.; ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 27, p. 34-38, 2001.

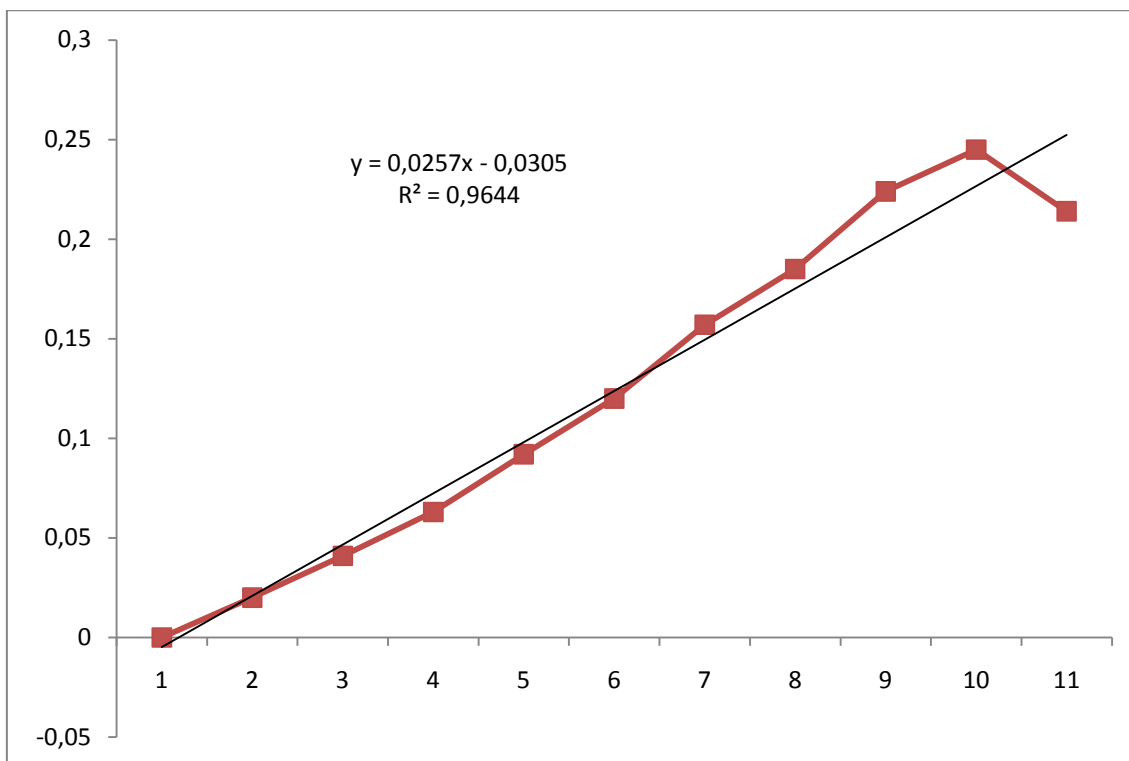
ANEXO A

Curva-padrão realizada com soluções contendo 0,0% - 5% de xilose para a determinação do consumo desse açúcar nos cultivos realizados.



ANEXO B

Curva-padrão realizada com soluções contendo 0,0% - 5% de etanol para a determinação da produção desse álcool nos cultivos realizados.



ANEXO C

Seqüenciamento do gene *HXT5* da linhagem de levedura S288C, obtido neste trabalho.

