

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

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 ou 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.

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.

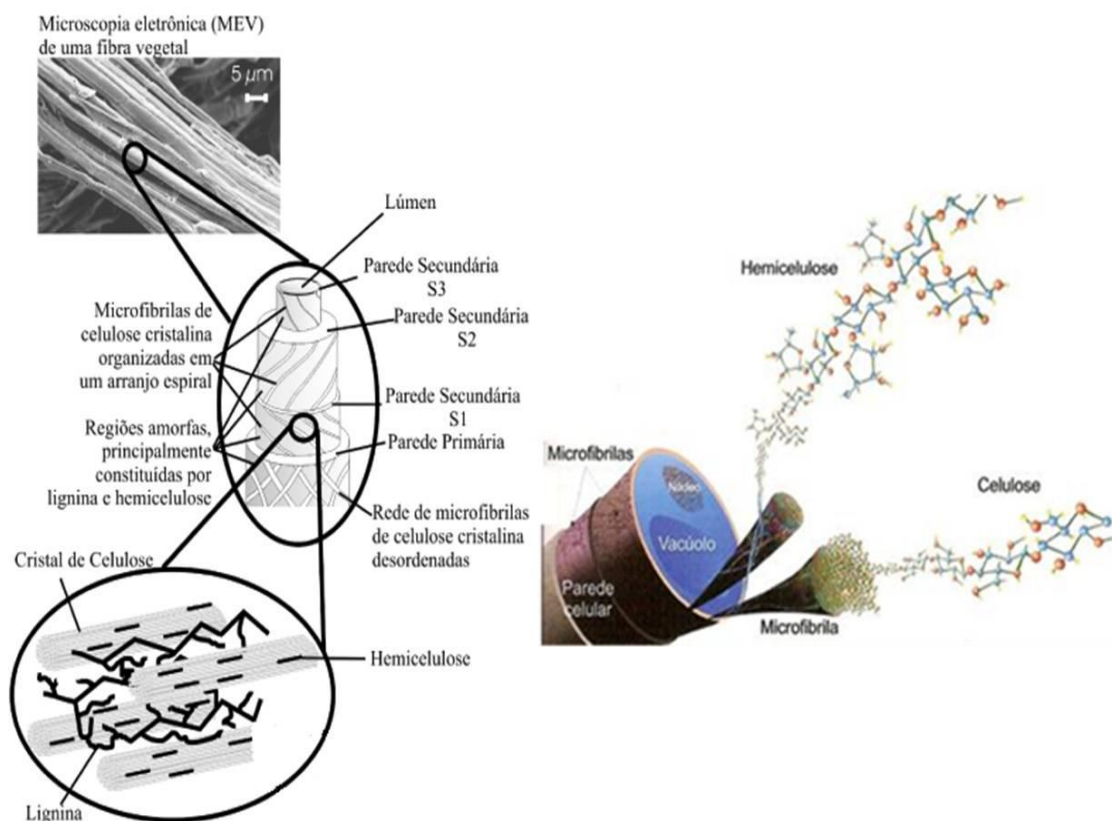


Figura 1. Esquemas da parede celular vegetal. À esquerda são evidenciados os cristais de celulose entremeados por hemicelulose e lignina. À direita, uma molécula de celulose se apresenta aumentada em prolongada, mostrando as unidades de glicose ligadas entre si. Uma das moléculas de hemicelulose também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