01 atgtcggaac ttgaaaacgc tcatcaaggc cccttggag ggtctgctac tgtgagcaca
61 aattctaact catacaacga gaagtcagga aactcgactg ctctgggtac cgccggttac
121 aacgataatt tggcacaagc taaacccgtc tcaagttaca tttcccatga aggccctccc
181 aaagacgaac tgggaagagct tcagaaggag gttgacaaac aactagagaa gaaatcgaag
241 tcggatttac tatttgtatc cgtctgctgt ttgatgggtg cttttgggtg gttcgtgttt
301 ggggtgggata ctggtactat atctgggtttt gtcaggcaaa cagacttcat taggcgattt
361 ggcagcaccg gtgcaaacgg gactacctat ctttccgatg tcagaaccgg tttgatggtt
421 tctattttca acatcggtcg cgctatcgga ggtatagttt tgtcaaagct cggtgatag
481 tatggacgta agattgggtct gatgactggt gtcgtcattt actcaattgg gatcatcatc
541 caaatcgctt ccattgacaa atggtatcaa tatttcattg gaagaatcat ctcaggactg
601 ggcggtgggtg gtattacagt tttggcgcct atgctaattt ctgaagtgtc gcctaagcag
661 ttgcgtggta ctctggtttc atgttaccaa ttaatgatca ctttccgatc ctttttggga
721 tattgtacta attttgggtac caagaattac tcaaactctg tccaatggag ggtaccatta
781 ggcttatgct ttgcatggtc tattttttatg attggttggtg tgacgttcgt tcttgaatcc
841 ccacggtatc tggtagaagt gggaaaaatt gaagaggcca agcggtcctt agcaagagct
901 aacaaaacca ctgaagactc tccttttagta actttagaaa tggagaacta tcagtcttct
961 attgaagctg agagattggc gggctctgct tcttgggggg aattgggttac tggtaagccc
1021 cagatgttca gacgtacact aatgggtatg atgattcaat ctttacaaca gctgacaggt
1081 gacaattact tcttttacta tgggtactaca attttccagg ctggttggtt ggaagattca
1141 tttgaaactg ctattgtttt ggggtgtgtt aattttgtt cgactttttt ctcgctatat
1201 accgctgatc gttttgggtc tcgtaattgt ttgttatggg gctgtgtagg tatgatttgt
1261 tgctatgtcg tctatgcctc tgttgggtgtt accagattat ggccaaacgg tcaagatcaa
1321 ccatcttcaa agggtgctgg taactgtatg attgttttct catgtttcta cattttctgt
1381 ttcgctacca cttgggcccc cgttgcctat gtccttatct ctgagtcgta tcccttaaga
1441 gtacgtggta aagcaatgtc gattgcaagt gcctgtaact ggatttgggg gttccttgatc
1501 agttttttca ctccatttat tacttcagca atcaatttct attatggcta tgtctttatg
1561 ggttgtatgg tgttcgcata cttttatgtg ttcttctttg ttccagagac aaagggctta
1621 acattagaag aagtcaacga aatgtatgaa gaaaatgtgc taccttgga gtctaccaa
1681 tggatcccac catctaggag aacaacagat tatgacctag acgctactag aatgatccg
1741 agaccatttt ataaaaggat gttcactaaa gaaaaataa

ANEXO D

Seqüenciamento do gene *HXT7* da linhagem de levedura S288C, obtido neste trabalho.

01 atgtcacaag acgctgctat tgcagagcaa actcctgtgg agcatctctc tgctgttgac
61 tcagcctccc actcggtttt atctacacca tcaacaagg ctgaaagaga tgaataaaaa
121 gcttatgggtg aaggtgaaga gcacgaacct gtcgttgaaa ttccaagag accagcttct
181 gcctatgtca ctgtctctat tatgtgtatc atgatcgctc ttgggtggttt cgttttcggt
241 tgggatactg gtaccatttc tggtttcac aatcaaaccg atttcatcag aagatttgggt
301 atgaagcata aagatgggtac taattatttg tctaaggta gaactggttt gattgtctcc
361 attttcaaca ttggttgtgc cattgggtgg attattcttt ccaaattggg tgatatgtac
421 ggctcgtaagg tgggtttgat tgcggttgtt gtcactaca tcatcggtat tattattcaa
481 attgcatcta tcaacaaatg gtaccaatat tcatcggtga gaattatttc cggtttgggt
541 gttgggtgta ttgccgtttt atctcctatg ttgatttctg aagtatcccc aaagcattta
601 aggggtactt tagtctcttg ctaccaattg atgattactg ccggtatttt cttgggttac
661 tgtaccaact tcggtactaa gaactactcc aactctgtgc aatggagagt tccattaggt
721 ttgtgttttg cctgggcttt gtttatgatt ggtggatga catttggtcc agagtctcca
781 cgttatttgg ctgaagtcgg taagatcgaa gaagccaaac gttctattgc cgtttctaac
841 aaggttgctg ttgatgatcc atctgttttg gctgaagtcg aagctgtctt ggctgggtga
901 gaggcagaga aattagctgg taatgcatcc tgggggtgaat tgttttagtag caagacaaag
961 gtccttcagc gtttgatcat ggggtctatg attcaatctc tacaacaatt gacaggtgat
1021 aactatttct tctactatgg tactactatt ttcaaggctg ttggtttgag tgactcttcc
1081 gaaacctcta ttgtcttggg tattgttaac ttgcttcca ctttggttg tatttacggt
1141 gttgagagat atggtcgctg tacttgtttg ctatgggggtg ctgcatccat gactgcttgt
1201 atggttgtct atgcttccgt ggggtgcacc agattatggc caaatgggtca agaccaacca
1261 tcttccaagg gtgctggtaa ctgtatgatt gtctttgcct gtttctatat tttctgtttt
1321 gctactacat gggctccaat tccttatgtc gttgtttctg aaactttccc attgagagtc
1381 aagtctaagg ctatgtctat tgctacagct gctaattggg tgtgggggtt cttgattgggt
1441 ttcttcactc catttattac tgggtctatt aacttctact acggttacgt tttcatgggc
1501 tgtttgggtc tcatgttctt ctatgttttg ttagttgttc cagaaactaa gggtttgact
1561 ttggaagaag tcaacacccat gtgggaagaa ggtgttctac catggaagtc tgctcatgg
1621 gttccacccat ccagaagagg tgccaactac gacgctgaag aatgactca cgatgacaag
1681 ccattgtaca agagaatggt cagcaccaaa taa

ANEXO E

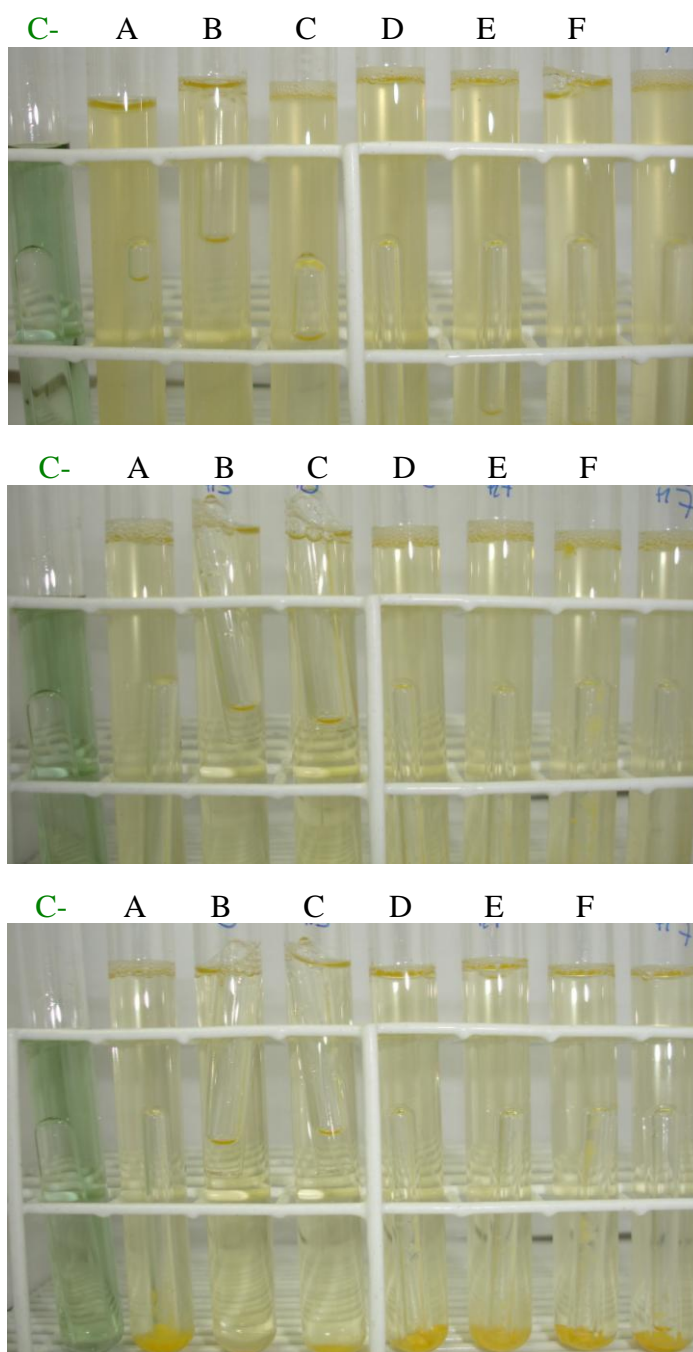
Alinhamento dos genes *HXT5* e *HXT7*. Estes genes possuem similaridade de 70%.

```

HXT5 ATGTCGGAACCTGAAAACGCTCATCAAGCCCTTGGAAAGGGTCTGCTACTGTAGCACAAATCTAACTCAACAACGAGAAGTCAGGAAACTC
HXT7 -----ATGTCAC---AAGACGCTGCTATTGC-AGAGCA-----AACTCCT-----GTGGAG-CAT---CTC
HXT5 GACTGCTCCTGTACCGCCGGTTAGAACGATAATTTGGCACAGCTAAAACCGTCTCAAAGTTACATTTCCCATGAAGGCCCTCCCAAGACGAAC
HXT7 T-CTGCTGTGACTCAGCCGCCACTCGGTTTATACTACACCATC-AAA-CAAGGCTGAA---AGAGATGAAATAAAAGC--TT---ATGGTGAAG
HXT5 TCGAAGAGCTTCAGAAGGAGGTTGACAAACA-CTAGAGAAGAAATCGAAGTCGGATTACTAATTTGATCCGCTGCTGTTGATGCTTCTCTTT
HXT7 GTGAAGAGCACCACCTTCGTTGAAATTCCAA-AGAGACCAGCTTCT-GCCTATGTCACCTCTCTAT---TATG-TGATCATGATCGCCTTT
HXT5 GGTGGGTTTCGTGTTGGGFGGATACTGGTACTATATCTGGTTTGTCAAGGCAAACAGACTTCATTAGGCGATTGTCAGCAACCCTGCAACCGG
HXT7 GGTGGTTCCTGTTTCGGTGGGATACTGGTACCATTTCTGGTTTCATCAATCAAACCGATTTCATCAGAAAGATTGGTATGAAAGCATAAAGATGG
HXT5 GACTACCATCTTCCGATGTCAGAACCGTTTGTATGTTCTATTTTCAACATCGGTCGCTATCGGAGGTATAGTTTGTCAAAGCTCGGTG
HXT7 TACTAATATATTTGCTAAGGTTAGAACTGGTTTGTATGTTCTCATTTTCAACATGGTGTGTCATGGTGGIATATTTCTTCAAATTTGGTG
HXT5 ATATGATGGAAGTAAAGATTTGGTCTGATGACTGTTGTCTCATTTACTCAAATGGGATCATCATCAAATCGCTCCTATGCAAAATGGTATCAA
HXT7 ATATGATCGGTCGTAAGGTGGTTTGATGTCTGTTGTTTCATCTACATCATCGGTATTATTTCAAATGTCATCTACAAATGGTATCAA
HXT5 TATTTCAATCGAAGAATCATCTCAGGACFGGCGSTTGGTGGTATTAAGGTTTTGGCCCTATGCTAATTTCTGAAGTGTGCGCTAAGCAATGCG
HXT7 TATTTCAATCGGTAGAATATTTCCGGTTTGGGTGTGGTGGTATTGCCGTTTTATCTCCTATGTTGATTCTGAAGTATCCCAAGCAATTTAAG