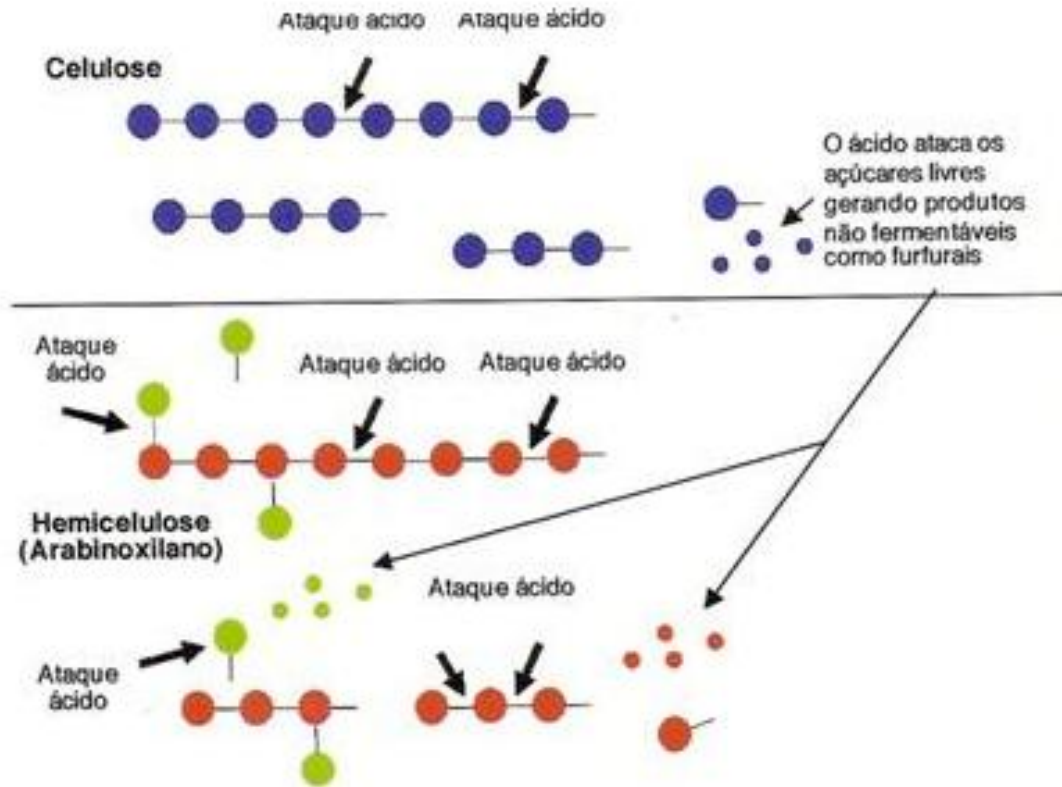


Figura 2. Representação esquemática da hidrólise ácida reagindo com a celulose e a hemicelulose.
Fonte: Buckeridge et al. 2010.

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 é convertido a etanol e vários outros produtos (PITKÄNEN et al., 2003).

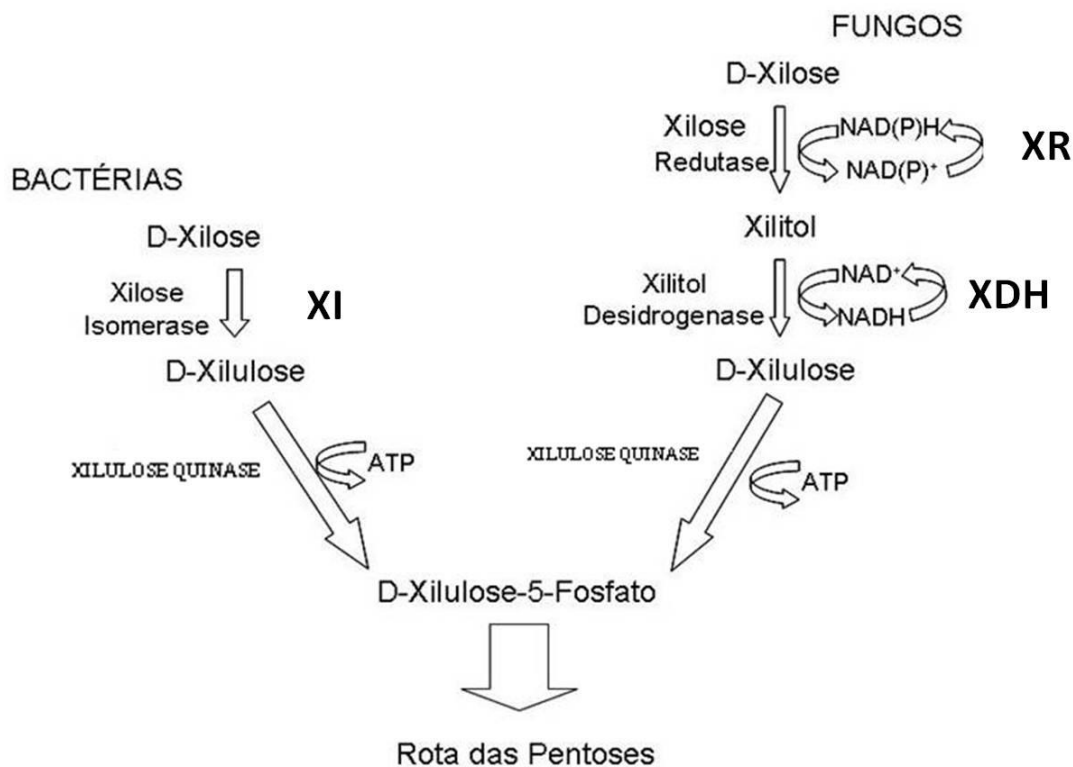


Figura 3. Rotas de conversão de D-xilose em D-xilulose-5-fosfato em bactérias e fungos.
Fonte: adaptado de Hahn-Hägerdal et al., 2004.

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 subteloméricas. 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 apresentem 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.

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.; TUIITE, 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. Ethanolic 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.