HXT5 TGGTACTCTGTTTCAATGTTACCAATTAATGATCACTTTCCGATCTTTTGGGATATGTACTAAATTTGGTACCAGAAATTAAGTCAAACTCTG
HXT7 GGGTACTTTAGTCTCTGCTACCAATGATGATTAAGTCCGGTATTTTCTGGGTACTGTACAACTTCGGTACTAAGAACTACTCAACTCTG
HXT5 TCCAATGGAGGGTACCATTAGGCTTATGCTTTGCAATGGTCTAATTTTATGATGTTGGTATGACGTTCTTCTGAAATCCCAAGTATCTGGTA
HXT7 TCCAATGGAGAGTTCATTAGGTTTGTGTTTTGCTGGGCTTTGTTTATGATGTTGGTATGACATTTGTTCCAGAGTCTCCACGTTATTTGGCT
HXT5 GAAGTGGGAAAATTAAGAGGCCAAAGGCTCTAGCAAGAGCTAACAAACCACTGAAGA-CTCCCTTTAGTAACCTTTAG---AAATGGAGAA
HXT7 GAAGTGGTAAAGATCGAAGAAGCCAAAGTTCATTTGCCGTTTCTAACAAAGGTTGCTGTTGATGATCCATCTGT---TTTGGCTGAAGTCAAG-AG
HXT5 CTATCA-GTCTCTATTAAGAGTGAAGATTGGCGGGCTCTGCTCTGGGGGGAATTGTTACTGTTAAGCCCAAGATG-TTCAGACGTACACT
HXT7 CTGCTTTGGCTGGTGTAGAGGAGAGAAATTAGCTGGTAAAGCATCTCGGGTGAATTGTTAGTAGCAAGCAAAAGGTCCTTCAG-CGTTTGAT
HXT5 AATGGGTATGATGATCAATCTTACAACAGCTGACAGGTGCAATTAATCTTTTACTATGGTACTACAATTTTCAGGCTGTTGGTTTGAAG
HXT7 CATGGGTGCTATGATCAATCTTACAACAATGACAGGTGATAAGTATTTCTTACTATGGTACTACTATTTTTCAGGCTGTTGGTTTGAAGT
HXT5 ATTCATTTGAAAGTCTATTGTTTGGGTGTTGTTAATTTTGTTCGACTTTTCTCCCTATATACC--GTCTGATCGTTTGGTCTGCTGAAT
HXT7 ACTCTTTGAAACCTCTATTGCTTTGGGTATTGTTAACTTTGCTTCACACTTTTGT-TGG-TATTTACGTTGTTGAGAGATATGGTCTGCTACT
HXT5 GTTTGTTATGGGGCTGTGATAGGTATGATTTGTTGCTATG-TCTCTATGCTCTGTTGGTGTACCAGATTATGGCCAAACGGTCAAGATCAACC
HXT7 GTTTGCTATGGGGTGTGCTATCCATGACTGCTTG-TATGGTTGCTATGCTTCGTTGGTGTACCAGATTATGGCCAAATGGTCAAGACCAACC
HXT5 ATCTTCAAAGGGTGTGGTAACTGTATGATTGTTTTCGATGTTTCTACATTTTCTGTTTCGCTACACTTGGGCCTCCGTTGCTATGCTCTTA
HXT7 ATCTTCAAAGGGTGTGGTAACTGTATGATTGCTTTTGCCTGTTTCTATATTTTCTGTTTGTCTACTACATGGGCTCCAATTTCTATGCTGTTG
HXT5 TCTCTGAGTCTTATCCCTTAAGAGT-ACGTGGTAAAGCAATGTCGATTGCAAGTGCCTGTAACTGGATTGGGGTCTTGTATCAATTTTTCAC
HXT7 TTCTCGAAACTTTCCTATGAGAGTCAAGTC-TAAAGGCTATGCTTATTGCTACAGCTGC-TAAATGGTGTGGGGTTCCTGATGTTTCTTCCAC
HXT5 FCCATTTATTACTTCAAGCAATTTCTATTAAGCTATGCTCTTATGGGTGATGGTGTTCGCACTTTTATGTTGTTCTTCTTTGTTCCAG
HXT7 FCCATTTATTACTGTTGCTATTAACCTTCTACTACGTTTACGTTTTCATGGGCTGTTTGGTCTTCATGTTCTTCTATGTTTGTAGTTGTTCCAG
HXT5 AGACAAAGGGCTTAACTTGAAGAAGTCAACGAATGTATGAAGAAAATGTCCTACCTTGGAAAGTCTACCAATGGATCCCACTATAGGAGA
HXT7 AAACAAAGGGTTTACTTTGGAAGAAGTCAACACCATGTTGGGAAGAAGGTTTCTACCATGGAAGTCTGCCATGGGTTCCACCATCAGAAGA
HXT5 ACAACAGATTTATGAC-CT--AGACGCTACTAGAAATGATCCGAGACCATTTTATAAAAGGATGTTCACTAAGAAAATAA
HXT7 GGTGCCAATACGACGCTGAGAATGACTCAGATGA--CAAG-CCATTGTAAAGAAATCTTCAGCAACC---AAATAA
    
```

ANEXO F

Fermentação em tubos Durhan com pré-inóculo em SD-2 THUAL e inóculo em SD-2 THUAL. O cultivo foi mantido por 72 horas. **A:** YPH 252 pMA91; **B:** YPH 252 pMAHXT5 clone 11; **C:** YPH 252 pMAHXT5 clone 13; **D:** YPH 252 pMAHXT5 clone 20; **E:** YPH 252 pMAHXT7 clone 3; **F:** YPH 252 pMAHXT7 clone 9; **G:** YPH 252 pMAHXT7 clone 20.



ANEXO G

Fermentação em tubos Durhan com pré-inóculo em SX-2 THUAL e inóculo em SX-2 THUAL. O cultivo foi mantido por 144 horas. **A:** YPH 252 pMA91; **B:** YPH 252 pMAHXT5 clone 11; **C:** YPH 252 pMAHXT5 clone 13; **D:** YPH 252 pMAHXT5 clone 20; **E:** YPH 252 pMAHXT7 clone 3; **F:** YPH 252 pMAHXT7 clone 9; **G:** YPH 252 pMAHXT7 clone 20.

C- **A** **B** **C** **D** **E** **F** **G**

